



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Actividad antioxidante de extractos de *Calendula officinalis* asociados a soportes de colágeno tipo I**

**Adriana Matilde Flórez Cabrera**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología  
Bogotá D.C., Colombia  
2014



# **Actividad antioxidante de extractos de *Calendula officinalis* asociados a soportes de colágeno tipo I**

**Adriana Matilde Flórez Cabrera**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Microbiología**

Directora:

QF. Ph.D Marta Raquel Fontanilla Duque

Codirector:

QF. Ph.D Juan Camilo Marín Loaiza

Línea de Investigación:

Biología celular

Grupo de Investigación:

Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2014



*A Dios por permitir que este sueño sea una realidad, a mi esposo por su amor y apoyo incondicional y a todas las personas que hicieron parte de esta travesía.*





## **Agradecimientos**

Agradezco especialmente a la profesora Marta Fontanilla, directora del grupo de Investigación en Ingeniería de Tejidos y directora de este trabajo de investigación, por la oportunidad que me dio de ser parte del grupo, por su confianza al permitirme realizar este proyecto de investigación y por todo el apoyo que me ha brindado.

Al Profesor Juan Camilo Marín por codirigir este trabajo de investigación y por toda su colaboración.

A mis compañeros de trabajo Edward Suesca, Ana Milena Bermeo, Sergio Casadiegos, Diana Nieto, María Elisa Soto, Rosa Helena Bustos, Liliana Gil y Leonardo Fernández por sus valiosos aportes en la realización de este proyecto. Quiero agradecer especialmente a Diana Millán por su tiempo y voluntad para compartir conmigo sus conocimientos y a Ronald Jiménez por su paciencia y entrenamiento.

Al profesor Benjamín Rojano, Director del Laboratorio Ciencias de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Verónica Villacorta y Felipe Alzate por su colaboración.

Al posgrado en Microbiología, muy especialmente a Socorrito por toda su colaboración y cariño.

¡Muchas Gracias a Todos!

## Resumen

En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios presentes en dos extractos, oleoso e hidroglicólico, de flores de *Calendula officinalis* liberados de forma controlada por soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno desarrollados mediante ingeniería de tejidos, con el fin determinar su posible aplicación en heridas cutáneas crónicas con elevadas concentraciones de especies reactivas de oxígeno. Se realizaron pruebas de citotoxicidad *in vitro* siguiendo la norma ISO 10993-5 y la USP 36 (87) para establecer la concentración a la cual los extractos podían ser asociados a los soportes. Para determinar el contenido de compuestos fenólicos se empleó el método Folin-Ciocalteu y para evaluar la actividad antioxidante se emplearon los métodos ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) y FRAP (Ferric reducing antioxidant power). A través de las pruebas de citotoxicidad se determinó que concentraciones menores o iguales al 1% v/v y 10% v/v, para extracto hidroglicólico y oleoso respectivamente no son citotóxicas. El mayor contenido de compuestos fenólicos se encontró en el extracto hidroglicólico y la mayor actividad antioxidante en el extracto oleoso, lo cual sugiere que la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios presentes en el extracto oleoso podría ser atribuida a compuestos no fenólicos o a interacciones antagonistas o sinérgicas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos. En conjunto, estos resultados sugieren que el sistema constituido por el soporte de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociado al extracto oleoso, representa una alternativa terapéutica dirigida a modular el estrés oxidativo generado en una herida crónica y por lo tanto a mejorar el proceso de cierre de una herida.

**Palabras clave:** Soporte de Colágeno, *Calendula officinalis*, actividad antioxidante, citotoxicidad, cicatrización de heridas.

## Abstract

In this work tissue engineering scaffolds modified as a control release systems compose of gelatin-collagen microparticle-loaded collagen type I scaffolds were associated to hydroglycolic and oil extracts of *Calendula officinalis* to improve its bioactivity. The cytotoxicity and antioxidant activity was evaluated. To establish the concentration at which the extracts could be associated with the collagen type I scaffolds and to assay the biocompatibility of the collagen scaffold associated with each extracts, the *in vitro* cytotoxicity of each extracts and their association to the scaffold was evaluated according to ISO 10993-5 and USP 36. The total phenolic content was determined by the Follin Ciocalteu method and the antioxidant capacity was detected by FRAP (Ferric reducing antioxidant power) and ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) methods. Through cytotoxicity assays it was concluded that concentrations less than or equal to 1% v/v and 10% v/v, for hydroglycolic and oil extracts respectively are not cytotoxic. The higher content of phenolic compounds was found in the hydroglycolic extract and the highest antioxidant activity assessed through the FRAP and ORAC method was found in the oil extract, suggesting that the antioxidant capacity of secondary metabolites in the oil extract of *Calendula officinalis* flowers could be attributed to compounds different to polyphenols. Overall, the results suggest that this type of product can be used as an alternative therapy aimed at reducing oxidative stress characteristic of chronic wounds and therefore improve the process of wound healing.

**Keywords:** Collagen scaffolds, *Calendula officinalis*, antioxidant activity, cytotoxicity, wound healing.

# Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen .....	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas .....	XIV
Introducción .....	1
<b>1. Marco Teórico.....</b>	<b>3</b>
1.1 Características generales de la piel .....	3
1.2 Proceso de cierre de heridas .....	4
1.2.1 Hemostasia .....	4
1.2.2 Inflamación.....	4
1.2.3 Proliferación .....	4
1.2.4 Remodelación .....	5
1.3 Especies Reactivas de Oxígeno .....	5
1.3.1 Papel de las ERO en el cierre de heridas.....	6
1.3.2 Sistema de defensa antioxidante .....	7
1.4 <i>Calendula officinalis</i> (Asteraceae).....	8
1.5 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	9
1.6 Ingeniería de Tejidos .....	10
1.6.1 Soportes de Colágeno.....	11
1.6.2 Sustitutos cutáneos desarrollados mediante Ingeniería de Tejidos .....	11
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo general.....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3. Métodos .....</b>	<b>17</b>
3.1 Extractos de <i>Calendula officinalis</i> .....	17
3.2 Cultivo celular .....	17
3.3 Establecimiento de un método para la extracción de compuestos del extracto oleoso. ....	17
3.4 Ensayos de citotoxicidad de los extractos.....	18
3.5 Ensayos de citotoxicidad de los soportes de colágeno tipo I asociados a los extractos .....	19
3.5.1 Asociación de los extractos a los soportes.....	19
3.5.2 Ensayo de citotoxicidad.....	20

---

3.6	Actividad antioxidante de los metabolitos liberados por los soportes de colágeno .....	20
3.6.1	Sistema de liberación .....	20
3.6.2	Determinación de fenoles totales .....	21
3.6.3	Método FRAP .....	21
3.6.4	Método ORAC.....	21
3.7	Análisis estadístico .....	22
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>23</b>
4.1	Estandarización de un método para la extracción de compuestos del extracto oleoso. ....	23
4.2	Citotoxicidad celular inducida por los extractos de <i>Calendula officinalis</i> .....	23
4.3	Citotoxicidad celular inducida por los soportes de colágeno asociados a los extractos de <i>Calendula officinalis</i> .....	25
4.4	Evaluación de la Actividad Antioxidante.....	28
4.4.1	Determinación de Fenoles Totales .....	28
4.4.2	Método FRAP .....	29
4.4.3	Método ORAC.....	29
<b>5.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>36</b>
6.1	Conclusiones .....	36
6.2	Recomendaciones.....	36
<b>A.</b>	<b>Anexo: Ficha técnica extracto comercial hidroglicólico de <i>C. officinalis</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Ficha técnica extracto comercial oleoso de <i>C.officinalis</i>.....</b>	<b>45</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>49</b>

## Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
<b>Figura 1-1:</b> Estructura de la piel.....	3
<b>Figura 1-2:</b> Flor de <i>Calendula officinalis</i> .....	9
<b>Figura 4-1:</b> Porcentajes de viabilidad Celular.....	24
<b>Figura 4-2:</b> Reactividad Biológica (USP<36>).....	25
<b>Figura 4-3:</b> Porcentajes de viabilidad celular. ....	26
<b>Figura 4-4:</b> Reactividad Biológica (USP<36>).....	27
<b>Figura 4-5:</b> Determinación de Fenoles Totales.. ....	28
<b>Figura 4-6:</b> Actividad antioxidante evaluada a través del método FRAP. ....	29
<b>Figura 4-7:</b> Actividad antioxidante evaluada a través del método ORAC. ....	30

## Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
<b>Tabla 1-1:</b> Principales Especies Reactivas de Oxígeno .....	5
<b>Tabla 1-2:</b> Sistema de defensa antioxidante .....	7
<b>Tabla 1-3:</b> Algunos sustitutos cutáneos comercialmente disponibles .....	12
<b>Tabla 3-1:</b> Grados de Reactividad en la prueba de Elución.....	19



## Introducción

Durante el metabolismo celular se generan moléculas altamente reactivas conocidas como Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (*Maldonado et al., 2010*), las cuales también pueden ser formadas como resultado de la exposición a contaminantes ambientales físicos y químicos (*Bickers & Athar, 2006*). En concentraciones fisiológicas normales, las ERO juegan un papel importante en la regulación de las funciones celulares. Sin embargo, la producción excesiva de estas moléculas o el déficit en el sistema de defensa antioxidante, condición conocida como estrés oxidativo, puede causar serios daños a nivel celular dando paso a diversas condiciones patológicas (*Dröge, 2002; Valko et al., 2007*). En heridas crónicas, presentes con mayor incidencia en adultos mayores y pacientes diabéticos, el estrés oxidativo induce y mantiene la fase inflamatoria desfavoreciendo el proceso de cicatrización (*Soneja et al., 2005*).

Las flores de la *Calendula officinalis* han sido empleadas tradicionalmente alrededor del mundo para tratar diversas afecciones de la piel. Sus propiedades farmacológicas han sido atribuidas a una variedad de metabolitos secundarios con actividad antioxidante (*Butnariu & Coradini, 2012; Četković et al., 2004; Preethi et al., 2006*). En Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), acepta su aplicación tópica como anti-inflamatorio y cicatrizante; así como, su administración oral como anti-inflamatorio.

Nuestro grupo de trabajo en ingeniería de tejidos, ha desarrollado soportes de colágeno tipo I que al ser usados como injertos en heridas cutáneas y de mucosa oral de espesor parcial mejoran la cicatrización. Recientemente, el método establecido por el grupo para elaborar estos soportes fue modificado mediante la incorporación de micropartículas hechas de gelatina-colágeno con el fin de potenciar sus características regenerativas. El sistema constituido por el soporte de colágeno tipo I y las micropartículas de gelatina-colágeno, puede ser asociado a extractos vegetales con propiedades farmacológicas y

liberarlos en las lesiones en las que se aplique. En el trabajo mencionado se demostró que este sistema libera de manera controlada un extracto hidroglicólico de flores de caléndula, asegurando su presencia en el medio por lo menos durante dos semanas (*Jiménez, 2013; Jiménez et al., 2015*). Por otra parte, su eficacia como sustituto artificial fue evaluada en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas agudas de espesor total, donde se evidenció que el soporte de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociado al extracto hidroglicólico no se integró al lecho de la herida y tuvo una tasa de degradación lenta (*Millán, 2014*).

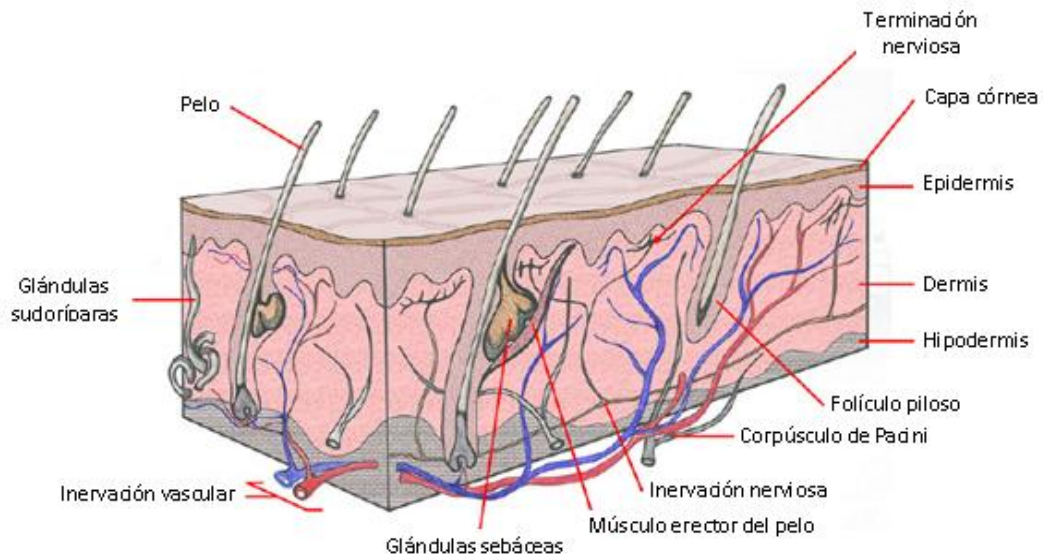
Debido a los efectos deletéreos de las ERO y al agotamiento de antioxidantes de bajo peso molecular, principalmente en heridas crónicas en las que se ha reportado que el estrés oxidativo impide su cierre (*Eming et al., 2007; Moseley et al., 2004; Schafer & Werner, 2008*), es importante evaluar la capacidad antioxidante de extractos vegetales asociados y liberados por los soportes de colágeno tipo I, ya que éste tipo de productos podría representar una alternativa terapéutica dirigida a reducir el estrés oxidativo y por lo tanto a mejorar el proceso de cierre de una herida crónica.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antioxidante de extractos, hidroglicólico y oleoso, de flores de *Calendula officinalis* asociados a soportes de colágeno tipo I. Para tal fin, se llevaron a cabo pruebas *in vitro* de citotoxicidad para establecer la concentración a la cual cada uno de los extractos podía ser asociado a los soportes de colágeno tipo I. Posteriormente, se evaluó *in vitro* la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno.

