

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJACALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA**

**FCITEC**

**UNIDAD VALLE DE LAS PALMAS**



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS  
CARGADAS CON EXTRACTOS BACTERIANOS PARA APLICACIONES  
BIOMÉDICAS**

**Alumno:** Lis Viridiana Barrera Alonso

**Matrícula:** 1245782

**Director de Tesis:** Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

**Tijuana, Baja California, México, 15 de abril de 2021**

## **DEDICATORIA**

Dedico primeramente este trabajo a la Dra. María Carolina Alonso y al Dr. José Barrera, mis padres, quienes siempre me han brindado todo su apoyo y me han guiado a través de todas mis decisiones, llevándome a este logro. Agradezco todo su esfuerzo en mi formación académica.

A mis familiares, que siempre se han dedicado a escucharme y apoyarme, en especial a mi hermana María Arcadia y a mi tía Elisa Zarate, ambas mujeres increíbles quienes me han dado ánimos en este trabajo de investigación. Les agradezco todo su tiempo.

A mis amigos de la carrera que han hecho de mi vida universitaria toda una aventura, por su amistad y apoyo durante este tiempo les doy gracias de todo corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a mi profesor y tutor de tesis, el Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez, quien ha confiado en mí para poder realizar este trabajo y me ha dado todo su apoyo desde los inicios de ésta investigación. Por brindarme sus conocimientos, por su paciencia, su tiempo, por impulsarme a superarme y guiarme por el camino de la investigación, le agradezco infinitamente.

A mis profesores de carrera, a quienes siempre agradeceré por su tiempo y dedicación, en especial a la Dra. Ana Iglesias, una excelente profesora de quien he recibido apoyo durante toda mi carrera, a Daniella Pompa con quien pude contar ante cualquier duda y a Erick Torres quien siempre tuvo la paciencia de resolver las dudas y problemas que surgieron en el transcurso de la investigación, les agradezco todo su tiempo.

Agradezco a Lhia Martínez y a Paulina Figueroa, quienes hicieron ameno este tiempo de investigación, que, a pesar de tener distintas investigaciones, siempre pude contar con ellas ante cualquier situación, les agradezco todo su apoyo y les deseo éxito en las siguientes etapas.

# Tabla de contenido

<b>DEDICATORIA</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>2.MARCO TEÓRICO</b>	<b>11</b>
2.1.Quemaduras	11
2.1.1.Tipos de quemaduras según su exposición	11
2.1.2.Tipos de quemaduras según su grado	13
2.1.2.1.Quemaduras de primer grado (superficiales)	13
2.1.2.2.Quemaduras de segundo grado (espesor parcial)	14
2.1.2.3.Quemaduras de tercer grado (grueso total)	15
2.2.Tratamientos actuales de las quemaduras	16
2.3.Desventajas de los tratamientos actuales de quemaduras	20
2.4.Técnica de electrohilado	20
2.5.Generalidades de los actinomicetos marinos	23
2.5.1.Aplicaciones de los actinomicetos	23
<b>3.ANTECEDENTES</b>	<b>27</b>
3.1.Bacterias en fibras poliméricas	27
3.2.Actinomicetos en fibras poliméricas	28
3.3.Problemática de las quemaduras	28
3.4.Apósitos cutáneos en las quemaduras.	28
<b>4.HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>5.OBJETIVO GENERAL</b>	<b>30</b>
<b>6.OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>30</b>
<b>7.METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
7.1.Análisis antimicrobiano	31
7.1.1.Preparación de medio de cultivo	31
7.1.2.Preparación de cepas bacterianas	32
7.2.Preparación de soluciones de PCL con extractos bacterianos	33
7.3.Electrohilado de PCL con extractos bacterianos	34
7.4.Caracterización de fibras electrohiladas	34
7.4.1.Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	35
7.4.2.Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	35
<b>8.RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>36</b>

