

Título del Proyecto de Investigación
al que corresponde el Reporte Técnico:

Obtención y Caracterización de Materiales con Fines Biomédicos etapa 2020-2021

Tipo de financiamiento

Sin financiamiento

Fecha de Inicio: 01/11/2020
Fecha de Término: 24/11/2021

Tipo de Reporte

Parcial

Final

Autor (es) del reporte técnico:

Dra. Rosa Alicia Saucedo Acuña

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES CON FINES BIOMÉDICOS ETAPA 2020-2021

Resumen del reporte técnico en español

En 2021 se tituló 1 estudiante de QFB y uno de LQ, actualmente se encuentran en desarrollo una tesis de QFB y una monografía de Biotecnología. Además, se publicó un artículo científico en revista de cuadril Q1. Ahora que se pudo culminar el procesamiento de las biopsias y se compararon los resultados con un producto líder en el mercado, apreciamos resultados sumamente semejantes, pero nuestra película desarrollada en ICB se dejó de colocar al octavo día porque ya no se adhería a la herida, una vez que la misma se cubrió totalmente por la costra, por lo que resulta indispensable un ensayo con 6 animales para después del octavo día continuar colocando el producto en líquido puesto que se espera que se potencialicen los resultados regenerativos, de tal manera que se espera una cicatrización total antes del día 15 (actualmente el producto líder en el mercado logra un cierre total en alrededor de 18 días), lo que posicionaría a la universidad en el mercado nacional como líder en la cicatrización de heridas cutáneas, así mismo se buscaría tramitar la patente de este producto.

Resumen del reporte técnico en inglés

In vivo tests were carried out to corroborate the excellent response of the Pec-Allan hydrogel in the healing of skin wounds in murines. However, these results could be improved using the Allan hydrogel in fresh and not only dried. In 2021 two students finished their thesis and one article was published in a Q-1 journal by prestigious Publisher Hindawi: The Journal of Polymers.

Now, we want to finish an in vivo trial using a combination of Pec-Allan hydrogel fresh and dried because the last results were obtained using the product only in the early 7 days after the surgery, we expect reduce the healing time of the wound in last of 12 days with this combination of use with the product. With all this, we will start a patent process of the product, covering both version of the hydrogel (dried and fresh).

Palabras clave: regeneración tisular, piel, hidrogel.

Usuarios potenciales: Sector salud.

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, particularmente al Laboratorio de Química Aplicada, Bioterio y Unidad de Cirugía Experimental del Instituto de Ciencias Biomédicas por facilitar las instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

A Derseg Farmacéutica por la compra de materiales, reactivos y consumibles para la realización de las actividades de este proyecto y la beca de un estudiante de licenciatura.

A Grupo Evelsa y Hospital Ángeles por facilitar el uso de equipos e instalaciones para actividades realizadas.

Al Dr. Juan Carlos Cuevas por su participación en el desarrollo de este proyecto.

Por el apoyo técnico recibido del MVZ Alfredo Hernández, Dra. Judith Ríos, Dra. Karla Tovar y MC. Guillermina Martínez.

A los estudiantes Karen Meza, Karla Gutiérrez, Cesar Ramírez, Estefaní Rodríguez y Solanye Olvera por su contribución para las actividades de este proyecto.

A DERSEG por el apoyo otorgado a la estudiante Karla Gutiérrez para la realización de sus estudios de licenciatura.

A CONACyT por el apoyo otorgado a la estudiante Karen Meza para la realización de sus estudios de posgrado.

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de cubrir grandes extensiones de piel dañada, buscando generar métodos que proporcionen los elementos necesarios para reemplazar el tejido perdido y estimular la capacidad regenerativa del organismo ha sido el motor de la ingeniería cutánea.

Recientemente, el interés se ha centrado dentro de esta rama de la ciencia, en la creación de apósitos. Los investigadores refieren que estos apósitos pueden llegar a cumplir funciones de matriz extracelular y brindar protección durante la curación de heridas, promoviendo la regeneración y crecimiento de tejido nuevo (Martínez et al., 2012; Valencia-Gómez et al., 2016).

Con el fin de obtener un apósito para aplicaciones biomédicas, se estandarizó el proceso para desarrollar un hidrogel de pectina enriquecido con alantoína al 100% (Barrios de la O., 2018) y se llevó a cabo un estudio in vivo con excelentes resultados a pesar de que

por su consistencia seca no pudo cubrir la herida después de que la costra formada cubriera el total de la herida (Meza Valle, et al., 2020 y Meza-Valle KZ, et al., 2021).

Una vez concluidos los estudios preclínicos que demuestren que es seguro para su uso, brindando a la vez la información sobre la eficacia y seguridad de fármaco durante el proceso de cicatrización de la herida, se plantea iniciar a patente de dicho producto.

2. PLANTEAMIENTO

2.1 Antecedentes

La ingeniería cutánea surgió motivada por la necesidad de cubrir grandes extensiones de piel dañada; buscando generar métodos que proporcionen los elementos necesarios para reemplazar el tejido perdido, estimular la capacidad regenerativa del organismo y a su vez, que sean utilizables en la práctica clínica (Martínez-Santamaría et al., 2012).

Hoy en día, existe una tendencia en desarrollar apósitos que funcionen como sustitutos de piel libres de células; con el objetivo de que brinden protección a las heridas, al tiempo que funcionan como matriz extracelular y liberadores de citoquinas, factores de crecimiento y otros fármacos (Valencia-Gómez et al., 2016). Se han propuesto diferentes materiales para ser usados como andamios porosos tridimensionales y matrices de hidrogel para distintas estrategias de ingeniería de cutánea (Mano et al., 2007). Estos andamios están compuestos por biomateriales naturales altamente biocompatibles, como colágeno, quitosán, pectina y celulosa; o materiales sintéticos, como policaprolactona (PCL) y polietilenglicol (PEG), policloruro de vinilo, silicona, poliestireno, etc (Chaudhari et al., 2016).

Los hidrogeles son formulaciones de polisacáridos modificados y entrecruzados (gelatina o polisacáridos) disponibles en forma de gel, láminas secas o hidratadas o gasas impregnadas. Son hidrófilos y se hinchan al contacto con soluciones acuosas; llegando a contener hasta un 90% a 95% de agua cuando están hidratados. (Fossum, 2018), ayudan a mantener un ambiente húmedo, facilitando así la cicatrización de heridas al prevenir la deshidratación, la necrosis y la apoptosis, y fomentando la formación de tejido de granulación. Su estructura tridimensional, funciona como un andamio, permitiendo la adhesión y la proliferación, así como la angiogénesis (Giusto et al., 2017); además, las células del tejido en regeneración no tienden a pegarse a su superficie, sino a la del tejido

aledaño Una ventaja adicional de la característica de hinchamiento en medio líquido, les da la propiedad de absorber, retener y liberar bajo ciertas condiciones, algunas soluciones orgánicas (Arredondo y Londoño, 2014).