# 1.Marco Teórico

## 1.1 Características generales de la piel

La piel es un órgano compuesto por dos capas, la epidermis y la dermis. La epidermis es un epitelio estratificado compuesto principalmente por queratinocitos, encargados de la síntesis de queratina, que proliferan en el estrato basal y migran hacia el estrato córneo donde mueren y se descaman continuamente. La dermis subyacente, que interdigita con las crestas epiteliales de la epidermis, es un tejido conjuntivo que proporciona soporte, elasticidad y vascularidad a la piel. Está compuesta por una capa profunda o reticular y por una capa superficial o papilar. Los fibroblastos son el principal tipo celular encontrado en la dermis encargados de la síntesis de colágeno, principalmente colágeno tipo I, y elastina (**Figura 1-1**) (Venus et al., 2011).



**Figura 1-1:** Estructura de la piel. Tomado y modificado de: (Catalano et al., 2013).

La piel actúa como un sistema de defensa contra microorganismos invasores y contaminantes ambientales físicos y químicos, actúa como una barrera de permeabilidad selectiva y como órgano sensorial (Lee et al., 2006). Por lo tanto, la pérdida de la

integridad estructural de la piel implica una alteración de la homeostasis que puede conducir a un estado patológico crítico o incluso a la muerte (*Kamolz et al., 2008*).

## **1.2 Proceso de cierre de heridas**

El proceso de cierre de heridas comprende cuatro fases: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación, que se traslapan en el tiempo y que involucran diversas moléculas y tipos celulares (*Enoch & Leaper, 2008*).

### **1.2.1 Hemostasia**

La pérdida de continuidad de la piel, da inicio a la adición y agregación plaquetaria que resulta en la conversión de fibrinógeno a fibrina y en la subsecuente formación del coágulo que evita la pérdida de sangre e inicia el proceso de cierre de la herida. Este coágulo proporciona una matriz provisional para la migración celular (*Enoch & Leaper, 2008; Gurtner et al., 2008; Reinke & Sorg, 2012*).

### **1.2.2 Inflamación**

La fase inflamatoria da paso a la infiltración en la herida de células del sistema inmune encargadas principalmente de minimizar la contaminación bacteriana a través de enzimas de degradación y de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), además de sintetizar factores de crecimiento responsables de la proliferación celular (*Enoch & Leaper, 2008; Gurtner et al., 2008; Reinke & Sorg, 2012*).

### **1.2.3 Proliferación**

En esta fase se forman nuevos vasos sanguíneos y los fibroblastos sintetizan los componentes necesarios para el desarrollo de la nueva matriz extracelular. Esta nueva matriz, de gran importancia en el proceso de reparación, proporciona un sustrato para la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Los queratinocitos migran desde el borde de la herida, proliferan y se diferencian restableciendo así el epitelio estratificado. Finalmente, algunos fibroblastos son diferenciados a miofibroblastos con el fin de unir los bordes de la herida (*Enoch & Leaper, 2008; Gurtner et al., 2008; Reinke & Sorg, 2012*).

### 1.2.4 Remodelación

En esta etapa, la matriz extracelular es remodelada constantemente a través de la síntesis y degradación del colágeno. El colágeno tipo III sintetizado durante la fase proliferativa es reemplazado por colágeno tipo I, dando paso a una cicatriz avascular y acelular en donde se han perdido las características estructurales y funcionales del tejido original (Enoch & Leaper, 2008; Gurtner et al., 2008; Reinke & Sorg, 2012).

## 1.3 Especies Reactivas de Oxígeno

Aunque el oxígeno ( $O_2$ ) es considerado sinónimo de vida, es a su vez capaz de ejercer efectos nocivos en las células debido a la formación de moléculas altamente reactivas, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO) (**Tabla 1-1**), capaces de alterar el estado redox celular. Estas moléculas son generadas como producto del metabolismo celular y por fuentes externas como el tabaco, la contaminación ambiental, la radiación UV y algunos medicamentos, entre otros (Astiz, 2009; Devasagayam et al., 2004; Pham-Huy et al., 2008; Ugartondo, 2009).

**Tabla 1-1:** Principales Especies Reactivas de Oxígeno

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	
RADICALES LIBRES	COMPUESTOS NO RADICALES
Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Peróxido ( $O_2^{-2}$ )	Oxígeno Singulete ( $^1O_2$ )
Perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ )	Ozono ( $O_3$ )
Hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )	Acido Hipocloroso ( $HClO$ )
Peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ )	Nitrosonium ( $NO^+$ )
Alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ )	Nitroxilo ( $NO^{\cdot}$ )
Oxido Nítrico ( $NO^{\cdot}$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ )
Dióxido de Nitrógeno ( $NO_2^{\cdot}$ )	Trióxido de Nitrógeno ( $N_2O_3$ )

(Devasagayam et al., 2004; Lozada & García, 2009; Ugartondo, 2009)

En concentraciones fisiológicas normales, las ERO juegan un rol importante en la regulación de las funciones celulares. Sin embargo, una producción excesiva de estas moléculas o un déficit en el sistema de defensa antioxidante, condición conocida como estrés oxidativo, puede causar serios daños a nivel celular (*Dröge, 2002; Valko et al., 2007*). La magnitud del daño ocasionado por las ERO está determinada por su grado de reactividad, selectividad y difusibilidad (*Maldonado et al., 2010*). Las proteínas pueden sufrir cambios conformacionales, alteración de los residuos aminoacídicos, degradación e inactivación. En el ADN pueden presentarse modificaciones en las bases nitrogenadas, roturas en la cadena y alteraciones en los sistemas de reparación. Por su parte, los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares sufren peroxidación lipídica (*Kalyanaraman, 2013*).

### **1.3.1 Papel de las ERO en el cierre de heridas**

Durante el proceso de cicatrización, neutrófilos, macrófagos y otros tipos celulares producen ERO en el lecho de la herida, que actúan contra microorganismos invasores y regulan diversas vías de señalización celular necesarias para que ocurra el cierre de la herida. Sin embargo, elevadas concentraciones de estas moléculas afectan de forma negativa el proceso de cicatrización (*Auf dem keller et al., 2006; Bickers & Athar, 2006; Roy et al., 2006; Sen & Roy, 2008; Sen, 2003*).

El estrés oxidativo ha sido relacionado con la patogénesis de heridas crónicas, caracterizadas por no cicatrizar, donde la fase inflamatoria persiste al igual que la liberación de ERO prolongando así el daño al tejido y desfavoreciendo el proceso de cicatrización (*Eming et al., 2007; James et al., 2003; Schafer & Werner, 2008; Wlaschek & Scharffetter-Kochanek, 2005*). Además, esta sobreproducción de ERO conduce a la inactivación de antioxidantes enzimáticos y al agotamiento de antioxidantes de bajo peso molecular (*Moseley et al., 2004; Soneja et al., 2005*). Por otra parte, la piel es especialmente vulnerable al ataque de las ERO ya que es rica en ácidos grasos insaturados y se encuentra expuesta a altas tensiones de oxígeno y a la luz ultravioleta (*Trenam et al., 1992*).

### 1.3.2 Sistema de defensa antioxidante

Halliwell definió “antioxidante” como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana” (Halliwell, 2007). Para proteger las estructuras celulares del daño inducido por las ERO, los organismos aerobios han desarrollado un sistema de defensa antioxidante capaz de prevenir o eliminar el daño oxidativo de las biomoléculas. Estos sistemas de defensa pueden ser clasificados como antioxidantes endógenos, enzimáticos y no enzimáticos, y antioxidantes exógenos. En la **Tabla 1-2**, se muestra un resumen de los mismos.

**Tabla 1-2:** Sistema de defensa antioxidante

SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	
ORIGEN	FUNCIÓN
<b>Endógenos enzimáticos</b>	
Superóxido Dismutasa (SOD)	Cataliza la conversión del $O_2^{\cdot -}$ a $H_2O_2$ .
Catalasa (CAT)	Descompone el $H_2O_2$ en $H_2O$ y $O_2$ .
Glutación peroxidasa (GPx)	Cataliza la reducción del $H_2O_2$ a $H_2O$ a través de la oxidación del glutación (GSH).
<b>Endógenos no enzimáticos</b>	
Transferrina	Quelación de metales de transición.
Ceruloplasmina	Quelación de metales de transición.
Haptoglobina	Quelación de metales de transición.
metalotioneínas	Quelación de metales de transición.
Albúmina	Quelación de metales de transición.
Glutación (GSH)	Detoxifica $H_2O_2$ . Quelación de iones Cu.
Bilirrubina	Neutralizar $ROO^{\cdot}$ y $^1O_2$
Ácido lipoico	Neutralizar $RO_2^{\cdot}$ , $HOCl$ , $OH^{\cdot}$ , $ONOOH$ , $O_2^{\cdot -}$ y $^1O_2$ . Secuestrar Fe y Cu. Recuperar GSH, $\alpha$ -tocoferol y el ascorbato.
Ubiquinol	Neutralizar $RO_2^{\cdot}$ e inhibir la peroxidación lipídica. Regenerar $\alpha$ -tocoferol.
Ácido úrico	Neutralizar $RO_2^{\cdot}$ , $OH^{\cdot}$ , $^1O_2$ , $O_3$ y $NO_2^{\cdot}$ . Proteger a las proteínas de $ONOO^{\cdot}$ y quelar iones metálicos.

**Tabla 1-2:** (Continuación)

SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	
ORIGEN	FUNCIÓN
<b>Exógenos</b>	
Ácido ascórbico	Scavenger de radicales $O_2^{\cdot-}$ , $HO_2^{\cdot}$ , $OH^{\cdot}$ , $RO_2^{\cdot}$ y $HClO$ . Regenera $\alpha$ -tocoferol.
$\alpha$ -Tocoferol	Scavenger de radicales $ROO^{\cdot}$
Carotenoides	Inactivar $^1O_2$ .
Polifenoles	Inhibir la peroxidación lipídica. Quelar metales. Neutralizar $O_2^{\cdot-}$ , $OH^{\cdot}$ , $ONOOH$ y $HOCI$ .

(Devasagayam et al., 2004; Lozada & García, 2009)

## 1.4 *Calendula officinalis* (Asteraceae)

La *Calendula officinalis* es una especie herbácea anual, nativa de los países mediterráneos (Arora et al., 2013) (Figura 1-2). Durante décadas, sus flores han sido empleadas alrededor del mundo para tratar diversas condiciones clínicas, principalmente patologías relacionadas con la piel, gracias al contenido de metabolitos secundarios bioactivos con propiedades farmacológicas (Leach, 2008; Muley et al., 2009). Diversos extractos de flores de *Calendula officinalis* han demostrado poseer actividad anti-tumoral e inmunomoduladora (Amirghofran et al., 2000; Medina et al., 2006), angiogénica (Parente et al., 2011), anti-inflamatoria y cicatrizante (Fronza et al., 2009; Parente et al., 2012; Preethi et al., 2009; Tabatabai-Naeini et al., 2010). Además, se ha reportado que la aplicación tópica de diferentes formulaciones de *Calendula officinalis* previene el daño oxidativo en la piel generado por las radiaciones ultravioleta (Fonseca et al., 2011; Mishra et al., 2012).

Extractos de diferente polaridad de las flores de *Calendula officinalis* también han demostrado propiedades antioxidantes (Braga et al., 2009; Cordova et al., 2002; Preethi et al., 2006) que pueden estar relacionadas con los efectos benéficos anteriormente mencionados (Butnariu & Coradini, 2012; Četković et al., 2004; Cordova et al., 2002). Hasta el momento, los principales metabolitos secundarios relacionados con esta propiedad han sido los ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides (Butnariu & Coradini, 2012; Khalid & Teixeira da Silva, 2012).



**Figura 1-2:** Flor de *Calendula officinalis*. Tomado de [http://zadenier.nl/en\\_GB/a-29137482/herb-seeds/marigold-seeds-radio-orange-calendula-officinalis/](http://zadenier.nl/en_GB/a-29137482/herb-seeds/marigold-seeds-radio-orange-calendula-officinalis/)

## 1.5 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

Debido al creciente interés por las sustancias fitoquímicas con actividad antioxidante, varios métodos han sido desarrollados para evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante de diferentes compuestos (Prior, 2014). Los principales métodos de evaluación han sido clasificados en dos categorías de acuerdo a la reacción química involucrada: Ensayos basados en la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la reacción de transferencia de electrones (SET). Dentro de la primera clasificación se encuentran los métodos ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total radical trapping antioxidant parameter), TOSC (total oxyradical scavenging capacity) y los ensayos de oxidación de LDL (low density lipoproteins), en donde el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peróxido  $\text{ROO}^\cdot$  generados por la descomposición térmica de azo compuestos. La segunda clasificación incluye los métodos Folin-Ciocalteu, TEAC (Trolox equivalence antioxidant capacity), FRAP (ferric ion reducing antioxidant power), CUPRAC (cupric reducing antioxidant power) y DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), los cuales miden la capacidad reductora del antioxidante (Huang et al., 2005; Prior, 2014).