8.1.Actividad antimicrobiana	36
8.2.Electrohilado de PCL	38
8.3.Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	39
8.3.1.Fibras de PCLc	40
8.3.2.Fibras de PCL/NCIM2417-1	44
8.3.3.Fibras de PCL/NCIM2417-5	48
8.3.4.Fibras de PCL/NCIM2499-1	52
8.3.5.Fibras de PCL/NCIM2499-5	56
8.4.Calorimetría diferencial de barrido	61
8.5.Análisis termogravimétrico (TGA)	63
<b>9.CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>10.BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>67</b>

# Índice de Figuras y Tablas

## Figuras

Figura 1.	Causas de quemaduras.	12
Figura 2.	Quemadura de primer grado.	14
Figura 3.	Quemadura de segundo grado.	14
Figura 4.	Quemadura de tercer grado.	15
Figura 5.	Esquema del electrohilado utilizado.	21
Figura 6.	Medios de cultivo expuestos a luz ultravioleta.	32
Figura 7.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL control (400 x).	40
Figura 8.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL control (3000 x).	42
Figura 9.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL control (12,000 x).	43
Figura 10.	Histograma de distribución de los diámetros de las fibras de PCLc.	44
Figura 11.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2417-1 (400 x).	45
Figura 12.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2417-1 (3000 x).	46
Figura 13.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2417-1 (12, 000 x).	47
Figura 14.	Histograma de distribución de los diámetros de las fibras de PCL/NCIM2417-1.	48
Figura 15.	Fibras de PCL /NCIM2417-5 (400 x).	49
Figura 16.	Fibras de PCL /NCIM2417-5 (3000 x).	50
Figura 17.	Fibras de PCL /NCIM2417-5 (20,000 x).	51
Figura 18.	Histograma de PCL /NCIM2417-5. Distribución de diámetros de fibras.	52
Figura 19.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-1 (400 x).	53
Figura 20.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-1 (3,000 x).	54
Figura 21.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-1 (12,000 x).	55
Figura 22.	Histograma de PCL /NCIM2499-1. Distribución de diámetros de fibras.	56

Figura 23.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-5 (4000 x).	57
Figura 24.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-5 (3,000 x).	58
Figura 25.	Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-5 (12,000 x).	59
Figura 26.	Histograma de PCL /NCIM2499-5. Distribución de diámetros de fibras.	60
Figura 27.	Termograma DSC de las fibras de PCL, PCL/NCIM2417 y PCLNCIM2499.	63
Figura 28.	Análisis termogravimétrico de las fibras de PCL, PCL/NCIM2417 y PCLNCIM2499.	65

### **Tablas**

Tabla 1.	Aplicaciones de los actinomicetos marinos.	24
Tabla 2.	Medicamentos provenientes del género Streptomyces.	26
Tabla 3.	Parámetros del electrohilado de PCL con extractos bacterianos.	34
Tabla 4.	Actividad antimicrobiana de los extractos de actinomicetos NCIM2417 y NCMI2499.	36
Tabla 5.	Análisis de calorimetría diferencial de barrido de las fibras PCL, PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499.	61
Tabla 6.	Análisis termogravimétrico de las fibras PCL, PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499.	63

## RESUMEN

Los actinomicetos marinos son una familia de bacterias muy diversa que, a lo largo de los años, han sido de gran interés biomédico gracias a su amplia variedad de propiedades, las cuales principalmente poseen propiedades antibacterianas, anticancerígenas, antifungales, entre otras. En este estudio, se analiza la viabilidad de utilizar fibras electrohiladas poliméricas con extractos de actinomicetos marinos, para ser utilizadas como sistemas antibacterianos para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Las fibras fueron caracterizadas a través de análisis termogravimétrico y la calorimetría diferencial de barrido, con el fin de evaluar su comportamiento térmico. Las fibras fueron observadas a través del microscopio electrónico de barrido para observar su morfología y, finalmente, las fibras fueron expuestas a dichas bacterias por 24 y 48 hrs. Como resultado, se pueden observar fibras homogéneas con actividad bacteriana en las tres cepas evaluadas y poseen una estabilidad térmica correspondiente a la literatura. Los resultados de este estudio son la base para la fabricación de apósitos cutáneos para el tratamiento de heridas de piel y quemaduras.