Uno de los biopolímeros más utilizado recientemente en la investigación, para aplicaciones biomédicas, es la pectina, la cual posee excelentes características de gelificación y biocompatibilidad, por lo que resulta ideal para el diseño de hidrogeles (Chaudhari et al., 2016; Crispín, 2012; Giusto et al., 2017; Pereira et al., 2018; Türkkan et al., 2018; Valencia-Gómez et al., 2016; Wojtasik et al., 2017). Por otro lado, el aloe vera se ha empleado en quemaduras por su actividad antibacteriana frente a *Pseudomona aeruginosa*. También inhibe el crecimiento fúngico. Las propiedades anti prostaglandina y anti tromboxano de los medicamentos con aloe vera son beneficiosas para mantener la permeabilidad vascular y evitar la isquemia cutánea. Además, los medicamentos con Aloe vera pueden estimular la replicación de fibroblastos (HedLund, C., 2018). Dentro de sus principales agentes cicatrizantes se cita a la alantoína, compuesta por dos moléculas de urea, es un intermediario metabólico de una amplia variedad de organismos (desde bacterias, hasta vegetales y animales). Se le atribuyen diversas propiedades farmacológicas como: cicatrización de heridas, antiirritante, hidratante, eliminador de tejido necrótico, estimulante de la mitosis, analgésico, queratolítico e incluso actividad antibacteriana (Natera y Saenz, 2015; Tummalapalli et al., 2016). Su efecto analgésico periférico es principalmente relacionado a su interacción con los receptores opiáceos y a canales de potasio sensibles a ATP (Florentino et al., 2016). Sumathi y col. (2011) establecieron diferentes pruebas con el extracto en diferentes solventes de la planta *Symphytum officinale* obteniendo buenos resultados de este como antibacteriano contra bacterias gram positivas y gram negativas; también se cree que la alantoína modula la respuesta inflamatoria, previene el estrés oxidativo y del daño tisular e interviene en la proliferación de fibroblastos y la síntesis de matriz extracelular durante el proceso de cicatrización. Sin embargo, no existen datos que respalden por completo estas acciones farmacodinámicas, y el mecanismo de acción de alantoína aún se desconoce (Araújo et al., 2010; Natera y Saenz, 2015; Sumathi, Senthil, Bharathi y Sathish, 2011). A pesar de no tener un claro mecanismo de acción, la FDA (US Food and Drug Administration)

establece que su uso es seguro en preparaciones de uso cosmético en concentraciones de 0.5 a 2% (FDA, 2017).

Por estas cualidades que presenta la alantoína como agente cicatrizante y antibacteriano, es que fue el agente seleccionado para enriquecer el hidrogel de pectina obtenido y dado que la pectina no se entrecruza de manera física y la alantoína se distribuye adsorbiéndose por los poros del hidrogel (Saucedo, et al., 2018), se obtuvo una película delgada y flexible de pectina-alantoína en la que las propiedades biocompatibles de ambos componentes no se comprometieron

2.2 Marco teórico

La implementación de nuevos fármacos siempre viene con beneficios y riesgos. Para conocer estos riesgos y beneficios es necesario realizar investigaciones preclínicas y clínicas orientadas a hacer evaluaciones cualitativas y cuantitativas de los efectos terapéuticos y adversos de los fármacos, antes de considerar su comercialización (Herrera y Alesso, 2012).

Guerrero y Lorenzana-Jiménez (2009) describen que, para que un fármaco sea considerado nuevo, debe presentar alguna de las siguientes características:

- a) No haber sido utilizado antes en humanos para tratar enfermedades.
- b) Es resultado de la combinación de fármacos que ya se encuentran aprobados.
- c) Es un fármaco aprobado, pero se evaluará para otro tipo de enfermedad.
- d) Es un fármaco aprobado, pero se probará una nueva dosificación o vía de administración.

En este caso la película de pectina-alantoina corresponde al desarrollo de un nuevo fármaco, dado que cumple con los puntos b y d, anteriormente señalados, por lo que, el presente trabajo se avoca a obtener la validación de sus cualidades cicatrizantes con un modelo in vivo y ponderar el alcance antibacteriano in vitro que justifique el desarrollo de un modelo in vivo con herida contaminada.

En la fase preclínica se realizan estudios farmacológicos in vitro, para determinar el mecanismo de acción y especificidad del fármaco; y en animales de experimentación (in vivo), con la finalidad de obtener información sobre la eficacia y seguridad de fármaco para justificar las pruebas clínicas en seres humanos. Según Herrera y Alesso (2012).

Tanto a la pectina como a la alantoína ya se les han hecho pruebas de este tipo de forma individual, por lo que la NOM-EM-001-SSA1-2012 las exenta de esta parte del procedimiento en particular y el hidrogel propuesto al obtenerse de manera física, no altera la estructura de los componentes y por tanto tampoco sus propiedades (Barrios et al., 2018).

Según Herrera y Alesso (2012) los estudios más importantes en esta fase son los estudios de toxicidad animal. Una de las ventajas de usar un modelo animal en una propuesta para uso dérmico, es la posibilidad de estudiar el proceso de cicatrización de la herida en un menor tiempo (días), cuando este mismo proceso en humanos puede tomar meses. En la selección de un modelo apropiado, debe determinarse la precisión con que el modelo seleccionado refleja los procesos biológicos que ocurren en la curación de heridas humanas. El investigador debe decidir y justificar qué modelo animal resulta más relevante por su relación a los humanos considerando las condiciones únicas del estudio a realizar (Dorsett-Marin, 2004).

Características de las ratas, las hacen animales ideales en muchos aspectos para la investigación. Las cepas más utilizadas en investigación general y en cicatrización de heridas son Sprague-Dawley y Wistar, y no hay literatura que indique la superioridad de una cepa sobre otra (Dorsett-Marin, 2004).

Otra ventaja para considerar a las ratas como modelos animales en cicatrización de piel, es la amplia base de conocimientos disponibles acerca de la curación de heridas en ratas obtenida en muchas investigaciones previas. En este trabajo, se sigue un modelo en murino empleando ratas Wistar para determinar la velocidad de cicatrización de las heridas cutáneas, así como ponderar la efectividad de la película en la formación de un tejido normal y sano acompañando por medio del estudio de biopsias para realizar una evaluación histopatológica.

Modelo in vitro antibacterial para el estudio de productos poliméricos

El uso de aditivos antibacteriales en productos poliméricos para uso biomédico puede promoverse no solo con la intención de eliminar potenciales patógenos preexistentes en las heridas (Valencia-Gómez et al., 2016), sino que también pretenden disminuir el

desarrollo de bacterias durante su almacenamiento (Chylińska, et al., 2015), ya que muchos de ellos no pueden ser esterilizados fácilmente sin dañar sus propiedades.