## 1.6 Ingeniería de Tejidos

La Ingeniería de tejidos es una disciplina que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida con el fin de desarrollar sustitutos biológicos que mantengan, mejoren o restauren la función de tejidos y órganos que se han dañado o perdido como consecuencia de procesos patológicos u otros (*Langer & Vacanti, 1993*). Los productos de ingeniería de tejidos pueden incluir uno o más de los siguientes componentes: células, soportes tridimensionales elaborados con compuestos de origen natural o sintético, y factores bioactivos que potencian la respuesta celular (*Vacanti & Langer, 1999*). Los soportes sembrados o no con células son degradados y recambiados por las células que contiene o por aquellas que migran desde los bordes de la herida hacia ellos, con el fin de generar nuevo tejido (*Stock & Vacanti, 2001*).

La aplicación de los diferentes tipos de productos de ingeniería de tejidos depende del tejido que se quiere intervenir y del tipo de lesión. En pérdidas grandes de continuidad de la piel es mejor aplicar sustitutos que contengan células para que los factores que secretan estimulen la migración, adhesión y proliferación de células endógenas localizadas en los bordes de la herida que estimulan el recambio del sustituto por tejido nuevo (*Wong et al., 2007*). No obstante, la aplicación de soportes acelulares también ha dado buenos resultados clínicos. De hecho, el primer sustituto de piel aprobado para uso humano por la Agencia de Control de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) fue Integra®, un soporte hecho de colágeno tipo I y glicosaminoglicanos (col-gag) cubierto con silicona que se aplica directamente después de desbridar la herida. Una vez se ha colocado en la zona que se quiere tratar, el soporte del col-gag es poblado por células endógenas que se encargan de recambiarlo por matriz extracelular sintetizada de novo (*Zhang, 2012*). Sin embargo, los sustitutos de piel desarrollados mediante ingeniería de tejidos, como Integra®, son de difícil acceso en nuestro país debido a sus altos costos.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado soportes de colágeno tipo I de origen bovino. Estos han sido empleados, solos o sembrados con fibroblastos, como injertos en heridas de espesor parcial en modelos animales de heridas de mucosa y piel; los cuales, han mostrado que utilizar soportes sembrados con células es lo que más favorece la formación de nuevo tejido funcional. Por otra parte, los datos también han revelado que

con relación al cierre por segunda intención la calidad de la cicatrización mejora cuando se emplean soportes sin células (*Espinosa et al., 2010*). Por consiguiente el grupo está interesado en potenciar el poder regenerador demostrado por estos soportes, asociándolos a extractos vegetales empleados en la medicina tradicional para el tratamiento de heridas.

En el trabajo más reciente de nuestro grupo de investigación, los soportes de colágeno tipo I fueron modificados a través de la incorporación de micropartículas hechas de gelatina-colágeno que permiten la liberación controlada de extractos de *Calendula officinalis*, sin afectar significativamente la microestructura del soporte. Este sistema fue desarrollado para su posible aplicación en heridas cutáneas crónicas con sobreproducción de Especies Reactivas de Oxígeno, que afectan de manera negativa el proceso de cicatrización de heridas.

### **1.6.1 Soportes de Colágeno**

La familia de proteínas del colágeno, es la más abundante de la matriz extracelular de los tejidos de los mamíferos. Hasta el momento se han identificado 29 tipos diferentes de colágeno. Sin embargo, de ellos el colágeno tipo I es el más empleado en el campo de la ingeniería de tejidos debido a que es la proteína más abundante de la dermis y del tejido submucoso. Su popularidad como biomaterial es atribuida a su conservación entre especies, baja inmunogenicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, características necesarias para restaurar la estructura y función de los tejidos; también, debido a que los productos de su degradación son quimiotácticos (*Parenteau-Bareil et al., 2010*). Datos provenientes de diferentes estudios preclínicos y clínicos indican que soportes de colágeno tipo I, solos o como parte de un sustituto celular, son bioactivos y pueden mejorar la cicatrización promoviendo la formación de tejido funcional en piel, mucosa y hueso, entre otros (*Aigner & Stove, 2003; Buma et al., 2007; Dumitrescu, 2011; Rastogi et al., 2009; Wangensteen & Kalliainen, 2010; Yannas et al., 2010*).

### **1.6.2 Sustitutos cutáneos desarrollados mediante Ingeniería de Tejidos**

Los sustitutos cutáneos constituyen una fuente alternativa de tejido para injerto, ya que evitan efectos adversos (morbilidad del sitio donante, rechazo y riesgo de infección) de

los injertos de tejido natural (auto, alo y xenoinjertos). Debido a la importancia y demanda de sustitutos cutáneos, en la actualidad existe un gran número de productos comercialmente disponibles o en proceso de investigación. Algunos de estos productos sirven para reemplazar el epitelio; otros, para sustituir la dermis y otros, para reemplazar la dermis y la epidermis. Los reemplazos del epitelio más empleados han sido láminas de queratinocitos cultivados *in vitro*; sin embargo, recientemente se ha popularizado el uso de un aerosol celular (Zweifel *et al.*, 2008) con el que se asperjan queratinocitos sobre heridas que han sido pre-cubiertas con dermis (artificial o natural). Como sustitutos de la dermis se utilizan soportes o matrices de diferentes biomateriales, comúnmente colágeno tipo I solo o asociado a otros compuestos, sembrados o no con fibroblastos. También existen sustitutos bicapa o dermo-epidérmicos; los cuales, también pueden contener o no células. En la **Tabla 1-3** se muestran algunos productos registrados para uso humano, así como su composición.

**Tabla 1-3:** Algunos sustitutos cutáneos comercialmente disponibles

<b>SUSTITUTOS CUTÁNEOS COMERCIALMENTE DISPONIBLES</b>	
<b>PRODUCTO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>Sustitutos Dermo-Epidérmicos</b>	
<i>Apligraf®</i>	Fibroblastos y queratinocitos de prepucio de neonato sembrados sobre una matriz de colágeno bovino tipo I
<i>TissueTech Autograft System®</i>	Fibroblastos y queratinocitos autólogos sembrados sobre membranas de ácido hialurónico
<b>Sustitutos Epidérmicos</b>	
<i>Epicel®</i>	Láminas de queratinocitos autólogos cultivados
<i>MySkin®</i>	Cultivo de queratinocitos autólogos sembrados sobre un soporte de silicona.
<i>Laserskin®</i>	Queratinocitos autólogos cultivados sobre una membrana de ácido hialurónico.
<i>Bioseed-S®</i>	Cultivo de queratinocitos autólogos sembrados sobre un gel de fibrina
<b>Sustitutos Dérmicos</b>	
<i>AlloDerm®, GraftJacket®</i>	Dermis acelular alogénica de origen humano

**Tabla 1-3:** (Continuación)

<b>SUSTITUTOS CUTÁNEOS COMERCIALMENTE DISPONIBLES</b>	
<b>PRODUCTO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<i>Matriderm®</i>	Dermis acelular de colágeno bovino recubierta con un hidrolizado de $\alpha$ -elastina
<i>OASIS®</i>	Submucosa de intestino delgado de porcino descelularizada
<i>Integra®</i>	Matriz de colágeno bovino tipo I y glicosaminoglicanos de tiburón recubierta por una membrana de silicona temporal
<i>Biobrane®, Biobrane-L®, TransCyte®</i>	Membranas de silicona unidas a nailon y colágeno porcino. <i>TransCyte®</i> incorpora fibroblastos de prepucio de neonato
<i>Dermagraft®</i>	Fibroblastos de prepucio de neonato sembrados en una membrana de ácido poliglicólico/ácido poliláctico.

(Arenas et al., 2012; Bottcher-Haberzeth et al., 2010; Foley et al., 2013; Hata, 2007; Kamolz et al., 2008; Shevchenko et al., 2010; Wong et al., 2007; Zhang & Michniak-Kohn, 2012).



## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante de extractos de la flor de *Calendula officinalis* asociados a soportes de colágeno tipo I.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar *in vitro* la citotoxicidad de un extracto hidroglicólico y de un extracto oleoso de *Calendula officinalis*.
2. Evaluar *in vitro* la citotoxicidad de soportes de colágeno tipo I asociados a extractos hidroglicólico y oleoso de *Calendula officinalis*.
3. Evaluar *in vitro* la actividad antioxidante de los metabolitos liberados por los soportes de Colágeno tipo I asociados a los extractos de caléndula.



## **3. Métodos**

### **3.1 Extractos de *Calendula officinalis***

Los extractos comerciales hidroglicólico (Neyber Ltda) y oleoso (Phitother Laboratorios) de *Calendula officinalis* fueron filtrados empleando una membrana de 0,2 µm y almacenados a 4°C. Las características de los extractos, proceso de producción y control de calidad se incluyen en los Anexo 1 y 2.

### **3.2 Cultivo celular**

Para los ensayos de citotoxicidad se empleó la línea celular de fibroblastos L929 (NCTC clone 929, American Type Culture Collection (ATCC) número: CCL-1™). Esta línea celular se mantuvo en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, (Gibco®), penicilina (100UI/mL), estreptomycin (100µg/mL)(Gibco®), anfotericina B (0,5µg/mL) (Gibco®), vitaminas 1X (Gibco®) y piruvato de sodio 1X (Gibco®). Los cultivos fueron mantenidos en atmósfera de aire 95% y CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C, con cambio de medio cada tercer día.

### **3.3 Establecimiento de un método para la extracción de compuestos del extracto oleoso.**

Para realizar los ensayos de citotoxicidad del extracto oleoso de flores de *C. officinalis*, era necesario diluirlo empleando el medio de cultivo como solvente. Sin embargo, las diferencias de polaridad impidieron su dilución. Por tal razón, fue necesario extraer los compuestos presentes en el extracto oleoso, adaptando lo establecido en la Norma ISO 10993-5: vehículo de extracción. En consecuencia, en éste trabajo se hicieron diferentes diluciones del extracto oleoso (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%), empleando DMEM suplementado con 10% de SFB, se agitaron mediante Vortex por 5 minutos y se

incubaron a 37°C durante 24 h. Después de este tiempo, la fase acuosa fue separada por centrifugación a 3577 g durante 1h y empleada en los ensayos de citotoxicidad.

### 3.4 Ensayos de citotoxicidad de los extractos

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos oleoso e hidroglicólico de *Calendula officinalis*, se siguió la norma ISO 10993-5: Evaluación biológica de dispositivos médicos, parte 5: pruebas de citotoxicidad *in vitro*. El procedimiento se realizó por triplicado con 3 replicas, de la siguiente manera:

#### Día 1.

Se preparó una suspensión celular de  $1 \times 10^5$  células/mL en medio de cultivo y se agregaron 100µL de la suspensión en cada pozo de una placa de cultivo de 96 pozos. Las células fueron incubadas por 24 horas (5% CO<sub>2</sub>, 37°C y humedad >90%) asegurando su adherencia y progresión hacia la fase de crecimiento exponencial. Cada pozo fue observado bajo un microscopio de luz invertida para comprobar la adhesión de las células a la superficie de la placa.

#### Día 2.

Después de 24 horas de incubación, el medio de cultivo fue removido de los pozos y en su lugar se agregaron 100µL de diferentes concentraciones del extracto oleoso (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% oleoso) e hidroglicólico (0, 0,2%, 0,5%, 1%, 1,2%, 1,5%, 2%, 3%), un control negativo (silicona 0,2g/mL), un control positivo (DMSO 25%) y un blanco (DMEM). Las células fueron incubadas por 24 horas (5% CO<sub>2</sub>, 37°C y humedad >90%).

#### Día 3.

El contenido de cada pozo fue removido y la viabilidad celular determinada mediante la reducción de 50µL/pozo de la solución MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol) por las células metabólicamente activas. Después de 2 horas de incubación (5% CO<sub>2</sub>, 37°C y humedad >90%), el formazán precipitado fue solubilizado con 100µL de DMSO y la absorbancia leída a una longitud de onda de 570nm. El porcentaje de viabilidad fue determinado mediante la siguiente ecuación (1):

$$Viabilidad (\%) = \frac{100 \times DO(a)}{DO(b)} \quad (1)$$

Donde,

**DO(a):** Es la densidad óptica  $_{570nm}$  de las muestras

**DO(b):** Es la densidad óptica  $_{570nm}$  del blanco (DMEM)

Adicionalmente, cada pozo fue observado mediante microscopia de luz con el fin de clasificar las alteraciones morfológicas presentadas por las células tratadas, siguiendo los protocolos establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos, USP 36 capítulo 87: Pruebas de reactividad biológica, *in vitro* (**Tabla 3-1**).