**Palabras clave:** Actividad antibacteriana; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomona aeruginosa*; Electrohilado; Actinomicetos marinos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempo atrás, a partir de metabolitos secundarios de diversas especies de microorganismos, se han desarrollado medicamentos con el objetivo de tratar enfermedades y mejorar la salud. Un gran ejemplo son los actinomicetos, pues su utilización remonta desde el año 1944, en donde la especie *S. griseus*, del género *streptomyces*, fue utilizada para el tratamiento de tuberculosis debido a las funciones que posee, desarrollando el medicamento estreptomycinina (De Lima, 2012).

Los actinomicetos pertenecen a la clase de las actinobacterias, las cuales tienen un estilo de vida micelial y experimentan una diferenciación morfológica compleja, siendo microorganismos unicelulares que comparten características tanto de las bacterias como de los hongos. Tienen un metabolismo secundario extenso teniendo la capacidad de producir antibióticos, así como compuestos anticancerígenos, antihelmínticos y antifúngicos. Se encuentran ampliamente distribuidos en los ecosistemas terrestres y acuáticos, por lo que, al variar sus características, además de ser utilizados para el área de la medicina, también participan en diversas áreas como lo es la biotecnología, la agricultura y medio ambiente (Barka, E. A., 2016).

La finalidad del trabajo presente es crear nanofibras de polímero, específicamente poli (caprolactona), cargadas con extractos bacterianos siendo utilizadas las actinobacterias, con el fin de poder desarrollar un apósito que pueda aliviar las heridas por quemaduras. Una quemadura puede causar alteraciones sistemáticas y locales en la piel, dependiendo de la temperatura y tiempo de exposición, afectando a todo aquel que sufra un accidente por contacto térmico, exposición al sol, contacto eléctrico, radiación o contacto químico. En este tipo de lesiones, la barrera contra bacterias, epidermis, puede verse gravemente dañada, por lo que existe la posibilidad de la presencia de infecciones en el área afectada (Pompa, 2017).

Actualmente los tratamientos para quemaduras tienen como objetivo restablecer la homeostasis en el menor tiempo posible, previniendo infecciones y disminuyendo el dolor; pueden encontrarse en presentaciones como tratamiento tópico o como apósitos. Cada tratamiento tiene características propias para lograr la restauración de la piel, sin embargo, en

el caso de los tratamientos tópicos pueden producir toxicidad, irritación e incluso pueden retrasar la cicatrización de la herida, mientras que los apósitos requieren cambios constantes, resultando dolorosos. Si bien podemos encontrar apósitos con polímeros, la novedad de este trabajo recae en la utilización de los extractos bioactivos provenientes de actinobacterias para aprovechar las propiedades y funciones de sus metabolitos secundarios.

Para la realización de las fibras poliméricas, se utilizó la técnica de electrohilado, obteniendo como resultado escalas nanométricas de las fibras. El método consiste en la aplicación de un campo eléctrico proveniente de una fuente de alto voltaje de corriente directa, obteniendo fuerzas electroestáticas que ocasionan un estiramiento coaxial de la solución, obteniendo como resultado nanofibras. Esta técnica fue utilizada debido a las propiedades que aporta, como porosidad y alta capacidad de absorción.

Las fibras obtenidas consisten en poli (caprolactona), un polímero natural, biodegradable, y en extractos bacterianos de actinobacterias. El PCL se biodegrada en un lapso de meses a varios años dependiendo del peso molecular, el grado de cristalinidad del polímero y las condiciones de degradación, incluso muchos de los microorganismos en la naturaleza pueden biodegradarlo completamente. Cabe mencionar que, aunque puede ser degradado enzimáticamente en el medio ambiente, este no puede ser degradado enzimáticamente en el cuerpo. Dentro de las propiedades del PCL se encuentra la degradabilidad controlada, miscibilidad con otros polímeros, biocompatibilidad y cuenta con potencial para ser hecho de monómeros derivados de fuentes renovables. Respecto a su utilización, entra en diferentes campos como ingeniería de tejidos y microelectrónica (Labet, & Thielemans, 2009).