Entre los métodos más utilizados se encuentran el método de difusión en disco (Leprêtre, et al., 2009; Abou-Zeid, et al., 2011; Díaz-Visurraga, et al., 2012; Zhang, et al., 2015), por medio del cambio en la absorbancia de luz UV (Mageswari y Subramanian, 2012) y por medio de dilución y conteo en placa (Chen y Sun, 2006; Chylińska, et al., 2015 y Chylińska, et al., 2019).

Para este proyecto, una vez que se demostró el efecto cicatrizante en el estudio in vivo previamente aprobado por el comité de bioética, se realizó el ensayo in vitro para probar que el hidrogel tenía alguna propiedad antibacteriana, y así sentar las bases y justificar ante el comité de bioética un siguiente estudio in vivo en heridas contaminadas y los futuros ensayos clínicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Obtención de un producto cicatrizante.

3.2 Objetivos específicos

Obtención de un hidrogel a base de pectina y alantoína para la obtención del producto cicatrizante.

Desarrollo de ensayo preclínico en murinos para la validación del producto como agente cicatrizante.

4. METODOLOGÍA

4.1 Obtención del hidrogel

Se realizó el entrecruzamiento con GA (Sigma-Aldrich) en una solución polimérica al 5% de pectina de manzana (Sigma-Aldrich) a 35 °C por dos horas. Una vez entrecruzada la pectina, se agregó alantoína de grado farmacéutico (Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.) y glicerol de grado farmacéutico (La Corona, S.A. de C.V.) con la finalidad de obtener una película flexible tras dejar secar el hidrogel a 25 °C (Barrios de la O., 2018).

Como producto líder en el mercado con el cual comparar los resultados obtenidos, se empleó el gel Restaunder de Farmacéutica Derseg.

4.2 Ensayo preclínico

Con base en estudios previamente realizados este proyecto fue evaluado y aprobado por el comité de Bioética de la UACJ con la clave CIBE-2017-1-45. Se emplearon un total de 27 ratas Wistar sanas (de 180-200 g) proporcionadas por el bioterio de la UACJ. Con dicho total de especímenes, se conformaron 3 grupos experimentales como se describe a continuación.

Grupos experimentales: C: grupo de control, R: grupo tratado con el gel Restaunder (control positivo) y PA: grupo tratado con la película de pectina-alantoína.

4.2.1 Análisis macroscópico

Para la observación de los parámetros macroscópicos los animales fueron colocados por 30 segundos en una cámara de anestesia inhalada en donde fueron sedados con isoflurano, los días 4, 8 15 y 21, para poder observar y fotografiar la herida con una escala de referencia. Los parámetros que se evaluarán se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Parámetros del examen macroscópico (Garros et al., 2006; González Tuero, 2014).

Parámetro	Criterios		
Tejido de granulación	Presencia	Cantidad	
	Presente o ausente	Abundante, escaso o ausente	
Secreción/ Costra	Tipo	Cantidad	Calidad
	Purulenta, serosa, hemática	Abundante, escasa o ausente	Grosor y adherencia
Velocidad de contracción de la herida	Análisis planimétrico		

4.2.2 Análisis planimétrico

Fue un estudio longitudinal que consistió en medir el área de las lesiones y que nos permitió observar cómo se iban contrayendo las heridas durante el proceso de

cicatrización. El tamaño de las lesiones se determinó mediante el análisis computacional a partir de las fotografías tomadas, realizando un mapeo digital de las mismas para obtener la medida precisa de la superficie de la lesión a los días 4,8,15 y 21 utilizando el software SolidWorks, normalizando los datos. (Araújo et al., 2010).

4.2.3 Análisis microscópico

A los días 4, 8, 15 y 21 se realizó la eutanasia de los animales por sobredosis de anestesia a tres miembros de cada grupo para toma de biopsia de piel. Las muestras fueron extraídas por medio de una incisión elíptica con un margen de piel de 2 cm alrededor de los bordes de la herida y se conservaron en formol al 10% (González Tuero, 2014) hasta su procesamiento histológico. Una vez obtenidas las laminillas con los cortes histológicos se evaluarán todos los parámetros descritos en la siguiente Tabla 2.

TABLA 2. Parámetros a evaluar en el análisis microscópico.
(Meza Valle, et al., 2020).

Parámetro	Puntuación			
	Ausente	Moderada	Intensa	Muy intensa
Inflamación	-	+	++	+++
Angiogénesis	-	+	++	+++
Fibrina	-	+	++	+++
Reepitelización	-	+	++	+++

Una vez comprobada la capacidad cicatrizante del hidrogel, se procedió a evaluar en modelo in vitro, que la distribución de la alantoína activo en el hidrogel de pectina no disminuía la capacidad antibacterial de ambos componentes durante la biointegración de la película en el organismo. Para ello, se realizó un estudio preliminar con E. coli MC4100 una cepa comensal, para proponer a futuro el ensayo en un modelo in vivo con una cepa patógena. Estudio que permitirá hacer la evaluación del efecto cicatrizante y antibacterial de forma simultánea, estudio que requiere realizar adecuaciones para la

bacteria antes mencionada pueda ser empleada con seguridad en el bioterio de la Institución.

4.2.4 Análisis de datos

Con los resultados obtenidos del análisis planimétrico y con los resultados de la medición de los halos generados por los discos de los distintos materiales en el estudio in vitro se analizaron estadísticamente por medio de un ANOVA y una prueba de T respectivamente, en los que los valores de P inferiores a <0.05 se consideraron significativos, ya que los datos obtenidos de la evolución clínica macroscópica de las heridas y de la observación histológica son análisis cualitativos.

5. INSTITUCIONES, ORGANISMOS O EMPRESAS DE LOS SECTORES SOCIAL, PÚBLICO O PRODUCTIVO PARTICIPANTES.

Derseg, Evelsa y Hospital Ángeles Ciudad Juárez.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis macroscópico

Se obtuvo la información de la calidad de cicatrización clínica por medio de fotografías en cada uno de los grupos, así como de la velocidad de contracción de la herida por medio del análisis planimétrico, del cual se muestran los resultados obtenidos en la Tablas 3 y 4 junto con los resultados del ANOVA realizado comparando a los tres grupos a diferentes tiempos.

TABLA 3. Comparación entre grupos de la tasa de contracción de la herida.

t (días)	GRUPOS			Sig.*
	C	PA	R	
4	18.48 ± 3.12	22.26 ± 9.38	28.62 ± 6.02	0.250
8	47.49 ± 3.89	69.99 ± 6.02c	56.52 ± 1.53b	0.002
15	83.99 ± 2.15	90.44 ± 2.90b	91.60 ± 0.99b	0.010
21	93.58 ± 3.70	100b	100b	0.016

TABLA 4. Análisis microscópico de la evolución de la cicatrización.