**Tabla 3-1:** Grados de Reactividad en la prueba de Elución.

Grado	Reactividad	Condiciones de los cultivos
0	Ninguna	Gránulos intracitoplasmáticos diferenciados sin lisis celular
1	Escasa	No más del 20% de las células son redondas, levemente adheridas, sin gránulos intracitoplasmáticos; hay células lisadas.
2	Leve	No más del 50% de las células son redondas, y desprovistas de gránulos intracitoplasmáticos; no hay lisis celular extensiva y áreas vacías entre células.
3	Moderada	No más del 70% de las capas celulares contienen células redondas o lisadas.
4	Grave	Destrucción casi total de las capas celulares.

## 3.5 Ensayos de citotoxicidad de los soportes de colágeno tipo I asociados a los extractos

### 3.5.1 Asociación de los extractos a los soportes

Soportes de Colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno (5mg/mL) fueron elaborados siguiendo la metodología estandarizada por el grupo (Jiménez, 2013; Jiménez et al., 2015). Una vez determinada la concentración a la cual el extracto oleoso e hidroglicólico de *Calendula officinalis* podían ser empleados, fragmentos (1cm<sup>2</sup>) de

estos soportes fueron colocados en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar®, Inc) y sumergidos en 500µL de cada uno de los extractos e incubados por 2 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, los soportes impregnados fueron congelados y liofilizados por 24 horas.

### **3.5.2 Ensayo de citotoxicidad**

Después del proceso de liofilización, los soportes fueron colocados en 500µL de medio de extracción (DMEM suplementado) e incubados por 24h a 37°C (5% CO<sub>2</sub>, 37°C y humedad >90%). Transcurridas el tiempo de incubación, el medio de extracción fue retirado y su citotoxicidad evaluada usando la línea celular L929. En este ensayo fueron incluidos el soporte de colágeno sin asociar a los extractos (control negativo) y el soporte cargado al 100% con extracto oleoso e hidroglicólico (control positivo). El procedimiento se realizó por triplicado como se indica en la sección 3.3.

## **3.6 Actividad antioxidante de los metabolitos liberados por los soportes de colágeno**

### **3.6.1 Sistema de liberación**

Trabajos anteriores del grupo demostraron que los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno actúan como un sistema de liberación controlada, útil para evaluar la actividad antioxidante de extractos vegetales (*Jiménez, 2013*). Siguiendo ésta metodología, soportes de colágeno (1cm<sup>2</sup>) fueron asociados a los extractos oleoso e hidroglicólico de *Calendula officinalis* como se describió en la sección 3.5.1. Posteriormente, se colocaron en placas de 24 pozos (Costar®, Inc) con 1mL de solución buffer de acetatos (0,02M; pH 5,2) empleada como medio de liberación de los metabolitos secundarios que componen cada uno de los extractos. Las cajas se incubaron a 37°C con agitación constante (80 rpm). A las 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas se tomaron los sobrenadantes para evaluar su actividad antioxidante. El procedimiento se realizó por triplicado.

### 3.6.2 Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (*Singleton & Rossi, 1965*), con algunas modificaciones, el cual mide la reducción de este reactivo inducida por el poder reductor de los compuestos fenólicos, con la consecuente formación de un complejo azul cuya absorbancia es medida a 760nm. Para su cuantificación, se construyó una curva patrón utilizando como estándar ácido gálico. Posteriormente 50µL de extracto fueron mezclados con 425µL de agua supra- pura y 125µL del reactivo Folin. Después de 5 minutos se adicionaron 400µL de NaCO<sub>3</sub> al 20%. La absorbancia fue leída después de una hora en ausencia de luz y los resultados expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/litro de extracto.

### 3.6.3 Método FRAP

El método FRAP, evalúa la capacidad de los extractos para reducir el hierro férrico Fe(III) presente en un complejo con la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) a la forma ferrosa Fe(II), la cual produce una coloración morada que se lee a 590nm. Introduciendo modificaciones a una metodología descrita (*Benzie & Strain, 1996*), se construyó una curva patrón utilizando como estándar el ácido ascórbico. Posteriormente, 50 µL de extracto fueron mezclados con 50 µL de buffer acetato 0,3 µM a un pH de 3,6 y 900 µL del reactivo FRAP (2,5 mL de la solución TPTZ 10 µM en HCL 40 mM; 2,5 mL de FeCl<sub>3</sub> 20 µM y 25 mL de buffer acetato 0,3 µM a un pH de 3,6). La absorbancia fue leída después de media hora en ausencia de luz y los resultados expresados como miligramos (mg) equivalentes de ácido ascórbico/litro de extracto.

### 3.6.4 Método ORAC

Mediante la técnica ORAC se evaluó la capacidad del antioxidante para proteger la fluoresceína del daño oxidativo causado por los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del AAPH 2, 2'-azobis (2-aminopropano diclorhidrato). En presencia del antioxidante, el radical ROO· capta, preferiblemente, un átomo de hidrogeno del antioxidante. Por lo tanto, la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína, por acción del radical ROO·, es inhibida o disminuida. En este ensayo se utilizaron condiciones controladas de temperatura y pH (37°C; 7,4); así como, fluoresceína (0,01M) en PBS (75 mM) y AAPH 0,6 M en PBS (75mM). La solución de trabajo fue preparada

con 2929  $\mu\text{L}$  de la solución de fluoresceína, 50  $\mu\text{L}$  de AAPH y 30 $\mu\text{L}$  de extracto. El efecto protector se calculó usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, los valores obtenidos fueron expresados en micromoles ( $\mu\text{M}$ ) equivalentes de Trolox/litro de extracto de acuerdo a la siguiente ecuación (2).

$$ORAC = \frac{(AUC - AUC^0)}{(AUC_{Trolox} - AUC^0)} f[Trolox] \quad (2)$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra,  $AUC^0$  el área bajo la curva para el control,  $AUC_{Trolox}$  el área bajo la curva para el trolox y  $f$  el factor de dilución de los extractos (Romero et al., 2010).

### 3.7 Análisis estadístico

La comparación de los resultados obtenidos, a través los diferentes métodos de evaluación de la capacidad antioxidante, de los extractos oleoso e hidroglicólico de *Calendula officinalis*, fue llevada a cabo mediante un análisis de varianza (Anova) con un nivel de confianza de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

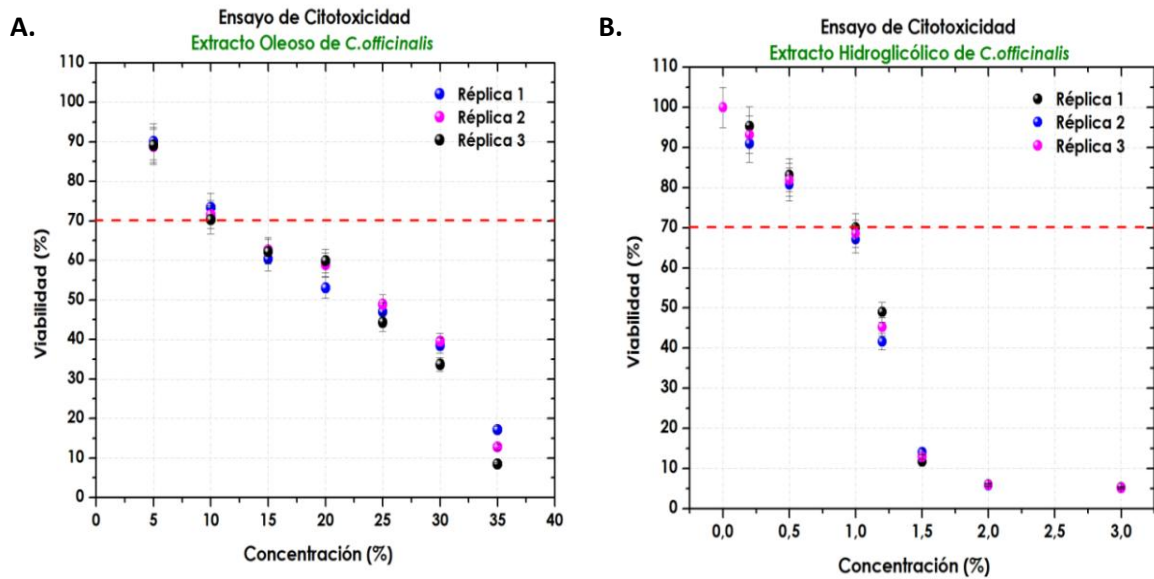
### 4.1 Estandarización de un método para la extracción de compuestos del extracto oleoso.

La revisión bibliográfica hecha sobre los procedimientos empleados para evaluar la citotoxicidad de extractos oleosos, recomendaba el uso de tensoactivos. En los primeros ensayos realizados durante ésta tesis se implementaron las metodologías descritas sin éxito ya que las concentraciones recomendadas no lograron estabilizar la emulsión. Por ésta razón, se estableció el procedimiento descrito en la sección 3.3 a través del cual se extrajeron los compuestos del extracto oleoso, empleando como vehículo de extracción DMEM suplementado con 10% de SFB.

### 4.2 Citotoxicidad inducida por los extractos de *Calendula officinalis*

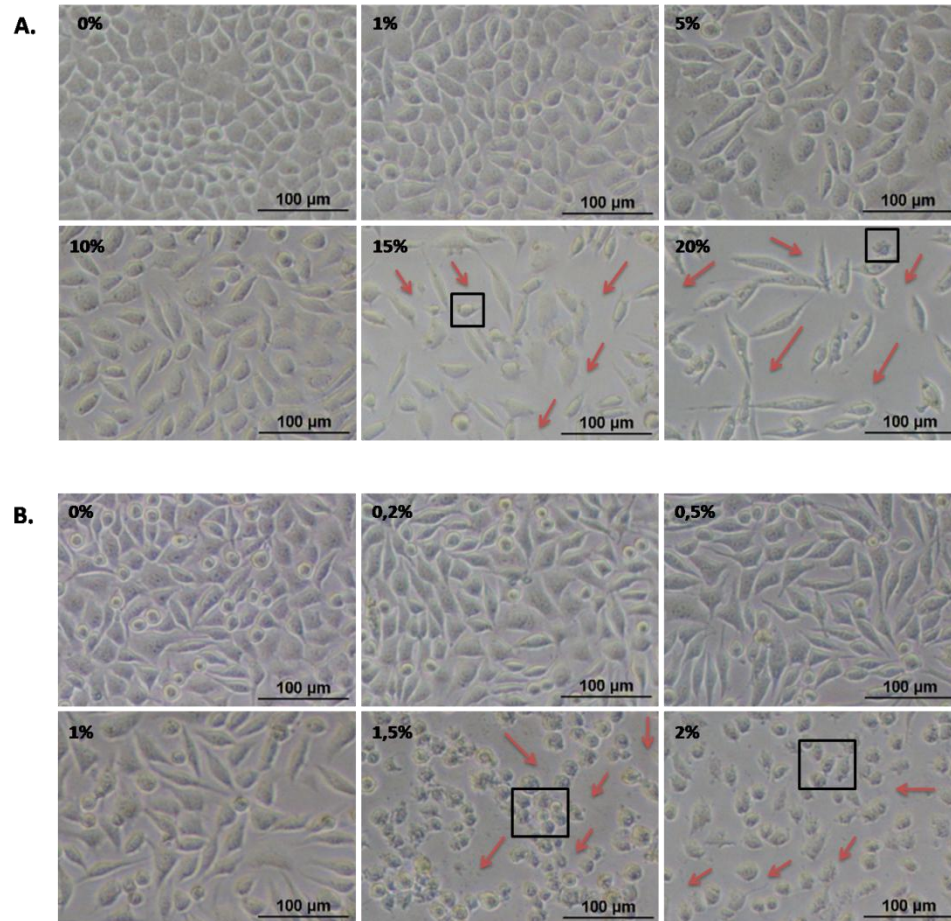
Al exponer la línea celular L929 a las diferentes concentraciones del extracto oleoso (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% oleoso) e hidroglicólico (0, 0,2%, 0,5%, 1%, 1,2%, 1,5%, 2%, 3%) de *Calendula officinalis*, se encontró que el aumento en la concentración de los extractos induce un menor porcentaje de viabilidad celular. Además de esto, se encontró que el extracto hidroglicólico es más citotóxico que el extracto oleoso.

De acuerdo con la norma ISO 10993-5 una viabilidad celular igual o superior al 70%, indica que el producto evaluado puede considerarse no-citotóxico. Por lo anterior, las concentraciones a las cuales los extractos oleoso e hidroglicólico serán empleados son del 10% v/v y 1% v/v respectivamente (**Figura 4-1**).



**Figura 4-1. Porcentajes de Viabilidad Celular.** (A) Porcentajes de viabilidad celular obtenidos al exponer la línea celular L929 a las diferentes concentraciones del extracto oleoso. (B) Porcentajes de viabilidad celular obtenidos al exponer la línea celular L929 a las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico. (-----): concentraciones a las cuales los extractos fueron empleados para su asociación a los soportes de colágeno.