Finalmente, el objetivo de este trabajo consiste en la síntesis y caracterización de fibras poliméricas a partir de extractos de actinomicetos mediante la técnica de electrohilado con el fin de que dichas fibras puedan ser utilizadas como un método terapéutico en lesiones cutáneas, como lo son las quemaduras.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Quemaduras**

Se le denomina quemadura a la destrucción térmica de la piel, la cual causa graves alteraciones sistemáticas y locales. La piel humana puede tolerar temperaturas de hasta 40°C por periodos de tiempo relativamente largos antes de producirse una quemadura (Hanumadass, 2006). Así mismo, una quemadura es un tipo de daño físico o lesión causada por calor excesivo, por contacto directo o indirecto; puede ser el resultado de efectos térmicos, eléctricos, químicos o de energía electromagnética. La cantidad de destrucción tisular depende de la temperatura y tiempo de exposición. Como consecuencia, pueden causar zonas de hiperemia, estasis, necroptosis y una respuesta inflamatoria sistémica que busca detener y reparar dicho daño. De igual manera existe la posibilidad de la presencia de infecciones en el área de lesión y los individuos pueden resultar incapacitados por un periodo de tiempo extenso (Pompa, 2017; Bunyaphatsara, et al. 1996).

#### **2.1.1. Tipos de quemaduras según su exposición**

Las lesiones por quemaduras a menudo resultan de una transferencia de energía al cuerpo. Hay muchos tipos de quemaduras causadas por contacto térmico, de radiación, químico o eléctrico, o por fricción (Pompa, 2017).



Figura 1. Causas de quemaduras.

Las quemaduras térmicas son quemaduras debidas a fuentes de calor externas que elevan la temperatura de la piel y tejidos. Estas quemaduras causan costras de piel carbonizada de color negro, o bien con aspecto marmóreo, blanco y duro; también pueden causar la muerte celular del tejido. Metales calientes, líquidos hirvientes, vapor y llamas, cuando entran en contacto con la piel, pueden provocar quemaduras térmicas (Ronald, 2019; Arias, 2001).

Por otro lado, las quemaduras por radiación son causadas por la exposición prolongada a los rayos ultravioleta del sol, de igual forma por la exposición a otras fuentes de radiación, como la terapéutica, como los tratamientos contra el cáncer (Ronald, 2019).

Además, las quemaduras químicas son causadas por ácidos fuertes, álcalis, detergentes, o disolventes que entran en contacto con la piel o los ojos. También, las quemaduras eléctricas son causadas por corriente eléctrica, ya sea corriente alterna (CA) o corriente continua (CC). En el caso de las quemaduras por fricción, estas ocasionan daños directos a las células debido al calor generado por la fricción (Ronald, 2019).

### **2.1.2. Tipos de quemaduras según su grado**

La epidermis, dermis y el tejido subcutáneo son las tres capas de la piel; cada una cuenta con funciones específicas. La epidermis funciona como una barrera contra bacterias y permite mantener la humedad de la piel. La dermis provee elasticidad y protección contra traumas mecánicos, además contiene todos los vasos sanguíneos que irrigan a las capas de la piel. En una lesión por quemaduras, las funciones de las capas de la piel se ven afectadas según sea el daño, clasificándose en primer, segundo o tercer grado dependiendo de qué tan profunda y severamente penetran la superficie de la piel, así como el tamaño de la herida (Lloyd, 2012).

En la literatura se puede encontrar frecuentemente el cuarto grado de quemadura, en el que la lesión llega a los músculos y huesos, teniendo como resultado un daño completo en el sistema nervioso del área, incluso se pueden encontrar el quinto y sexto grado con menor frecuencia en los que describen con más gravedad el daño ocasionado. Sin embargo, estos últimos tres grados entran dentro de las quemaduras de grosor total en la categoría del 3er grado, por lo que comúnmente las quemaduras son clasificadas en tres grados (Kearns, 2013).