Grupo	Días	Parámetro histológico			
		Inflamación	Fibrina	Angiogénesis	Epitelización
C	4	+++	++	+	-
	8	+++	+++	++	+
	15	++	+++	+++	++
	21	+	++	++	+++
PA	4	+++	++	+	-
	8	+++-	+++	+++	++
	15	++	++	++	+++
	21	-	+	+	+++
R	4	+++	+++	+	-
	8	+++-	+++	+++	+
	15	++	++	++	++
	21	-	+	+	+++

6. CONCLUSIONES

Se probó que el hidrogel de pectina enriquecido con alantoína presenta propiedades que influyen positivamente en la cicatrización, mejorando la apariencia clínica y acelerando el cierre de la herida.

También se demostró que el hidrogel de pectina enriquecido con alantoína regula el proceso inflamatorio, aumentando el número de fibroblastos en el lecho de la herida.

El estudio in vitro demostró que este hidrogel presenta propiedades antibacterianas que pueden ayudar a prevenir infecciones durante el proceso de cicatrización.

Es importante finalizar el estudio in vivo propuesto para validar la patente del uso del hidrogel de Pec-Allan en seco y húmedo.

7. PRODUCTOS GENERADOS EN 2021

7.1 Artículo en revista de cuadril 1

Meza-Valle, K.Z.; Saucedo-Acuña, R.A.; Tovar-Carrillo, K.L.; Cuevas-González, J.C.; Zaragoza-Contreras, E.A.; Melgoza-Lozano, J. Characterization and Topical Study of Aloe Vera Hydrogel on Wound-Healing Process. *Polymers* 2021, 13, 3958. <https://doi.org/10.3390/polym13223958>

7.2 Tesis/Monografía:

2021 Licenciatura en QFB. Alumno: César Ramírez Hernández.

2021 Licenciatura en LQ. Alumna: Karla Anahí Gutiérrez Holguín.

10. CONTRIBUCIÓN E IMPACTO DEL PROYECTO

Salud: Desarrollo de un producto cicatrizante.

Educación: Formación de recursos humanos de nivel maestría en 2020 y licenciatura en 2021.

Investigación: publicación en revista cuadril 2 en 2020 y cuadril 1 en 2021.

11. IMPACTO ECONÓMICO, SOCIAL Y/O AMBIENTAL EN LA REGIÓN

Social: desarrollo de un producto cicatrizante con alto beneficio en pacientes con quemaduras u otro tipo de enfermedad o accidente con pérdida total o profunda de tejido cutáneo.

12. REFERENCIAS

Abou-Zeid, N. Y., Waly, A. I., Kandile, N. G., Rushdy, A. A., El-Sheikh, M. A., & Ibrahim, H. M. (2011). Preparation, characterization and antibacterial properties of cyanoethylchitosan/cellulose acetate polymer blended films. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 223-230.

Arredondo Peñaranda, A., y Londoño López, M. E. (2014). Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*, 3(5), 83–94.

Barrios de la O, M. L. (2018). Desarrollo y caracterización de un hidrogel a base de pectina y alantoína. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México.

Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., Singh, S. R. y Pillai, S. R. (2016). Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1974.

Chen, Z., & Sun, Y. (2006). N-halamine-based antimicrobial additives for polymers: preparation, characterization, and antimicrobial activity. *Industrial & engineering chemistry research*, 45(8), 2634-2640.

Chylińska, M., Kaczmarek, H., Burkowska-But, A., & Walczak, M. (2015). Novel biocidal N-halamine plastic based on poly (vinyl chloride): preparation and characteristics. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28, 124-130.

Chylińska, M., Kaczmarek, H., & Burkowska-But, A. (2019). Preparation and characteristics of antibacterial chitosan films modified with N-halamine for biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 379-386.

Díaz-Visurraga, J., Daza, C., Pozo, C., Becerra, A., von Plessing, C., & García, A. (2012). Study on antibacterial alginate-stabilized copper nanoparticles by FT-IR and 2D-IR correlation spectroscopy. *International journal of Nanomedicine*, 7, 3597.

Dorsett-Marin, W. (2004). Rat models of skin wound healing: A review. *Wound Repair and Regeneration*, 12(6), 591-599.

FDA Department of Health and Human Services, 21 C.F.R. § 347.10 (2018).

Florentino, I. F., Silva, D. P., Galdino, P. M., Lino, R. C., Martins, J. L., Silva, D. M., De Paula, J. R., Tresvenzol, L. M. y Costa, E. A. (2016). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 186, 298-304.

Garros, I. D. C., Campos, A. C. L., Tâmbara, E. M., Tenório, S. B., Torres, J. M., Agulham, M. Â., Faria, A. C., Brolin, P. A., Machado, R. y Arruda, D. M. (2006). Extrato de *passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas

Guerrero, G. A. M. y Lorenzana-Jiménez, M. (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 52(6), 260-264.

Giusto, G., Vercelli, C., Comino, F., Caramello, V., Tursi, M. y Gandini, M. (2017). A new, easy-to-make pectin-honey hydrogel enhances wound healing in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–7.

González Tuero, J. (2014). Efecto del limo de la salina de Guantánamo en la cicatrización por segunda intención en ratas. *MediSan* 18(9), 1195-1203.

Hedlund, C. (2018). Cirugía de tejidos blandos: Cirugía del sistema tegumentario. En Fossum, T. (2018). *Small Animal Surgery* (5th Ed.). Estados Unidos: Elsevier.

Herrera, R. y Alesso, L. (2012). *Farmacovigilancia hacia una mayor seguridad en el uso de los medicamentos*. Córdoba: Raquel Herrera Comoglio ediciones.

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol.

Mageswari, S., & Subramanian, K. (2012). Synthesis, characterization and study of antibacterial activity of methacrylic copolymer. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 51(13), 1296-1302.

Mano, J. F., Silva, G. A., Azevedo, H. S., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Silva, S. S., Boesel, L.F., Oliveira, J.M., Santos, T.C., Marques, A.P., Neves N.M. y Reis, R. L. (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: Present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society Interface*, 4(17), 999–1030.

Martínez-Santamaría, L., Guerrero-Aspizua, S. y Del Río, M. (2012). Skin bioengineering: Preclinical and clinical applications. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 103(1), 5–11.

Meza Valle K. Z., Saucedo Acuña R. A., Ríos Arana J. V., Lobo Gallo N., Rodríguez Rodríguez C., Cuevas Gonzalez J. C., Tovar Carrillo K. L. (2020). Natural Film Based on Pectin and Allantoin for Wound Healing: Obtaining, Characterization, and Rat Model, *BioMed Research International*, 2020, 1-7.

Natera, Y. M. y Saenz, A. M. (2015). La Alantoina en la Cicatrización de Lesiones de Piel Poscirugía y Posirradiación. *Informe Medico*, 17(4), 132–137.