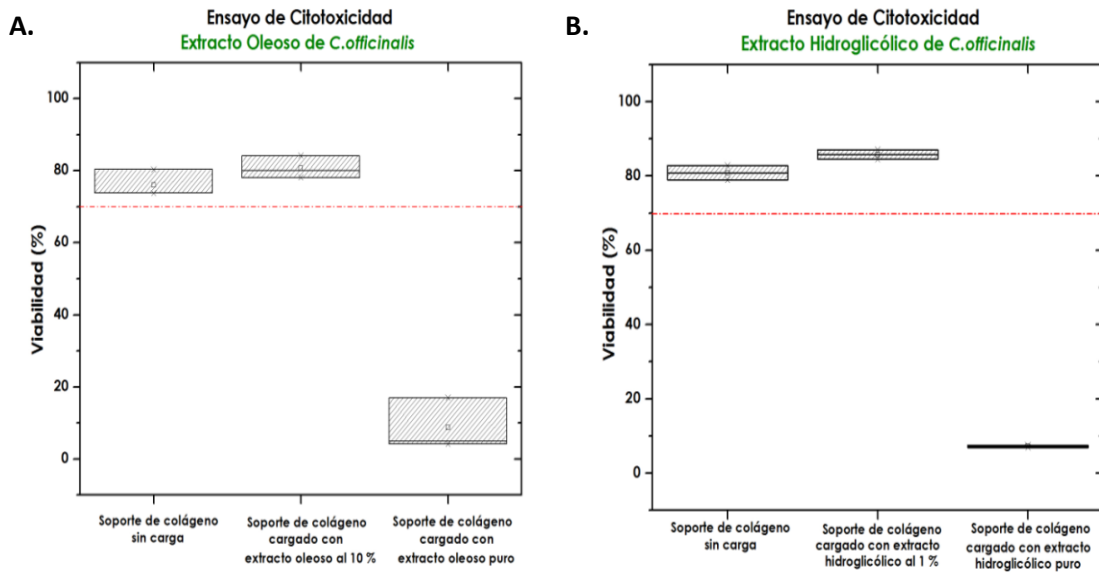
A través de la evaluación con microscopía de luz, se evidenció que el aumento en la concentración de los extractos, inducía una mayor alteración morfológica en la línea celular L929 (Figura 4-2), permitiendo clasificar las concentraciones superiores al 10% v/v de extracto oleoso y al 1% v/v de extracto hidroalcohólico, en grado de reactividad biológica 3 y 4 respectivamente. Teniendo en cuenta que la USP <36> establece que una muestra es biocompatible cuando su grado de reactividad es menor o igual a 2 (reactividad leve), estos resultados son congruentes con los obtenidos a través de los ensayos de citotoxicidad (Figura 4-1).



**Figura 4-2. Reactividad Biológica (USP<36>).** (A) Reactividad biológica de la línea celular L929 expuesta a las diferentes concentraciones del extracto oleoso (B) Reactividad biológica de la línea celular L929 expuesta a las diferentes concentraciones del extracto hidroglicólico. Espacios vacíos entre células (→) Lisis celular (□).

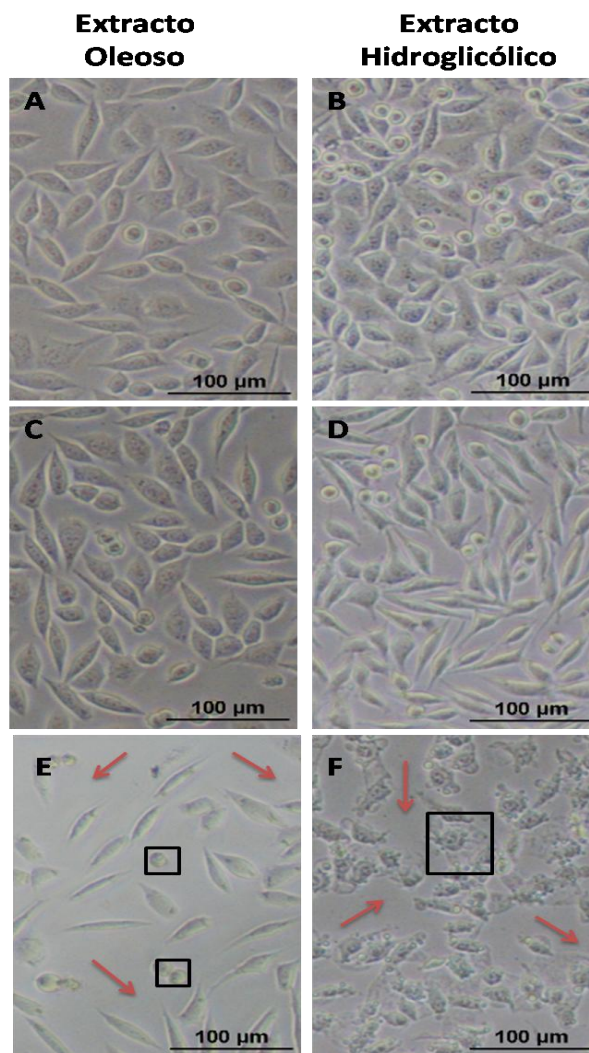
### 4.3 Citotoxicidad inducida por los soportes de colágeno asociados a los extractos de *Calendula officinalis*

La **Figura 4-3** muestra los resultados obtenidos al evaluar la citotoxicidad de los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociados con extracto oleoso al 10% v/v y con extracto hidroglicólico al 1% v/v sobre la línea celular L929. En los dos casos el porcentaje de viabilidad celular fue superior al 70% al igual que los soportes sin asociar a los extractos (control negativo), mientras que el soporte cargado con los extractos al 100% (control positivo), fueron citotóxicos.



**Figura 4-3. Porcentaje de viabilidad celular.** (A) Porcentaje de viabilidad de la línea celular L929 inducido por el soporte de colágeno cargado con extracto oleoso al 10% v/v. (B) Porcentaje de viabilidad de la línea celular L929 inducido por el soporte de colágeno cargado con extracto hidroalcohólico al 1% v/v. Soportes de colágeno sin carga (control negativo de citotoxicidad). Soportes de colágeno cargados al 100% v/v de extracto (control positivo de citotoxicidad).

La evaluación de la reactividad biológica, a través de microscopía de luz, de la línea celular L929 expuesta al medio liberado por los soportes de colágeno tipo I cargados con extracto oleoso al 10% v/v y con extracto hidroalcohólico al 1% v/v, demostró una reactividad biológica grado cero (ninguna, gránulos intracitoplasmáticos diferenciados sin lisis celular) (Figura 4-4), lo cual es congruente con los resultados obtenidos a través de los ensayos de citotoxicidad (Figura 4-3).



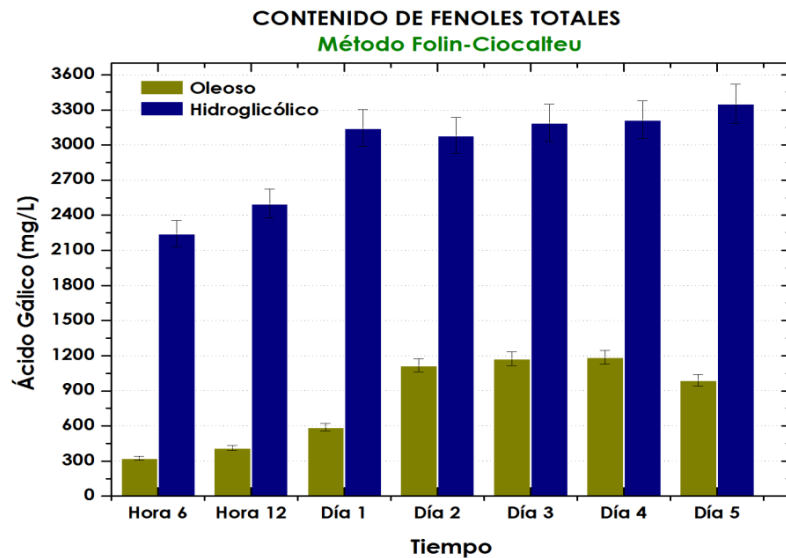
**Figura 4-4. Reactividad Biológica (USP<36>).** (Panel A y B) Reactividad biológica de la línea celular L929 expuesta al medio liberado por los soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno. (Panel C y D) Reactividad biológica de la línea celular L929 expuesta al medio liberado por los soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno asociados al 10% v/v y 1%v/v de extracto oleoso e hidroglicólico respectivamente. (Panel E y F) Reactividad biológica de la línea celular L929 expuesta al medio liberado por los soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno asociados al 100% v/v de extracto oleoso e hidroglicólico. Espacios vacíos entre células ( → ) Lisis celular ( □ ).

## 4.4 Evaluación de la Actividad Antioxidante

### 4.4.1 Determinación de Fenoles Totales

La **Figura 4-5** muestra la concentración de compuestos fenólicos liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociados con extracto hidroglicólico al 1% v/v y con extracto oleoso al 10% v/v, en función del tiempo. Se puede observar que en todos los tiempos de liberación analizados, el extracto hidroglicólico presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos que el extracto oleoso. Los valores registrados para el extracto hidroglicólico van desde  $2243,348 \pm 132,422$  en la hora 6 hasta  $3353,165 \pm 224,577$  mg GAE/L de extracto en el día 5, superando los valores encontrados en el extracto oleoso que van desde  $322,873 \pm 15,460$  en la hora 6 hasta  $1186,177 \pm 71,929$  mg GAE/L de extracto en el día 4.

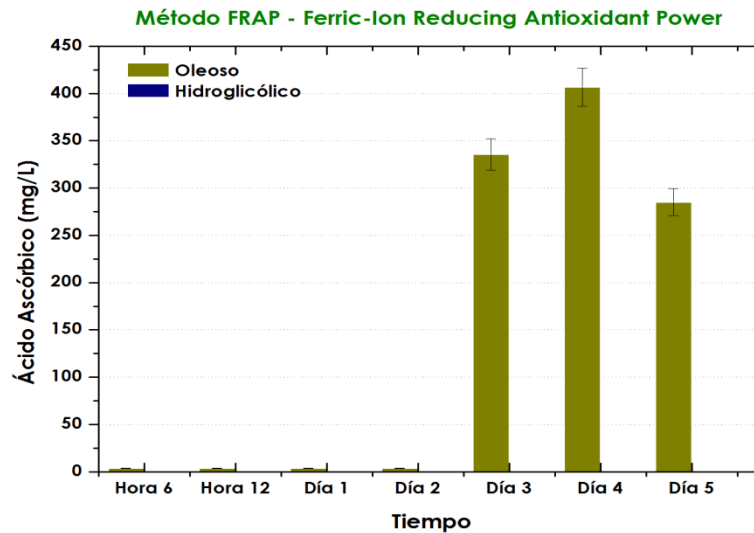
Por otra parte, la figura demuestra que los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno tienen la capacidad de liberar en forma sostenida los extractos durante el período de tiempo evaluado. Además, se puede observar que los extractos oleoso e hidroglicólico exhiben un perfil de liberación similar.



**Figura 4-5. Determinación de Fenoles Totales.** Concentración de compuestos fenólicos liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno en función del tiempo. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/Litro de extracto.

#### 4.4.2 Método FRAP

La **Figura 4-6** muestra los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante a través del método FRAP. Como se puede observar, los metabolitos liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociados al extracto hidroglicólico no demostraron la capacidad para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , este potencial reductor solo fue encontrado en los metabolitos del extracto oleoso presentes en el medio los días 3, 4 y 5, con valores de  $335,774 \pm 22,176$ ,  $406,783 \pm 13,795$  y  $285,111 \pm 15,435$   $\mu\text{mol AAE/L}$  de extracto respectivamente. En el quinto día hubo una disminución en la actividad antioxidante aunque no estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



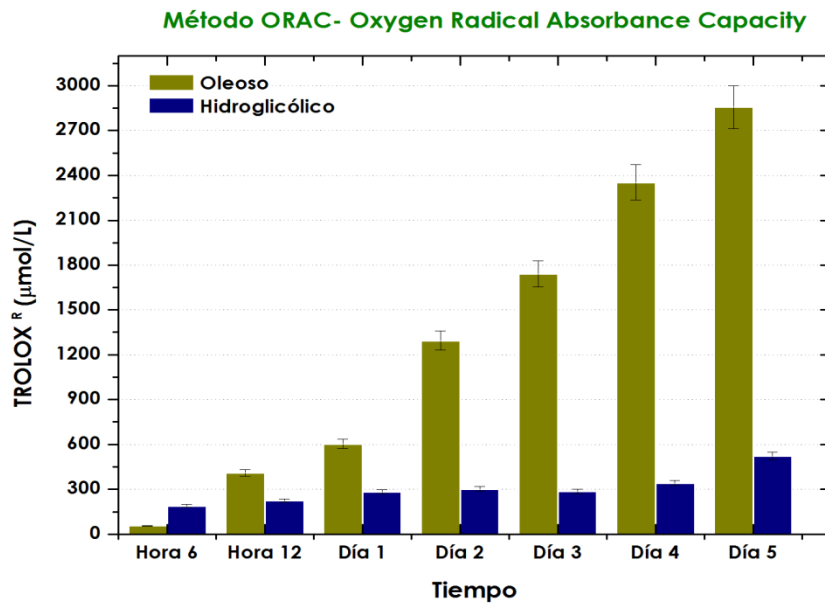
**Figura 4-6:** Actividad antioxidante evaluada a través del método FRAP. Actividad antioxidante de los metabolitos liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno en función del tiempo. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE)/Litro de extracto.