#### **2.1.2.1. Quemaduras de primer grado (superficiales)**

Las quemaduras de primer grado afectan solamente la capa externa de la piel, la epidermis, con leve alteración eritematosa de la piel. El lugar de la quemadura es rojo, doloroso, seco y no hay ampollas. Las quemaduras solares leves son un ejemplo. El desecado de la capa exterior de la epidermis, se descama y se regenera en una o dos semanas sin dejar cicatriz. El daño tisular a largo plazo es raro y a menudo consiste en un aumento o disminución del color de la piel. Para este tipo de quemaduras se requiere un cuidado local en la herida y manejo de fluidos para restaurar la humedad en la piel (Lloyd, 2012).

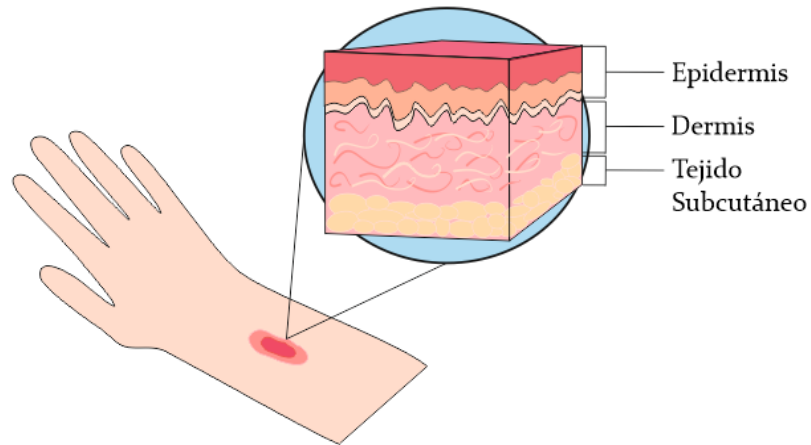


Figura 2. Quemadura de primer grado.

### 2.1.2.2. Quemaduras de segundo grado (espesor parcial)

Las quemaduras de segundo grado involucran la totalidad de la epidermis y parte de la capa inferior de la piel, la dermis, la cual se ve envuelta en necrosis dérmica. Dependiendo de la profundidad de la lesión, las quemaduras se dividen en dos subgrupos: quemadura superficial de segundo grado (superficie parcial), y quemadura profunda de segundo grado (parcial profundo) (Hanumadass, 2006).

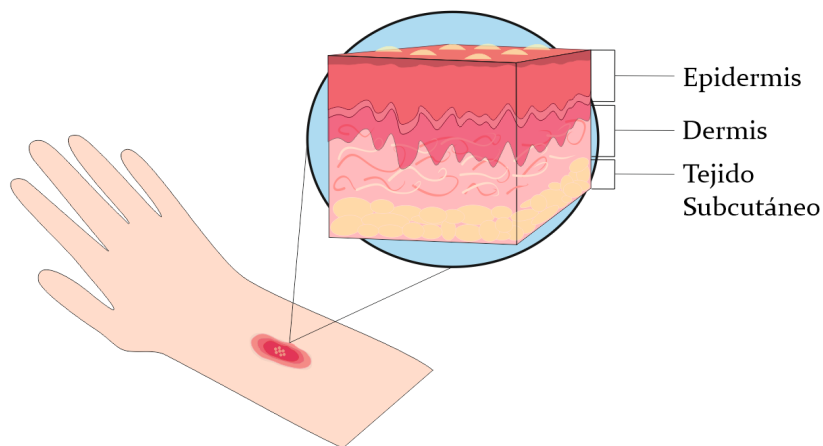


Figura 3. Quemadura de segundo grado.

- a) Quemadura superficial de segundo grado (superficie parcial): Constan de severo aspecto eritematoso y húmedo de la piel, con formación de ampollas cristalinas. El tiempo estimado de curación es de dos semanas, generalmente no causan cicatrices mas no se descarta la posibilidad, así como el posible cambio de pigmentación en la zona (Lloyd, 2012).
  