Pereira, R. F., Barrias, C. C., Bártolo, P. J. y Granja, P. L. (2018). Cell-instructive pectin hydrogels crosslinked via thiol-norbornene photo-click chemistry for skin tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 66, 282–293.

de Cirugía, 14(1), 90–99.

- Saucedo-Acuña, R. A., Barrios-de la O, M. L., Tovar-Carrillo, K. L., Ordoñez-Casanova, E. G. y Rodríguez-Rodríguez, C. (2018). Topography and Morphology of a Hydrogel Enriched with Allantoin for Biomedical Purposes. *Microscopy and Microanalysis*, 24(S1), 1420–1421.
- Sumathi, S. (2016). Antibacterial Activity of the plant extract of *Symphytum officinale* L. against selected pathogenic bacteria. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 92-94.
- Tummalapalli, M., Berthet, M., Verrier, B., Deopura, B. L., Alam, M. S. y Gupta, B. (2016). Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumin as bioactive agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 104–113.
- Türkkan, S., Atila, D., Akdağ, A. y Tezcaner, A. (2018). Fabrication of functionalized citrus pectin/silk fibroin scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 1–11.
- Valencia-Gómez, L. E., Martel-Estrada, S. A., Vargas-Requena, C. L., Rodríguez-González, C. A. y Olivas-Armendariz, I. (2016). Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 37(3), 235–249.
- Wojtasik, W., Czemplik, M., Preisner, M., Dymińska, L., Yuan, G., Szopa, J. y Kulma, A. (2017). Pectin from transgenic flax shives regulates extracellular matrix remodelling in human skin fibroblasts. *Process Biochemistry*, 55, 187–198.

ANEXO A

1.1 Taxonomía de los Roles de Colaborador (con las actividades logradas)

Roles	Definición de los roles	Investigador(a)	Figura	Grado de contribución	Actividades logradas durante el proyecto	Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto
Responsabilidad de la dirección del proyecto	Coordinar la planificación y ejecución de la actividad de investigación. Organiza los roles de cada colaborador, tiene la habilidad de identificar potenciales de cada individuo para generar una sinergia de equipo colaborativo.	Dra. Rosa Alicia Saucedo Acuña	Director(a) del proyecto	Principal	Coordinación y organización de actividades	8
Responsabilidad de supervisión	Elaborar la planificación de las actividades de la investigación (cronogramas y controles de seguimiento), describe los roles identificados por el director del proyecto y facilita el apoyo constante a todos los roles para conseguir un trabajo integral, coherente y que llegue a buen término.	Dra. Rosa Saucedo. Dra. Roxana Malpica. Dra. Marisela Aguirre. Dr. Juan C. Cuevas. MCV. Alfredo Hernández.	Supervisión del proyecto	Principal o - De apoyo	Supervisión de estudiantes, equipos, especímenes y áreas de trabajo.	2
Realización y redacción de la propuesta	Preparación, creación y redacción de la propuesta de investigación, específicamente la redacción, revisión de coherencia del texto, presentación de los datos y la normatividad aplicable para garantizar el cumplimiento de los requisitos.	Dra. Rosa Saucedo.	Redactor de propuesta	Principal	Redacción de la propuesta	40 dos semanas
Desarrollo o diseño de la metodología	Contribuir con el diseño de la metodología, modelos a implementar y el sustento teórico, empírico y científico para la aplicabilidad de los instrumentos en la ejecución del proyecto.	Dra. Rosa Saucedo. Dra. Roxana Malpica. Dra. Marisela Aguirre. Dr. Juan C. Cuevas.	Diseñador de metodología	Principal o - De apoyo	Diseño de la metodología específica de obtención del material, manejo animal, técnicas <i>in vitro</i> y análisis estadístico	2
Recopilación/recolección de	Ejecuta las estrategias propuestas en acciones encaminadas a obtener la información, haciendo la recopilación de datos y la inclusión de la evidencia en el proceso.	Dra. Rosa Saucedo.	Recopilador de	Principal o - De apoyo	Supervisión y análisis de datos	

datos e información		Dr. Juan C. Cuevas. Dr. Armando Zaragoza	datos			
Elaboración del análisis formal de la investigación	Aplicar métodos estadísticos, matemáticos, computacionales, teóricos u otras técnicas formales para analizar o sintetizar los datos del estudio. Verifica los resultados preliminares de cada etapa del análisis, los experimentos implementados y otros productos comprometidos en el proyecto.	Dra. Rosa Saucedo Dr. Juan C. Cuevas Dr. Armando Zaragoza	Analista de datos	Principal o - De apoyo	Supervisión y cotejo de resultados.	0.5
Preparación, creación y/o presentación de los productos o entregables	Preparar la redacción del reporté técnico de avance parcial y el reporte técnico final. Se hace la revisión crítica, la recopilación de las observaciones y comentarios del grupo de investigación. Y finalmente se procede a la edición del documento a entregar.	Dra. Rosa Saucedo Dra. Karla Tovar Dra. Juana Melgoza. Dr. Juan C. Cuevas Dr. Armando Zaragoza	Editor de reportes técnicos	Principal o - De apoyo	Preparación y revisión de artículos, tesis, monografías y reportes.	24 por tres meses.

Estudiantes participantes en el proyecto

Nombre de estudiante(s)	Matrícula	Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto	Actividades logradas en la ejecución del proyecto
Karen Meza	182906	40	Estudios preclínicos
Karla Gutiérrez	166670	15	Obtención del hidrogel
César Ramírez	158648	5	Apoyo en el cuidado animal
Solanye Olvera	170068	1	Apoyo en área de bioterio
Estefany Rodríguez	177603	1	Apoyo en área de bioterio

Article
Characterization and Topical Study of Aloe Vera Hydrogel on Wound-Healing Process

Karen Zulema Méza-Yalla ¹, Rosa Alicia Sánchez-Arcata ^{1,2,3}, Karla Lizette Torres-Carrillo ¹, Juan Carlos Corvax-González ^{1,3}, Erasto Armando Zaragoza-Cortés ^{1,3} and Juana Melgosa-Lorenzo ⁴

- ¹ Institute of Biomedical Sciences, Autonomous University of Ciudad Juárez, Av. Benjamín Franklin No. 400, Zona Postal Condemnio La Plata, Ciudad Juárez 32500, Mexico; rosasanchez@uaj.mx (R.A.S.-A.); karla.torres@uaj.mx (K.L.T.-C.); juanccorvax@uaj.mx (J.C.C.-G.); erasto@uaj.mx (E.A.Z.-C.); juana.melgosa@uaj.mx (J.M.-L.)
- ² Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. Miguel de Cervantes No. 120, Campus Industrial Chetumal, Chetumal 216, México; amate@icmat.uaj.mx
- ³ Demog Co., Ciudad No. 205 Zona Centro, Apaxco de Grande 31646, México; juanm.demog@demog.com
- ⁴ Correspondence: rosasanchez@uaj.mx; Tel.: +52-656-868-0821

Abstract: Wound healing is fundamental to restore the tissue integrity. A topical study of the influence of Aloe vera hydrogel, formulated with 1,2-propanediol (propanediol) and triethanolamine (TEA), on the skin wound-healing process was investigated in female Wistar rats. FTIR spectroscopy confirms the presence of carboxylic acid and methyl ester carboxylate groups related with important compounds that confer the hydrogel a good interaction with proteins and growth factors. SEM images show a microstructure and micro-toughness that promote a good adhesion to the wound. Therefore, the swelling kinetics and the contact angle response contribute to the understanding of the *in vivo* results of the animal test. The results indicated that the Aloe vera hydrogel, prepared with propanediol and TEA, together with its superficial characteristics, improve its rapid penetration without drying out the treated tissue. This produced a positive influence on inflammation, angiogenesis, and wound contraction, reducing 29% the total healing time, reaching the total closure of the wound in 15 days.