#### 4.4.3 Método ORAC

Como se puede observar en la **Figura 4-7**, los metabolitos liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociados con extracto oleoso

presentaron la mayor capacidad de atrapar radicales ROO<sup>•</sup> con valores que van desde 55,48 en la hora 6, hasta 2855,51  $\mu\text{mol Trolox/L}$  de muestra en el día 5. Los valores registrados por los metabolitos presentes en el extracto hidroglicólico fueron 187,54 en la hora 6, hasta 522,16 en el día 5.

La figura también demuestra una liberación sostenida durante el período de tiempo evaluado.



**Figura 4-7: Actividad antioxidante evaluada a través del método ORAC.** Actividad antioxidante de los metabolitos liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno en función del tiempo. Los resultados se expresan como  $\mu\text{m}$  equivalentes de Trolox/Litro de extracto.

## 5. Discusión

La sobreproducción de Especies Reactivas de Oxígeno induce y mantiene la fase inflamatoria en heridas cutáneas crónicas, obstaculizando el proceso de cicatrización, y conduce a la inactivación de antioxidantes enzimáticos y al agotamiento de antioxidantes de bajo peso molecular (Soneja *et al.*, 2005). Los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno desarrollados por nuestro grupo de investigación (Jiménez *et al.*, 2015) pueden representar una alternativa terapéutica dirigida a modular el estrés oxidativo presente en este tipo de heridas, mediante su asociación a extractos vegetales con propiedades antioxidantes. Considerando que la fase inflamatoria dura entre 1 y 5 días (Reinke & Sorg, 2012), en el presente trabajo evaluamos durante este período de tiempo la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociados a los extractos oleoso e hidroglicólico de *Calendula officinalis*, a través de diferentes métodos con el objetivo de poder plantear sus posibles aplicaciones.

Con el fin de determinar la concentración a la cual los extractos, oleoso e hidroglicólico, de *Calendula officinalis* podían ser asociados a los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno, la citotoxicidad y la reactividad biológica inducida por diferentes concentraciones de los extractos sobre la línea celular L929, fue evaluada *in vitro* siguiendo la norma ISO 10993-5 y la USP 36 (87), respectivamente. En este trabajo, adaptamos lo establecido en la norma ISO 10993-5 con el fin de extraer los compuestos presentes en el extracto oleoso empleando como vehículo de extracción DMEM suplementado con 10% de SFB. Este paso fue requerido debido a la falta de solubilidad del extracto oleoso en el medio de cultivo observada en ensayos preliminares. Con los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad y de reactividad biológica confirmamos que las proteínas del SFB extrajeron, al menos en cierta medida, los metabolitos secundarios presentes en el extracto oleoso. En los ensayos de citotoxicidad, se encontró una relación inversamente proporcional entre el porcentaje de viabilidad

celular y la concentración de los diferentes extractos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (*Fonseca et al., 2010*), quienes evaluaron la citotoxicidad de un extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* encontrando que el incremento de la toxicidad celular está dado en función del aumento en la concentración del extracto. De acuerdo con la norma ISO 10993-5, si la viabilidad celular es igual o superior al 70%, la muestra evaluada es considerada no-citotóxica. Este porcentaje de viabilidad celular se logró al emplear el extracto oleoso e hidroglicólico al 10% v/v y al 1% v/v, respectivamente. Concentraciones superiores inducen efectos tóxicos sobre las células. Esto pudo ser confirmado mediante microscopía de luz, donde se evidenció que exponer la línea celular L929 a mayores concentraciones causa alteraciones morfológicas y lisis celular. Esta toxicidad podría ser atribuida a los flavonoles, ya que la presencia de estos metabolitos en altas concentraciones ha sido relacionada con la citotoxicidad de extractos de *Calendula officinalis* (*Pérez et al., 2002*). Por otra parte, el solvente de extracción (agua-glicerol) demostró ser citotóxico, lo cual podría explicar porque el extracto hidroglicólico es más citotóxico que el extracto oleoso.

La citotoxicidad y reactividad biológica inducida por los metabolitos liberados por los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociados con extracto hidroglicólico al 1% v/v y con extracto oleoso al 10% v/v sobre la línea celular L929, demostraron una viabilidad celular superior al 70% y una reactividad biológica nula. Estos resultados indican que los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno liberan de manera controlada los extractos disminuyendo su citotoxicidad (*Jiménez et al., 2015*) y que este sistema de liberación asociado a los extractos oleoso e hidroglicólico de *Calendula officinalis*, puede considerarse seguro.

Debido a los diferentes mecanismos de acción de los antioxidantes, es necesario evaluar la capacidad antioxidante de una muestra a través de diversos métodos que puedan proporcionar suficiente información para una adecuada interpretación de los resultados (*MacDonald-Wicks et al., 2006*). La determinación de compuestos fenólicos es un parámetro importante de evaluar, debido a las propiedades antioxidantes atribuidas a estos metabolitos (*Butnariu & Coradini, 2012; Khalid & Teixeira da Silva, 2012*). El método Folin-Ciocalteu ha sido una herramienta comúnmente empleada para determinar el contenido total de compuestos fenólicos con actividad antioxidante presentes en las plantas (*Palomino et al., 2009*). A través de éste método se encontró un mayor contenido de compuestos fenólicos en el extracto hidroglicólico que en el extracto oleoso. Esto se

debe a que los compuestos polifenólicos son extraídos de forma más efectiva en solventes acuosos, debido a que forman puentes de hidrógeno con el agua a través de sus grupos hidroxilos (-OH) y a que su naturaleza levemente ácida los hace más afines al agua (Rodríguez, 2009). Por el contrario, los metabolitos presentes en el extracto oleoso demostraron una mayor actividad antioxidante a través de los métodos ORAC y FRAP. De hecho, con el método FRAP solo el extracto oleoso demostró la capacidad para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  los días 3, 4 y 5. Es posible que concentraciones del extracto hidroglicólico mayores a la asociada a los soportes, puedan tener esta capacidad de reducción como ha sido demostrado por otros autores (Butnariu & Coradini, 2012; Rigane et al., 2013). Sin embargo, para el propósito de este trabajo concentraciones superiores al 1% v/v resultan en toxicidad celular. Teniendo en cuenta que la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos está determinada por sus características estructurales (Ćetković et al., 2004), puede ocurrir que la capacidad antioxidante de los metabolitos presentes en el extracto hidroglicólico sea menor debido a la presencia de estructuras fenólicas simples. Por otra parte, la capacidad antioxidante de los metabolitos del extracto oleoso evaluada a través de los métodos ORAC y FRAP puede ser atribuida a compuestos no fenólicos o a interacciones antagonistas o sinérgicas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos (Kratchanova et al., 2010). Aunque en varios trabajos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación se establece una relación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante (Ćetković et al., 2004; Katalinic et al., 2006; Kratchanova et al., 2010; Rigane et al., 2013), en el encuentro realizado en marzo del 2013 de la AOAC INTERNATIONAL se concluyó que no es posible comparar datos obtenidos con métodos basados en diferentes mecanismos de evaluación de la capacidad antioxidante de una muestra (Prior, 2014). Por lo tanto, no necesariamente debe existir una correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de una muestra.

A pesar de que en otros trabajos se ha reportado actividad antioxidante de extractos de flores de *Calendula officinalis* a través de los métodos empleados en el presente trabajo (Kratchanova et al., 2010; Katalinic et al., 2006; Butnariu & Coradini, 2012; Rigane et al., 2013), la falta de un ensayo estándar dificulta comparar los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación con los nuestros debido a las diferencias en términos del extracto, condiciones de reacción y métodos de cuantificación, lo cual afecta

---

significativamente el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de una muestra.

En general, las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) obtenidas al comparar los resultados de la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios bioactivos presentes en los extractos oleoso e hidroglicólico de *Calendula officinalis* sugieren que el sistema constituido por el soporte de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno asociado al extracto oleoso, constituyen una alternativa terapéutica dirigida a modular el estrés oxidativo generado en una herida crónica. Sin embargo, la naturaleza *in vitro* de estos ensayos no necesariamente se corresponde con lo que ocurre *in vivo*. Por tal razón, es necesario evaluar este sistema en heridas crónicas en un modelo animal.



## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

- Los soportes de colágeno tipo I modificados con micropartículas de gelatina-colágeno asociados con extracto oleoso al 10% v/v e hidroglicólico al 1% v/v son seguros *in vitro* bajo las condiciones experimentales evaluadas en éste trabajo.
- Los metabolitos liberados por los soportes de colágeno tipo I asociados con extracto oleoso al 10% v/v exhiben mayor capacidad antioxidante que los liberados por el extracto hidroglicólico posiblemente debido a compuestos de naturaleza no fenólica o a interacciones antagonistas o sinérgicas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos
- El sistema constituido por el soporte de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina- colágeno asociado al extracto oleoso, puede constituirse en una alternativa terapéutica dirigida a modular el estrés oxidativo generado en una herida crónica.

### 6.2 Recomendaciones

- Optimizar los soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina-colágeno para su asociación al extracto oleoso de *Calendula officinalis*.
- Evaluar el uso de los soportes de colágeno tipo I asociados a los extractos de *Calendula officinalis* en heridas crónicas en un modelo animal.

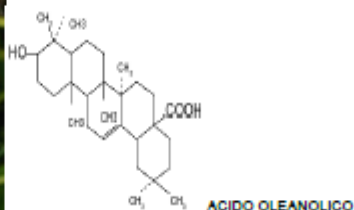
## A. Anexo: Ficha técnica extracto comercial hidroglicólico de *C. officinalis*



Extractos naturales

### FICHA TÉCNICA

#### EXTRACTO HIDROGLICÓLICO CALENDULA



- 1. NOMBRE INCI:** Calendula Officinalis Flower Extract
- 2. NOMBRE INCI EXTRACTO OLEOSO DE FLOR DE CALENDULA:** Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil (and) *Calendula officinalis* Flower Extract.
- 3. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA:** *Calendula officinalis* L. Familia: Compositae
- 4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:** Pequeña planta herbácea anual, con tallos robustos y angulosos, con hojas sésiles. Las inflorescencias son gruesos capítulos (3 – 8 cm) rodeados por dos filas de brácteas vellosas. Las flores centrales tubulosas y hermafroditas son generalmente de un color amarillo anaranjado más intenso que el de las flores periféricas femeninas que poseen una lígula tridentada. El fruto es un aquenio curvado, con su cara convexa espinosa y áspera. El ensayo de la droga, provista de la flor abierta despegada del receptáculo, abarca principalmente una valoración de flavonoides (contenido mínimo 0.4%).
- 5. HÁBITAT:** Nativa de Egipto, sub-espontánea en Europa y adaptada, como medicinal y ornamental, en América. Requiere suelos ricos en humus y es poco exigente en nutrientes.
- 6. COMPOSICIÓN QUÍMICA:** La composición de la droga es bien conocida: flavonoides (0.3 – 1.5% de oligosacáridos en C-3 del isorramnetol y del quercetol), carotenos (licopeno) y xantofilas, aceite esencial (2 – 3 mL/Kg) con derivados sesquiterpénicos oxigenados (cadinoles) y polisacáridos. Los compuestos triterpénicos son especialmente abundantes: derivados mono-, di- y trihidroxilados, libres y esterificados, del lup-20(29)-eno, del olean-12(13)-eno, del tarax-20(30)-eno, del tarax 20(21)-eno [=Ψ], del urs-12(13)-eno: α- y β-amirina, amidiol, faradiol, ursadiol, calenduladiol, heliantrioles. Saponósidos A – D, D2 y F (derivados del ácido oleanólico, el cual se considera que aporta la mayor actividad a nivel cutáneo), el contenido oscila entre un 2 – 10% en función de la variedad y de la época de recolección.
- 7. PARTE USADA:** se emplean las flores.



Extractos naturales

**8. ESPECIFICACIONES DE CALIDAD:**

ANÁLISIS	PRUEBA	ESPECIFICACIÓN EXTRACTO HIDROGLICOLICO	ESPECIFICACIÓN EXTRACTO OLEOSO DE FLOR DE CALENDULA	MÉTODO
ORGANOLÉPTICO	Aspecto	Líquido homogéneo, libre de partículas extrañas.	Líquido translúcido homogéneo	Organoléptico
	Color	Café oscuro	Amarillo	Organoléptico
	Olor	Ligero característico	Ligero característico	Organoléptico
FISICOQUÍMICO	Densidad (g/mL)	1,024 – 1,034	0.895-0.935	USP
	Índice de Refracción	1,370 – 1,390	1.4650-1.4850	USP
	pH directo	5,0 – 6,0	N-A.	USP
	Solubilidad en Agua (1/10)	Soluble	Insoluble	USP
	Solubilidad en Alcohol (1/10)	Soluble	Insoluble	USP
	Solubilidad en Aceite Mineral (1/10)	Insoluble	Soluble	USP
MICROBIOLÓGICO	Mesófilos	< 100 UFC/mL	< 100 UFC/mL	PETRFILM 3M
	Hongos y Levaduras	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	PETRFILM 3M
	Patógenos	Ausentes	Ausentes	PETRFILM 3M

**9. ACCIÓN DERMATOCOSMÉTICA:**

- **Propiedades antibacterianas:** Tanto el extracto etanólico al 80%, obtenido a partir de la droga desecada, como la tintura madre homeopática poseen propiedades antibacterianas *in vitro*.
- **Propiedades antiinflamatorias:** Investigadores Rusos han encontrado un efecto antiinflamatorio puesto de manifiesto sobre diversos modelos animales, incluyendo conjuntivitis crónica.
- **Propiedades cicatrizantes:** Estudios han demostrado que en cremas a una concentración del 5% es marcadamente estimulante de la epitelización, por el incremento en glicoproteínas, nucleoproteína y metabolismo de colágeno.
- **Propiedades antipruriginosas:** afecciones dermatológicas, como trófico protector en el tratamiento de grietas, excoiraciones, cortaduras y contra las picaduras de insectos, contra las quemaduras de sol, quemaduras superficiales y poco extensas, eritemas en los glúteos.