- b) Quemadura profunda de segundo grado (parcial profundo): Tienen un aspecto suave, seco seroso y blanco, después que el material desvitalizado haya sido removido. El tiempo de curación sobrepasa las 3 semanas y usualmente dejan cicatrices (Lloyd, 2012).

### 2.1.2.3. Quemaduras de tercer grado (grueso total)

Las quemaduras de tercer grado destruyen la epidermis y dermis, así como el tejido subyacente, posiblemente involucrando músculos y hueso. El lugar de la quemadura puede verse blanco o ennegrecido y carbonizado. No hay sensación en el área ya que las terminaciones nerviosas se destruyen (Hanumadass, 2006).

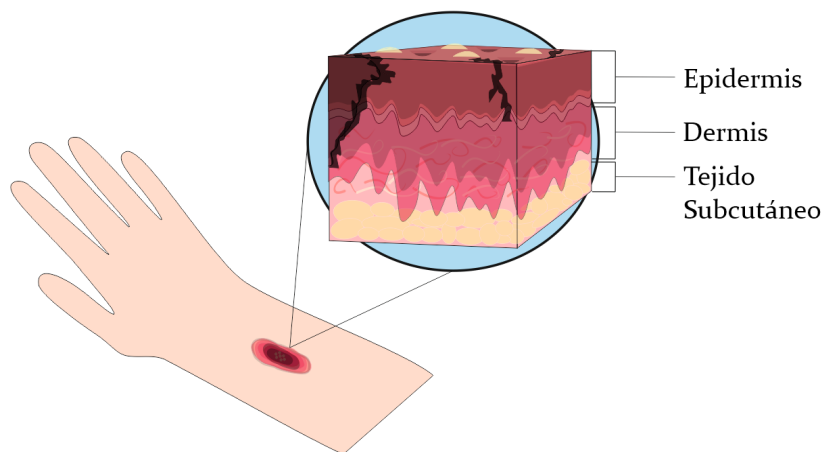


Figura 4. Quemadura de tercer grado.

Clásicamente se han descrito las quemaduras como heridas de primer, segundo y tercer grado; con respecto a la profundidad, los términos más descriptivos son quemaduras de espesor parcial y quemaduras de espesor total. El diagnóstico diferencial de la profundidad por quemadura define lo siguiente:

- a) Quemaduras de espesor parcial: Tienen sensibilidad normal o aumentada al dolor y temperatura, suelen presentar ampollas grandes de pared gruesa con aumento de tamaño. Su textura es normal y firme; su color es rojo y blanquecino bajo presión y relleno (Hanumadass, 2006).
- b) Quemaduras de espesor total: Tienen sensación anestésica al dolor y temperatura; las ampollas pueden o no tener pared delgada y no aumentan de tamaño. Su textura es firme y curtida; su color es blanco, marrón, negro o rojo. En este caso, si el color es rojo, no blanquea bajo presión (Hanumadass, 2006).

Los parámetros de espesor parcial y total ayudan a determinar el tamaño de la quemadura, siendo éste un estimado del porcentaje del cuerpo cubierto parcial o totalmente. La determinación de la profundidad o espesor de la quemadura puede diferir en los días posteriores a la lesión debido a que el daño tisular puede continuar esparciéndose por efectos termales, es por eso que es recomendable realizar evaluaciones frecuentes a todo tipo de quemaduras para evitar el aumento de daño tisular (Lloyd, 2012).

## **2.2. Tratamientos actuales de las quemaduras**

Los tratamientos contra quemaduras son una serie de medidas que deben evolucionar dinámicamente de acuerdo a las necesidades del individuo; pueden ser divididos en generales y locales. Sus objetivos son restablecer la homeóstasis en el menor tiempo posible y prevenir complicaciones como aumento de dolor e infecciones. Es de especial importancia que el tratamiento asegure una vía aérea permeable y una adecuada ventilación, efectuándose bajo máxima asepsia y analgesia adecuada (Castillo, 2003).