Keywords: Aloe vera; hydrogel; support matrix; skin regeneration; wound healing

Check for updates
Citation: Méza-Yalla, K.Z.; Sánchez-Arcata, R.A.; Torres-Carrillo, K.L.; Corvax-González, J.C.; Zaragoza-Cortés, E.A.; Melgosa-Lorenzo, J. Characterization and Topical Study of Aloe Vera Hydrogel on Wound-Healing Process. *Polymers* **2021**, *11*, 3458. <https://doi.org/10.3390/polym11223458>

Academic Editors: Abdul Majid and Tareq Jamani

Received: 19 October 2021
Accepted: 12 November 2021
Published: 15 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Polymers 2021, 11, 3458. <https://doi.org/10.3390/polym11223458>

<https://www.mdpi.com/journal/polymers>

For the water-swelling assay, three sample pieces were cut into 3 pieces of 5 mm × 5 mm. A swelling study was conducted gravimetrically at room temperature using distilled water [7]. Finally, the samples were removed, and the swelling degree (%S) was calculated according to Equation (1).

$$\%S = \frac{(W_1 - W_0)}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

where W_1 and W_0 stand for the weight of the hydrated and dry sample, respectively [8,9].

Fourier transform infrared spectra were acquired using an Alpha-1 FTIR system (Bruker, Billerica, MA, USA) to examine chemical functional groups in dried hydrogel samples in the wavenumber range from 4000 to 400 cm^{-1} . Surface morphology and topography of the film were recorded by optical microscopy (AXO, Olympus, Tokyo, Japan) and scanning electron microscopy (SEM4000Plus, JEK, Akabara, Japan) under a vacuum of 60 Pa and 15 kV. For the analysis of the sample, no treatment was required, only low vacuum. Finally, a contact angle meter (FTA-32, First Ten Angstroms, Portsmouth, VA, USA) was used to calculate the angle of the samples by the sessile drop method.

2.1. *In Vivo* Assay

Female Wistar rats with a weight of 250 g were used for the assay, which were previously approved by the Animal Ethics Committee of the Autonomous University of Ciudad Juárez (approval number CBE-2017-1-45). For this, 27 Wistar rats were used, to which a total thickness wound of 2 cm in diameter was made on the back using a scalpel. The specimens were placed in polycarbonate cages for a month at 21 °C and 40% of humidity with an ad libitum diet [8,9]. The rats were randomly distributed into two groups: Group C with 15 animals, where the wounds received no treatment, and Group D with 12 animals, in which the wounds were treated with the Restazole® hydrogel.

Images were taken with a comparative scale at defined times to later make precise measurements with the SolidWorks (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France) program and calculate the rate of wound contraction to make the comparison between the groups. Likewise, biopsies were taken to assess the quality of the healing tissue between both groups [10].

2.3.1. Surgical Procedure

For surgery, rats were anesthetized using xylazine (10 mg/kg) and ketamine/xolopam (30 mg/kg) by the intramuscular route in the gluteal region. For *in vivo* assay, surgical excision of 2 cm in diameter was made in the dorsal area [8,9]. After the surgery and every 2 h daily, from 8 until 20 h, the area exposed was covered with a layer of hydrogel for the rest of the experiment. Even a scale developed on the wound, and the hydrogel was placed over and on the edge of the wound. The biopsies were performed at five days, varying the lifespan of the rats (0 for only Group C and 4, 8, 15, and 21 days for both groups). Each time, 3 rats were biopsied. In total, 15 rats for Group C and 12 rats for Group D were used.

2.3.2. Macroscopic Analysis

To measure the wound closure, rats were sedated with isoflurane for 30 s to take a photograph of the wound at 0, 4, 8, 15, and 21 days [10]. For the best precision in the measurement, each photograph was analyzed by SolidWorks (Figure 1), comparing the size of the area at day 0 to calculate the contraction of the wound using Equation (2).

$$\%A.D = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

where A_0 and A_t stand for the excision area on day 0 and day “t”, respectively. “t” represents 4, 8, 15, and 21 days.

using Aloe vera gel, as a scaffold or support matrix for tissue engineering, have received considerable attention either alone or in combination with conventional drugs or natural extracts [5,11,20–25]. For instance, the use of fresh Aloe vera gel for 10 days to treat breast soreness and irritation in lactating women produced significant wound healing [13]. In addition, a commercial Aloe vera gel formulated with allantoin, bisabolol, and vitamin E was used to treat patients with vitiligo after phototherapy sessions. A significant reduction of burning sensation and high reduction in scores were observed after two and eight weeks, respectively [8]. Furthermore, Aloe vera powder was used to prepare a cream to treat vaginal atrophy for menopausal women. The treatment revealed a significant improvement in the cytological and clinical indexes of vaginal atrophy, demonstrating that Aloe vera can be used safely [16]. Finally, Aloe vera powder is obtained by freeze drying [14].

Differences in the composition of Aloe vera hydrogels are related to geographical and seasonal variations and the elaboration process [5,21]. In some studies, the selected leaves were rinsed with water or even with a mild chlorine solution as a disinfectant [10,15]. After the hydrogel extraction, for the sterilization, some works selected UV radiation [1], pasteurization, or a cooling process [5] during the homogenization of the hydrogel. Finally, the hydrogel needs to be stabilized with different compounds to prevent separation in products or water loss, maintain a desired pH, or achieve other physical properties such as viscosity or flexibility [20].

Demog Co. elaborates a cosmetic product based on a hydrogel of Aloe vera denominated Restazole®. This hydrogel was designed to treat skin cosmetic afflictions such as acne scars. Restazole® contains, among other additives, parabens as antibacterials [6], glycerin as plasticifier [26], carboxen to control the consistency [16], propanediol to confer a non-sticky feel, and triethanolamine to stabilize the product. These compounds do not contribute to the wound-healing process, but they are widely used in cosmetic and personal care products. Propandiol is a natural alternative to propylene glycol as a common solvent, humectant, and emulsifier. It allows the formulas to flow easily and makes them easier to use on the skin [40–51]. On the other hand, TEA is a common and safe stabilizer and pH adjuster in skincare cosmetics [52,53].