#### Extractos naturales

- **Antálgico:** En afecciones de la cavidad bucal y/o faríngea.

#### 10. OTRAS PROPIEDADES MEDICINALES

- **Úlceras duodenales:** Estudios reportados en Polonia y Bulgaria, demostraron que el extracto de flores de caléndula puede utilizarse en el tratamiento gastroduodenitis y periodontopatías.
- En dismenorrea
- Repelente de insectos

**11. CONTRAINDICACIONES:** Sensibilidad a especies de la familia de las Asteráceas. No se recomienda su uso durante el embarazo, por haberse descrito acción uterotónica. La planta fresca puede producir dermatitis de contacto.

**12. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:** Mantener almacenado en ambientes frescos y secos, temperatura máxima de 25°C, humedad relativa entre 65% - 75% y protegido de la luz directa.

**13. PRESENTACIONES:** envases plásticos de polietileno blanco por 1.0 Kg y por 4.0 Kg.

**14. DOSIS:** en emulsiones y líquidos, puede ser usado entre el 1.0% y 5.0%.

#### BIBLIOGRAFÍA:

1. British Herbal Medicine Association. British Herbal Pharmacopoeia. British Herbal Medicine Association, 1983. p. 44, 45.
2. Bruneton, J. "Farmacognosia: Fitoquímica Plantas Medicinales", Editorial Acribia, segunda edición, Zaragoza, 2001, p. 697-699.
3. Quintero P., Restrepo De Fraume, Mérida. "Plantas Medicinales: Colección Guías Prácticas de Biodiversidad", Editorial Triunfo, volumen 1, 2002, p. 11.
4. B. Vanaclocha y S. Cañigüeral, "Fitoterapia. Vademécum de prescripción", MASSON, Barcelona, 2003, p. 156-157.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO monographs on selected medicinal plants. [En línea], URL: <http://whqlibdoc.who.int/publications/1999/9241545178.pdf>, Revisado Enero 2010.
6. Dermarderosian A., Beautler J., "The Review of Natural Products", Facts & comparisons, Segunda Edición, Estados Unidos, 2002.



## B. Anexo: Ficha técnica extracto comercial oleoso de *C. officinalis*

	FICHA TECNICA	FT-190
	CALENDULA (fl) PHITOEEX-O	v. 01

NOMBRE INCI: *Caléndula officinalis* Flower Extract

### DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

N.C.: *Calendula officinalis* L.

Planta herbácea, vivaz, de 0.50 a 0.80 m. de altura, con el tallo y las ramas raras veces bien erguidos. Tiene hojas enteras o con algunos dientes inconspicuos y callosos; las inferiores atenuadas para formar a modo de un raballo. Flores radiadas desde blanco-amarillentas hasta amarillo-anaranjado, femeninas, fértiles; cáliz y corola 4 mm. de largo, ligulas enteras o dentadas, amarillas, 1.5 cm. De largo, 3 mm. De ancho; las flores centrales hermafroditas, corola tubular con 5 lóbulos, antenas obtusas en la base, brácteas de estilo largas, subtruncadas.



Foto 1. Caléndula flor en tizana (por autor)

### COMPOSICION:

**Aceite esencial:** los capítulos florales tiene concentraciones variable de aceite esencial, en flores liguladas (hasta 0.12%) , (hasta 0.4%) en receptáculo de la inflorescencia. Los capítulos florales son muy ricas en monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados: carvone, geranylacetone, cariophyllene ketone, menthone, isomenthone,  $\gamma$ -terpinene,  $\gamma$  and  $\delta$ -cadinene, cariophyllene,  $\alpha$  and  $\beta$ -ionone, 5,6- $\beta$ -ionone epoxide, pedunculatine, dihydro-actinidiolide,  $\alpha$ -muurolene, etc (Lastra Valdés H & Piquet García R, 1999). (5)

**Flavonoides:** hasta 0.88% en flores liguladas y 0.33% en receptáculos. Los flavonoides aislados de las inflorescencias de la caléndula incluyen: isorhamnetin 3-Oglycoside, isorhamnetin, neohesperidoside, quercetin glucoside, calendoflaside, calendoflavoside, calendoflavobioside, narcissin, isoquercetin, quercetin, rutoside and kaempferol (Lastra Valdés H & Piquet García R, 1999).

**Triterpenos alcoholicos:** Los capítulos contienen los siguientes triterpenos alcoholicos pentaciclicos: amadiol, faradiol,  $\alpha$  y  $\beta$ -amyrin, faradiol-3-myristic acid, lupeol, taraxasterol, faradiol-3-palmitic acid, calenduladiol, etc (Alonso J, 2004).

**Acidos fenolicos:** coumaric, gentisic, vanillic, caffeic, syringic, ohydroxyphenylacetic, protocatechinic, ferulic, p-hydroxybenzoic, salicylic, chlorogenic, veratric, o-coumaric and quinic acids (Lastra Valdés H & Piquet García R, 1999).

**Taninos:** Investigaciones demostraron la presencia de catecholand pyrogallol-like tannins (Lastra Valdés H & Piquet García R, 1999).

**Carotenoides:** 0.078% y 0.017% han sido encontrados en las flores liguladas y receptáculos, respectivamente. Los componentes identificados incluyen:  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -carotene, violaxanthin, rubixanthin, citroxanthin, flavochrome, galenin, lutein, lycopene, valencixanthin, auroxanthin, microxanthin, 5,6 epoxy-carotene,  $\beta$ -zeacarotene, mutatoxanthin and lutein epoxyde (Lastra Valdés H & Piquet García R, 1999)

**Saponosidos** cerca de 2-5%. Derivados del acido Oleanic: calendulosides A, B, C, D, D2, F, G, and H.

**Otros principios activos:** Cumarinas tales como scopoletin, umbelliferone y esculetin – sterols, azucar y parafina. Investigadores identificaron polisacáridos solubles en agua, sustancias como pectina y hemicelulosa en proporciones de 14.75, 9.67 y 5.92% sobre la base seca (Lastra Valdés H & Piquet García R, 1999).

**PARTE USADA :** Las Flores

	FICHA TECNICA	FT-190
	CALENDULA (fl) PHITOEEX-O	v. 01

ESPECIFICACIONES DE CALIDAD		
PRUEBA	PHITOEEX- O	
Organoléptico		
Aspecto	Líquido medianamente fluido	
Color	Amarillo igual al patrón	
Olor	Característico	
Sabor	No aplica	
Fisicoquímico		
Densidad (g/ml)	0.9100 g/ml – 0.9510 g/ml	
Índice de refracción	1.4600 – 1.4850	
pH	No aplica	
Solubilidad	Insoluble en agua, etanol 96% y en soluciones ácida y alcalina diluidas. Muy soluble en cloroformo	
Pérdida por secado (%)	≤ 1.0%	
Concentración	1/1	
Recuento Microbiológico	Aerobios ≤100 UFC/ml; Hongos y levaduras ≤10 UFC/ml E.Coli. y Coliformes totales: Ausencia	
V01 061111		
<p><b>ACCIÓN:</b> Los estudios sugieren que el empleo tópico de caléndula pueda ofrecer la ventaja para la cicatrización por ayudando al cuerpo regenerar tejidos dañados, y como un antiinflamatorio. Históricamente ha sido usado como un antibacteriano, antifúngal, y el agente antiviral (2)</p> <p><b>Actividad reepitelizante y cicatrizante:</b> debido a la presencia de polisacáridos (el mucilago), flavonoides (sobre todo quercetrin-3-O-glycosido), triterpenos y carotenos. Estas sustancias actúan sobre el metabolismo de glicoproteínas y sobre las fibras de colágeno. Las cremas conteniendo el 5% de extracto de flores de caléndula en combinación con alantoina, promovió epitelización en modelos experimentales de ratas, con la intensidad especial sobre el metabolismo de glicoproteínas y fibras de colágeno durante la regeneración de tejido. La investigación más reciente sugirió que los extractos acuosos de flores de caléndula, aplicadas sobre heridas de la piel, desempeñan un papel como agente que induce la microvascularización, así contribuyendo a acelerar la curación (Alonso J., 2004). Según ESCOP, caléndula (flor) la recomiendan para el tratamiento local de piel y la inflamación de las mucosas, como un coadyuvante en procesos de cicatrización y tratamiento de contusiones y quemaduras de la piel (<a href="http://www.fitoterapia.net">www.fitoterapia.net</a>). Los polisacáridos de extracto de caléndula tienen efectos de adhesivo de dependiente de concentración (efectos de la adsorción) sobre el tejido epitelial de la mucosa orofaríngea. Esta acción contribuye a sus efectos terapéuticos para tratar la inflamación de la mucosa orofaríngea (2)</p> <p><b>Actividad humectante.</b> Esta actividad de caléndula es debido a su saponina y el contenido de mucilago. Estos principios activos tienen propiedades que humectan o hidratan (retención de agua y liberan agua al medio). Debido esta actividad la caléndula es ideal para productos cosméticos para la piel seca, irritada o delicada. Además, es también recomendable para protectores solares (antes y después de la exposición al sol), después del afeitado, bálsamos y productos de baño (Nardi U. et Al-, 1991). (5)</p> <p><b>Actividad antiinflamatoria</b> La eficacia clínica de esta planta mucho tiempo ha sido demostrada. Della Loggia et al. (1994) usó un modelo experimental (inflamación inducida por croton en oído de ratón) y un producto obtenido por extracción supercrítica para demostrar que la fracción que tenía, no era saponosidos, ni polisacáridos los responsables del efecto antiinflamatorio. Una fracción del bioensayo-orientado mostró que la actividad antiinflamatoria era debido al triterpenos (monocoles y ésteres diol), principalmente monoésteres de faradiol. El faradiol no esterificado, producido por la hidrólisis, mostró tanta actividad como indometacina sobre este modelo de animal. En estudios in vivo con ratas se evidenció la actividad antiinflamatoria (inflamación inducida por carragenan y prostaglandin E1) y la acción inhibitoria sobre la infiltración de leucocito. Así, el extracto de caléndula es altamente recomendado en productos cosméticos para piel sensible y/o irritada.</p> <p><b>Actividad Inmunomoduladora.</b> Actividad debido a la presencia de polisacáridos inmunostimulatorios en su composición. Estos polisacáridos estimulan la fagocitosis in vitro por células polimorfonucleares humanas. Este efecto también ha sido reportado en ensayos in vivo usando ratones. Es importante que el sistema inmunológico de la piel se mantenga activo de modo que esto pueda proteger la piel del daño producido</p>		
Elaboró y Revisó:	Aprobó:	Fecha
BIOLOGA (Erika Gutiérrez)	DIRECTOR TECNICO (Luz Helena Núñez)	2008 / 07 / 29

	FICHA TECNICA	FT-190
	CALENDULA (fl) PHITTOEX-O	v. 01

por agentes internos así como externos. Las células Langerhans y keratinocytes son las células claves en el sistema inmunológico epidérmico. Durante el proceso de envejecido, especialmente fotoenvejecimiento, el sistema inmunológico progresivamente se deteriora y su activación es muy lenta, causando así disminución en la renovación celular.(5)

Además, la Comisión alemana E atribuye propiedades de cicatrización a la caléndula y comenta que los efectos antiinflamatorios han sido observados después de sus aplicaciones externas (Bruneton J., 2001).

**Actividad Antimicrobiana:** Investigadores soviéticos encontraron que preparados estériles en base a extractos de caléndula aliviaban significativamente los signos de conjuntivitis crónica y otras inflamaciones crónicas oculares en ratas (Marinchev V. et al., 1971). También se ha comprobado su efectividad en casos de otitis crónicas supuradas (Shaparenko B., 1979).

El aceite esencial de las flores inhibió el crecimiento in vitro de *Bacilo subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus fecalis* y *Candida albicans*; nematocida contra *Meloidogyne incognita* y parasitocida frente a *Trichomonas vaginalis*. Una fracción flavonoide aislada de las flores inhibió el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida monosa*. Los extractos de las flores inhibieron el crecimiento in vitro de *Trichomonas vaginalis*. Los terpenos oxigenados aparecen ser responsables de la actividad antimicrobiana.(6)

**INDICACIONES:** vía tópica: acné, irritaciones cutáneas, escaldaduras, quemaduras superficiales, contusiones, picaduras de insectos, desinfección y ayuda a la cicatrización de heridas, ulceraciones dérmicas, forúnculos, abscesos, dermatitis exfoliativa, gingivitis, faringitis, vulvovaginitis, distrofia de la mucosa vulvovaginal.