Como tratamiento inmediato para quemaduras de primer grado es recomendable el uso de agua fría en el área afectada, debido a que disminuye el exceso de temperatura y profundidad, sin embargo, este método se encuentra limitado pues su duración contra los efectos y síntomas es corta, por lo que debe utilizarse como tratamiento temporal previo a una

adecuada revisión que determine la forma correcta de tratar la herida. Es importante mencionar que el agua utilizada no sea helada ya que puede dañar aún más e incluso causar hipotermia; este tratamiento únicamente debe ser utilizado superficialmente. Después de la evaluación se otorgan tratamientos para la disminución del dolor y se procede a limpiar la herida utilizando únicamente agua destilada para eliminar residuos (Lloyd, 2012).

La utilización de agentes antimicrobianos tópicos ha permitido disminuir la incidencia de infecciones, siendo la sulfadiazina de plata el más ampliamente utilizado en nuestro medio. Como cobertura cutánea definitiva, pueden emplearse autoinjertos de piel, láminas de queratinocitos autólogos cultivados y piel artificial o íntegra. En pacientes con quemaduras muy extensas, puede optarse por una cobertura cutánea transitoria que reduce la pérdida de líquidos, electrolitos y proteínas, disminuye el dolor, limita la colonización y proliferación bacteriana, y promueve la cicatrización en espera de conseguir las condiciones locales y sistémicas que permitan una cubierta definitiva (Castillo, 2003).

El factor que determina el éxito de la curación de la herida es la humedad, pues al tener un ambiente húmedo se previene la pérdida de fluidos promoviendo así la reparación de la piel (Lloyd, 2012).

**a) Tratamientos tópicos:**

Los productos tópicos para la curación de heridas ayudan a prevenir infecciones y preparan la herida para cerrarla. Para quemaduras superficiales puede utilizarse miel, aloe-vera o un ungüento con propiedades antibióticas. El componente lipídico de estos tratamientos acelera la reparación de la piel dañada y reduce la resequead.

Aloe-vera: Es una planta medicinal que cuenta con propiedades antiinflamatorias y curativas, lo cual detiene el daño en la piel y agiliza su restauración para cicatrizar la herida, puede encontrarse en presentación de crema y gel. Para funcionar en su máxima eficacia, el gel debe prepararse al momento, de tal manera que la planta se encuentre fresca, de lo contrario si éste es preparado con anterioridad difícilmente se podrán observar mejoras en la herida. Por otra parte, la crema suele tener variantes respecto a la curación debido a la

inestabilidad de su ingrediente activo que en su caso son glicoproteínas. Una de sus desventajas es que no posee propiedades para la prevención de infecciones.

Bacitracina: Provee una estrecha cobertura antimicrobiana, su costo es bajo y su aplicación no causa dolor. Puede ser utilizada en el área facial o cerca de membranas mucosas. Requiere de cambios frecuentes del vendaje.

Acetato de mafenida (Sulfamylon): Es utilizado para quemaduras profundas, provee una cobertura microbiana de amplio espectro y penetra las costras. Su desventaja es que puede retrasar la curación o causar acidosis metabólica.

Mupirocina (Bactroban): Posee una amplia cobertura antimicrobiana Gram positiva; puede ser utilizada en el área facial. Su precio es costoso y requiere de cambios frecuentes del vendaje.

Sulfadiazina de plata (Silvadene): Es el tratamiento antimicrobiano estándar, provee una cobertura antimicrobiana de amplio espectro, su aplicación es indolora y es utilizada para quemaduras de espesor parcial. Tiene restricciones para pacientes embarazadas, en periodo de lactancia, recién nacidos, personas con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (favismo) y en personas con alergia a la sulfadiazina. Requiere de cambios frecuentes del vendaje, lo cual puede retrasar la curación de la herida, además de que puede llegar a manchar el tejido.

**b) Apósitos:**

Para quemaduras de espesor parcial se recomienda utilizar un agente antimicrobiano tópico o mejor aún, un apósito oclusivo absorbente para reducir el dolor, promover la curación de la herida y prevenir la desecación. La diferencia entre tratamientos tópicos como la sulfadiazina y los apósitos, es que los apósitos han demostrado otorgar una rápida curación, disminución de dolor y menor cambios de apósitos en comparación.