The effective results in 4 days of skin wound treatment using Restazole® aroused interest in promoting its use in the treatment of deep dermis wounds as a pharmaceutical proposal [34]. Consequently, this work aimed to evaluate the commercial hydrogel and demonstrate that the presence of the specific additives, propandiol and triethanolamine, do not exert any negative effect on wound healing. The effectiveness of the product as an accelerator of cutaneous wound healing was demonstrated in an *in vivo* study as part of the pharmaceutical validation of Restazole® for clinical use.

2. Materials and Methods

2.1. Restazole® Hydrogel

Restazole® hydrogel was donated by Demog Co. (Apaxco El Grande, Cuernavaca, Mexico). Three Restazole® products from three different manufacturing batches were used during the analysis. The three batches were manufactured six months before the realization of this study.

2.2. Characterization of the Hydrogel

For characterization, the hydrogel was dried to obtain xerogels. This is necessary to avoid water interference with FTIR and SEM analysis and also to perform the swelling study. Xerogels are prepared by drying hydrogels slowly at 35 °C over 4 weeks. This has the advantage that xerogels retain their porosity (at least in part) after the drying process [15].

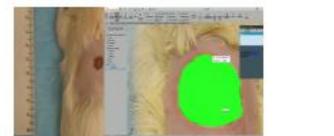


Figure 1. Reference scale (left) and the measure of the wound's area by SolidWorks (right).

2.3.3. Microscopy Study

On days 4, 8, 15, and 21, rats were euthanized by an overdose of anesthesia in three members of each group to take a skin biopsy. Samples were extracted through an elliptical incision with a skin margin of 2 cm around the edges of the wound. The extract was preserved in 10% formalin until histological processing [14]. The slides obtained with the longitudinal section of the biopsies were evaluated with the parameters described in Table 1.

Table 1. Evaluation parameters for microscopic analysis [14].

Parameter	Scale
Inflammation	++ ++ +++
Angiogenesis	++ ++ +++
Fibrosis	++ ++ +++
Epithelialization	++ ++ +++

(++ dense, (+) mild, (++) moderate, (+++) intense.

3. Results

3.1. FTIR Analysis

Restazole® hydrogel, as mentioned elsewhere in the manuscript, is an Aloe vera gel formulated with various additives. Of these, propandiol and triethanolamine are especially observed in this study, since although they do not contribute a therapeutic function to the gel, it is expected that they do not affect its repairing properties. The Aloe vera gel itself consists of a large number of components; therefore, the signals observed in Figure 2 will be discussed based on the reported literature, mainly taking into account the signals for the gel, propandiol and triethanolamine. The absorption at 3200 cm^{-1} is attributed to the presence of the various OH groups contained in the polysaccharide structure of the gel, propandiol and TEA [42,43]. The peaks at 2900 and 2870 cm^{-1} were attributed to the symmetric and asymmetric stretching of the aliphatic C–H bonds of the methylene group ($\text{C}(\text{H})_2$), which are also present in the product components. The signals at 1700 and 1563 cm^{-1} were associated with the stretching of the carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$) and the carboxylate group ($\text{C}(\text{O})\text{O}^-$), respectively [42]. Additionally, the signals at 1279 and 1235 cm^{-1} have been ascribed to the bending of the glycolytic bond and stretching of the acetyl groups. Finally, the pronounced peak at 1033 cm^{-1} is related to the C–O(C–O) bond of polysaccharides present. It should be noted that this signal is also reported for these same groups in TEA and propandiol. Furthermore, the signals at 2966 and 1480 cm^{-1} are reported for the tetras of the aliphatic C–H bonds and are present in triethanolamine and propandiol. On the other hand, the absorptions at 962, 916, and 835 cm^{-1} seem to be mainly related to the presence of propandiol and correspond to stretching of the C–H bond in methyl and methylenes [42,43].

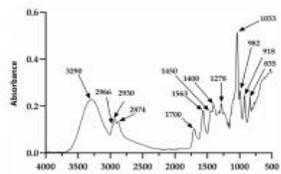


Figure 2. Infrared spectrum of the pure hydrogel.

3.2. Contact Angle

Figure 3a shows an image of fresh hydrogel before the drying process (Figure 3b). The hydrogel collapsed after 5 h absorbing 3 mL of distilled water, obtaining a maximum swelling of 12.693% and a recovery of water expected because fresh Aloe vera hydrogels are 98–99% water [1,21]. A media of 43.11° of contact angle measurements was obtained from fresh hydrogel samples. Figure 4 shows the contact angle measurement over time after the collapse of the sample. Both results were expected because of the presence of functional groups, which were predominantly polar in the hydrogel [10,15].

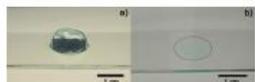


Figure 3. Optical images of Aloe vera hydrogel: (a) sample before drying process and (b) dried sample (orange).

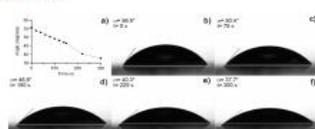


Figure 4. (a) Contact angle measurement over time, (b) initial measure at $t = 0$ s, (c) at 75 s, (d) 150 s, (e) at 225 s, and (f) at 300 s.

3.3. Surface Analysis

Figure 5 portrays SEM images of the dehydrated hydrogel. As noted, a crystalline structure conforms the deposition. At high magnification (Figure 5a), two types of crystalline structures are observed: one dendritic type and the other continuous. Figure 5b, at higher magnification, shows the crystal structure of the dendritic phase, which is made up of crystals of various sizes and geometries. On the other hand, in the continuous or non-dendritic phase, the crystals have a very homogeneous size, in the order of 2 to 15 μm . It is worth saying that this type of topography and morphology improve the adhesion of the hydrogel with surrounding tissue and pores, which will permit draining the excessive moisture in the wound.

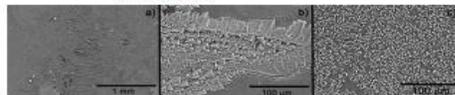


Figure 5. SEM image of the hydrogel dried (orange) at various magnifications: (a) longitudinal image of the surface, (b) approach to dendritic structure, and (c) approach to continuous crystalline structure.

3.4. Healing Process

Table 2 and Figure 6 show the reduction area of the control (Group C) and Restatzel® (Group D), where the advantage in the reduction of the area of the wound treated with the hydrogel is clear. For group D on the second day, scales began to develop, and for day 8, the scab covered all wound.

Table 2. Percentage reduction of the wounds during the healing process.

t (days)	C (%)	D (%)	Significance
4	16.40 ± 3.12	26.62 ± 6.62	0.041
8	27.49 ± 3.69	56.52 ± 1.53	0.017
15	83.90 ± 2.15	91.40 ± 0.59	0.006
21	93.58 ± 3.20	100	0.048

SD: Standard Deviation Coefficient; first t and t_2 considering the secondary t for both groups for each group test $q < 0.05$.