El extracto de caléndula ha sido reportado su uso tratamientos faciales, tratamientos humectantes, humectantes, limpiadores faciales, baños corporales, limpiadores corporales, productos ansiedad, shampoo, crema para alrededor de los ojos, sombras para ojos, acondicionadores, humectantes para labios, bálsamos para labios (3). (ver acciones).

**CONTRAINDICACIONES:** Es contraindicado en casos de conocer alergia a plantas de la familia Asteraceae.

**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:** Conservar el producto tapado y en lugar fresco, en condiciones de temperatura de 18°C - 30°C y humedad relativa máxima de 75%. Proteger de la exposición directa a la luz. No regresar líquido al recipiente. Después de abierto, utilizar en el menor tiempo posible.

**PRESENTACIONES:** Envase plástico por 1, 5, 10, 20 kg.

**DOSIS:** En productos cosméticos 2% - 5% del extracto.

#### REFERENCIAS

Búsqueda en Internet

(1) [http://checkdata.com/Published\\_papers/ICE2000.pdf](http://checkdata.com/Published_papers/ICE2000.pdf)

(2) <http://articles.directory.ca/Calendula-a865245.html>

(3) <http://www.cosmeticsdatabase.com/ingredient.php?ingred06=726402>

(4) <http://articles.directory.ca/Calendula-a865245.html>

(5) <http://www.centerchem.com/PDFs/Calendula%20ECO%20Tech%20Lit.pdf>

(6) Who monographs on selected medicinal plants. Volumen 2. World Health Organization Geneva 1999

Elaboró y Revisó:	Aprobó:	Fecha
BIOLOGA (Erika Gutiérrez)	DIRECTOR TECNICO (Luz Helena Núñez)	2008 / 07 / 29



## Bibliografía

- Aigner, T. & Stöve, J. (2003). Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 1569-93.
- Amirghofran, Z., Azadbakht, M. & Karimi, M. H. (2000). Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol*, 72: 167–172.
- Arenas, C. M., Merizalde, G. J. & Restrepo, M. L. (2012). Sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos. *Iatreia*, 25(1): 42 - 53.
- Arora, D., Rani, A. & Sharma, A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacogn Rev*, 7(14): 179-187.
- Astiz, M. (2009). Efecto de contaminantes ambientales sobre el metabolismo lipídico y el sistema de defensa antioxidante en tejidos de rata (Doctorado en Ciencias de la Salud), Universidad Nacional de la Plata, La plata.
- Auf dem Keller, U., Kumin, A., Braun, S. & Werner, S. (2006). Reactive Oxygen Species and Their Detoxification in Healing Skin Wounds. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 11(1): 106-111.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem*, 239: 70–76.
- Bickers, D. R. & Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol*, 126(12): 2565-2575.
- Bottcher-Haberzeth, S., Biedermann, T. & Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *Burns*, 36(4): 450-460.
- Braga, P. C., Dal Sasso, M., Culici, M., Spallino, A., Falchi, M., Bertelli, A., Morelli, R. & Lo Scalzo, R. (2009). Antioxidant Activity of *Calendula officinalis* Extract: Inhibitory Effects on Chemiluminescence of Human Neutrophil Bursts and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Pharmacology*, 83(6): 348-355.
- Buma, P. van Tienen, T. & Veth, R. (2007). The collagen meniscus implant. *Expert Rev Med Devices*, 4: 507-516.
- Butnariu, M. & Coradini, C. Z. (2012). Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *Chem Cent J*, 6: 35-41.
- Catalano, E., Cochis, A., Varoni, E., Rimondini, L. & Azzimonti, B. (2013). Tissue-engineered skin substitutes: an overview. *J Artif Organs*, 16(4): 397-403.

- Ćetković, G. S., Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M. & Tumbas, V. T. (2004). Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Res Int*, 37(7): 643-650.
- Cordova, C., Siqueira, I. R., Netto, C. A., Yunes, R. A., Volpato, A. M., Filho, V., Curi-Pedrosa, R. & Creczynski-Pasa, T. B. (2002). Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Rep*, 7(2): 95-102.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. & Lele, R. D. (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Japi*, 52: 794-804.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 82: 47-95.
- Dumitrescu A. L. (2011). Bone Grafts and Bone Graft Substitutes in Periodontal Therapy. Chemicals in Surgical Periodontal Therapy: Springer Berlin Heidelberg, p. 73-144.
- Eming, S. A., Krieg, T. & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 127(3): 514-525.
- Enoch, S. & Leaper, D. J. (2008). Basic science of wound healing. *Surgery* 26(2): 31-37.
- Foley, E., Robinson, A. & Maloney, M. (2013). Skin Substitutes and Dermatology: A Review. *Curr Derm Rep*, 2(2): 101-112.
- Fonseca, Y. M., Catini, C. D., Vicentini, F. T., Cardoso, J. C., Cavalcanti De Albuquerque Junior, R. L. & Vieira, M. J. (2011). Efficacy of Marigold Extract-Loaded Formulations Against UV-induced Oxidative Stress. *J Pharm Sci*, 100(6): 2182-2193.
- Fonseca, Y. M., Catini, C. D., Vicentini, F. T., Nomizo, A., Gerlach, R. F. & Fonseca, M. J. (2010). Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J Ethnopharmacol*, 127(3): 596-601.
- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S. & Merfort, I. (2009). Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J Ethnopharmacol*, 126(3): 463-467.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. (2008). Wound Repair and Regeneration. *Nature*, 453: 314-321.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35(5): 1147-1150.
- Hata, K. (2007). Current issues regarding skin substitutes using living cells as industrial materials. *J Artif Organs*, 10(3): 129-132.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*, 53: 1841-1856.
- James, T. J., Hughes, M. A., Cherry, G. W. & Taylor, R. P. (2003). Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Rep Reg*, 11: 172-176.
- Jiménez, R. A. (2013). Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula*

- officinalis). (Maestría en Ciencias Farmacéuticas ), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Jiménez, R. A., Millán, D., Suesca, E., Sosnik, A. & Fontanilla, M. R. (2015). Controlled Release of an Extract of *Calendula officinalis* Flowers from a System Based on the Incorporation of Gelatin-Collagen Microparticles into Collagen I Scaffolds. *Drug Deliv Transl Res*, DOI 10.1007/s13346-015-0217-3.
- Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*, 1: 244–257.
- Kamolz, L. P., Lumenta, D. B., Kitzinger, H. B. & Frey, M. (2008). Tissue engineering for cutaneous wounds: an overview of current standards and possibilities. *European Surgery*, 40(1): 19-26.
- Katalinic, V. Milos, M. Kulisic, T. & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*, 94: 550-557.
- Khalid, K. A. & Teixeira da Silva, J. A. (2012). Biology of *Calendula officinalis* Linn.: Focus on Pharmacology, Biological Activities and Agronomic Practices. *Med Arom Plant Sci*, 6(1): 12-27.
- Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A. & Mihailov, A. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction system. *Acta Biochim Pol*, 57(2):229-234
- Langer, R. & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260: 920-926.
- Leach, M. J. (2008). *Calendula officinalis* and Wound Healing: A Systematic Review. *Wounds*, 20: 236-243.
- Lee, S. H., Jeong, S. K. & Ahn, S. K. (2006). An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. *Yonsei Med J.*, 47(3): 293-306.
- Lozada, S. M. & García, L. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 17: 172-179.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G. & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric*, 86: 2046–2056.
- Maldonado, O., Jiménez, E. N., Guapillo, M. R. B., Ceballos, G. M. & Méndez, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV*, 10(2): 32-39.
- Medina, E. J., Lora, A. G., Paco, L., Algarra, I., Collado, A. & Garrido, F. (2006). A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*, 6(116): 1-14.
- Millán, D. (2014). Evaluación de la biocompatibilidad y eficiencia como sustituto artificial de soportes de colágeno tipo I asociados con soportes de caléndula (*Calendula officinalis*) en heridas cutáneas en un modelo animal lagomorfo. (Mestría en Ciencias Microbiología). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

- Mishra, A. K., Mishra, A., Verma, A. & Chattopadhyay, P. (2012). Effects of Calendula Essential Oil-Based Cream on Biochemical Parameters of Skin of Albino Rats against Ultraviolet B Radiation. *Sci Pharm*, 80(3): 669-683.
- Moseley, R., Hilton, J. R., Waddington, R. J., Harding, K. G., Stephens, P. & Thomas, D. W. (2004). Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound. *Wound Rep Reg*, 12: 419-429.
- Muley, B. P., Khadabadi, S. S. & Banarase, N. B. (2009). Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Trop J Pharm Res*, 8(5): 455-465.
- Palomino, L. R., García, C. M., Gil, J. H., Rojano, B. A. & Durango, D. L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3): 388-395.
- Parente, L. M., Andrade, M. A., Brito, L. A., Moura, V. M., Miguel, M. P., Lino Júnior Rde, S., Tresvenzol, L. F. & Paulo, N. M. (2011). Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. *Acta Cir Bras*, 26(1): 19-24.
- Parente, L. M., Lino Júnior Rde, S., Tresvenzol, L. F., Vinaud, M. C., de Paula, J. R. & Paulo, N. M. (2012). Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. *Evid Based Complement Alternat Med*, doi: 10.1155/2012/375671.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R. & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3): 1863-1887.
- Pham-Huy, L. A., He, H. & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, 4(2): 89-96.
- Preethi, K. C., Kuttan, G. & Kuttan, R. (2006). Antioxidant Potential of an Extract of *Calendula officinalis* Flowers in Vitro and in Vivo. *Pharm Biol*, 44(9): 691-697.
- Preethi, K. C., Kuttan, G. & Kuttan, R. (2009). Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol*, 47: 113-120.
- Prior, R. L. (2014). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods*, doi: 10.1016/j.jff.2014.12.018.
- Rastogi, S., Modi, M. & Sathian B. (2009). The efficacy of collagen membrane as a biodegradable wound dressing material for surgical defects of oral mucosa: a prospective study. *J Oral Maxillofac Surg*, 67: 1600-6.
- Reinke, J.M. & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res*, 49: 35-43.
- Rigane, G., Younes, B., Ghazghazi, H. & Ben Salem, R. (2013). Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *Food Res Int*, 20(6): 3001-3007.
- Rodriguez, M. (2009). Determinacion de la actividad antioxidante de pétalos comestibles. (Tesis de Maestría), Universidad Politécnica de Cataluña, Cataluña.

- Romero, M., Rojano, B., Mella-Raipán, J., Pessoa-Mahana, C. D., Lissi, E. & López-Alarcón, C. (2010). Antioxidant capacity of pure compounds and complex mixtures evaluated by the ORAC - Pyrogallol red assay in the presence of Triton X-100 micelles. *Molecules*, 15(9): 6152-6167.
- Roy, S. Khanna, S., Nallu, K., Hunt, T. K. & Sen, C. K. (2006). Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther*, 13(1): 211–220.
- Schafer, M. & Werner, S. (2008). Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res*, 58(2): 165-171.
- Sen, C. K. & Roy, S. (2008). Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta*, 1780(11): 1348–1361.
- Sen, C. K. (2003). The general case for redox control of wound repair. *Wound Rep Reg*, 11: 431–438.
- Shevchenko, R. V., James, S. L. & James, S. E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*, 7(43): 229-258.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic*, 16: 144-158.
- Soneja, A., Drews, M. & Malinski, T. (2005). Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative in wound healing. *Pharm Rep*, 57: 108-119.
- Stock, U. A. & Vacanti, J. P. (2001). Tissue Engineering: Current State and Prospect. *Annu Rev Med*, 52: 443–451.
- Suesca, E. B. (2013). Optimización de la obtención de soportes de colágeno y estudio del efecto de su microestructura en el desarrollo de mucosa oral artificial. (Doctorado en ciencias farmacéuticas), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Tabatabai-Naeini, A., Miri, R., Shafiei, N., Tabandeh, M. R., Oryan, A. & Nazifi, S. (2010). Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. *Comp Clin Pathol*, 21(3): 253-257.
- Trenam, C.W., Blake, D. R. & Morris, C.J. (1992). skin Inflammation: Reactive Oxygen Species and the Role of Iron. *J Invest Dermatol*, 99: 675-682.
- Ugartondo, V. (2009). Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. (Doctorado en Medicamentos, Alimentos y salud). Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Vacanti, J. P., & Langer, R. (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation *Lancet*, 354: 32-34.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1): 44-84.
- Venus, M., Waterman, J. & McNab, I. (2011). Basic physiology of the skin. *Surgery*, 29(10): 471-474.
- Wangensteen, K. J. & Kalliainen, L. K. (2010). Collagen tube conduits in peripheral nerve repair: a retrospective analysis. *Hand*, 5: 273-7.

- 
- Wlaschek, M. & Scharffetter-Kochanek, S. (2005). Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Rep Reg*, 13: 452–461.
- Wong, T., McGrath, J. A. & Navsaria, H. (2007). The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol*, 156(6): 1149-1155.
- Yannas, I. V., Tzeranis, D. S., Harley, B. A. & So, P. T. (2010). Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 368: 2123-39.
- Zhang, Z. & Michniak-Kohn, B. B. (2012). Tissue engineered human skin equivalents. *Pharmaceutics*, 4(1): 26-41.
- Zweifel, C. J., Contaldo, C., Höler, C., Jandali, A., Künzi, W. & Giovanoli, P. (2008). Initial experiences using non-cultured autologous keratinocyte suspension for wound burns closure. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61(11): 1-4.