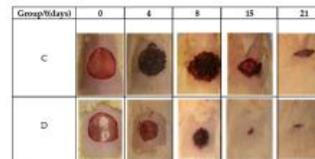


Figure 6. Images of the wound during the healing process.

Table 3 shows the results of microscopic analysis of the wounds at 4, 8, 15, and 21 days of the experiment (Figure 7).

Table 3. Evaluation of the histological parameters.

Group	t (days)	Parameter			
		Inflammation	Fibrin	Angiogenesis	Epithelialization
C	4	+++	+++	++	+
	8	+++	+++	+++	+++
	21	+	++	++	+++
D	4	+++	+++	++	+
	8	+++	+++	+++	+++
	21	++	++	++	+++

(+) absent, (++) mild, (+++) moderate, (++++) intense.

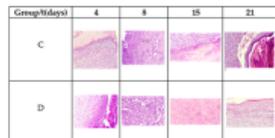


Figure 7. Morphology of the tissue during the healing process. Hematoxylin and eosin stain, 20x.

On the fourth postoperative day, a diffuse chronic inflammatory process was observed with a predominance of lymphocytes. In addition, the presence of macrophages and fibroblasts, some angiogenesis, and the absence of epithelium is noted. Fibrin was more abundant in Group D. The observed plasmatic analysis results showed a higher wound area reduction of Group D. This might be related to higher fibrin production and distribution.

On the eighth day, diffuse chronic inflammation with a predominance of lymphocytes was less intense in Group D. An abundance of fibrin was also observed in both groups and moderate angiogenesis in Group C and abundant in Group D, as shown in Figure 7. Both groups showed areas of epithelialization in the areas close to the edge of the ulcer. On day 15, moderate inflammation was observed in Group C and less in Group D, as well as the maturation of the fibrin areas and re-epithelialization of the tissues. On day 21, Group C exhibited moderate to scarce inflammatory cells and a completely reconstructed epithelium under a crust in the process of shedding. Meanwhile, the inflammatory cells were scarce to absent in Group D, observing complete healing.

4. Discussion

Peaks related to pectin-like chondroglucuronate and acemannan were detected in the hydrogel. Both of them are important compounds known to induce tissue repair [13–15]. The carboxylic acid and methyl ester carboxylate groups present in these compounds confer to Aloe vera hydrogel a high polarity, which is an advantage for the practical use because it guarantees the adhesion to a wound but with good interaction with proteins and growth factors [4,15,17].

Contact angle measurements and the maximum swelling value show the hydrophilic character of the hydrogel, which is an important property to improve positively the healing process and cell proliferation, improving the clinical appearance and accelerating wound closure [15,24,25]. Polar groups will be an advantage in the adsorption of the material, and non-polar groups present in the Aloe vera too will facilitate the bio-integration of the hydrogel with proteins and growth factor into the wound. There has been reported a relationship between the contact angle value and protein adsorption to promote cell adhesion on the material's surface. It has been shown that contact angle values between 40° and 60° promote cell adhesion and are a more suitable surface for tissue regeneration [31,32,41]. SEM images showed a rough surface, which is a necessary feature to promote better adhesion and interaction of the material in the wound and surrounding tissues [14,19]. Keeping the structure of natural hydrogel is desirable to use the hydrogel as a support matrix to tissue regeneration as a corrective tissue dose [19]. The results suggested that the wounds treated with the hydrogel show no histological differences, regarding the control wounds in the observed lamellae; however, clinically, the wounds looked better without the presence of abnormal cells. Nevertheless, research using other parameters and biological conditions must be performed.

An *in vivo* trial determines that the compounds of Aloe vera hydrogel have adequate surface and biocompatible properties as well as good wound-healing promotion from an *in vivo* test. The data provide sufficient evidence to affirm that the wound contraction speed of the control group is significantly lower than that of the group treated with Restatzel® with 99% confidence. On day 4, it was observed that the contraction rate of the wound is higher than the control, showing a positive effect on the healing process. Furthermore, the mathematical equation obtained from SolidWorks® permitted estimating the total closure of the wound of the control group on day 24, while the group treated with the hydrogel completely closed on day 18. It is worth noting that the simulation program showed a 79% reduction in the healing time of the complete healing process in comparison with the control group.

Similar topical studies of the influence of an extract or gel of Aloe vera on the skin wound-healing process in Wistar rats (with a wound made on the back) reported a significantly higher reduction of the scars (almost total wound closure) at 8 days for chitosan–glucan complex fibers reinforced with collagen and embedded with Aloe vera powder [34], 15 days for the pectine–allantoin film [19], and 15 days for insulin-loaded nanosilicone with fresh Aloe vera gel in animals with induced diabetes [23]. These research findings highlight the importance of the compound present in the hydrogel formulation, regardless of whether it is added fresh or in powder form, since the investigations achieve around 79% complete wound closure in the first 8 days. The results suggest that the Aloe vera hydrogel, a fresh hydrogel enriched with isopropylalcohol and TEA, of Dong Co, is competitive for improving the skin wound-healing process, even though Restatzel® was used after 6 months of preparation (stored at 18–24 °C), a period after which no decrease in its effectiveness was observed. Furthermore, this work demonstrated that isopropylalcohol and triethanolamine, present in the formula of Restatzel® hydrogel, did not show an adverse effect on the treatment of wounds.

5. Conclusions

There is a tendency to prefer the use of fresh Aloe vera hydrogels just extracted from the plant to working with hydrogels or extracts subjected to further processing. This has decreased the lifetime of the active agents or raised costs for refrigeration. This work shows that it is possible to obtain very competitive results with Aloe vera hydrogels processed months in advance and enriched with ingredients widely used in the personal care industry, but which were being neglected in the most recent proposals, such as the case of isopropylalcohol and triethanolamine. Consequently, we suggest reconsidering the use of sterilization and stabilization methods that allow a longer useful life of the product to reduce its cost and achieve a greater scope in its distribution. Finally, this research reinforced

ANEXO C

Tesis/Monografías concluidas en 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS



TÉCNICAS DE ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO APLICADAS A
HIDROGELES DE PECTINA

POR
CÉSAR RAMÍREZ HERNÁNDEZ

MONOGRAFÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

CD. JUÁREZ, CHIH.

NOVIEMBRE, 2021.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DE UN HIDROGEL ENRIQUECIDO CON

Jagelias erecta

POR
KARLA ANAHÍ GUTIÉRREZ HOLGUÍN

MONOGRAFÍA
LICENCIATURA EN QUÍMICA

CD. JUAREZ, CHIH.

NOVIEMBRE, 2021.

<https://www.uacj.mx/Investigacion/documentos.html>