Aquacel Ag: Es un tipo de apósito absorbente impregnado con plata y tiene cobertura

antimicrobiana de amplio espectro. Reduce el dolor provocado por la quemadura, disminuyendo el uso de analgésicos; los cambios de apósito son menores y causa que la herida cierre más rápido que otros tratamientos.

Biobrane: Es un tipo de apósito que se adhiere a la piel facilitando la recuperación de la función estructural y biológica, reduciendo el dolor. Tiene un mejor efecto en quemaduras superficiales que en las profundas.

Mepitel: Es un apósito con adhesivo de silicona no absorbente. Permite la filtración de exudado y ayuda a la cicatrización de heridas profundas.

Apósitos hidrocoloides: Están conformados por gelatina, pectina y carboximetilcelulosa de sodio en una matriz polimérica adhesiva; provee un medio húmedo y minimiza el daño en la piel.

#### c) Otros tratamientos y cuidados

Tratamientos a base de agua: Se utiliza la terapia de niebla con ultrasonido para limpiar y estimular el tejido de la herida.

Fluidos para prevenir la deshidratación: Son líquidos intravenosos para prevenir la deshidratación y la insuficiencia orgánica.

Medicamentos para el dolor y la ansiedad: Los procedimientos para la curación de heridas pueden ser increíblemente dolorosos, por lo que puede aplicarse morfina y medicamentos contra la ansiedad, especialmente para los cambios de apósito.

Medicamentos que combaten las infecciones: Si se desarrolla una infección, es posible que necesite antibióticos por vía intravenosa para evitar su desarrollo o bien, para prevenirla.

### **2.3. Desventajas de los tratamientos actuales de quemaduras**

Los tratamientos actuales de quemaduras tienen la función principal de reducir el dolor, disminuir la contaminación, prevenir posibles infecciones y si es posible conseguir una curación rápida con una mínima cicatrización en las quemaduras superficiales o de primer grado. Sin embargo, tiene desventajas que deben evaluarse al momento de su elección pues se ha demostrado que ciertos tratamientos tópicos comunes como los de plata, pueden llegar a producir toxicidad, irritación celular, inducir un retraso en la cicatrización e incluso el tratamiento puede ser inactivado por fluidos de la herida, lo cual requiere volver a aplicar el producto pudiendo resultar doloroso (Local, 2014). En el caso de los apósitos, la gran parte requiere cambios frecuentes causando dolor e incomodidad adicional a la de la herida.

### **2.4. Técnica de electrohilado**

El proceso de electrohilado o electrospinning permite obtener nanofibras por medio del estiramiento coaxial de una solución viscoelástica; depende de fuerzas electroestáticas obtenidas por la aplicación de un campo eléctrico por una fuente de alto voltaje de corriente directa DC entre el capilar y el colector. El electrohilado consiste en hacer girar soluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, moviéndose en la dirección del campo eléctrico y elongándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas (Duque, 2014). Una vez que las fuerzas electroestáticas superan la tensión superficial de la solución del polímero en el capilar cargado a un voltaje determinado, cierta cantidad de la solución es atraída y liberada finamente desde la punta del capilar. La solución se elonga mientras que el solvente se evapora produciendo y depositando así las nanofibras en el colector. Esta técnica aporta a los elementos desarrollados diversas características en las nanofibras como: Amplia superficie por unidad de área, alta porosidad, alta capacidad de absorción y una serie de propiedades mecánicas siendo atractivas a nivel biotecnológico (Vrieze, 2008).

La técnica es versátil y de fácil ensamble lo que ha permitido procesar una gran variedad de polímeros, integrando en los últimos años otras clases de materiales; los elementos básicos que lo conforman son:

- Bomba Infusora
- Capilar
- Fuente de alto voltaje
- Plato colector

En donde el capilar es por donde es expulsada la solución y los electrodos de la fuente de voltaje son conectados en la salida de la solución (voltaje) y otro en el plato colector (tierra), como se muestra en la figura 5.

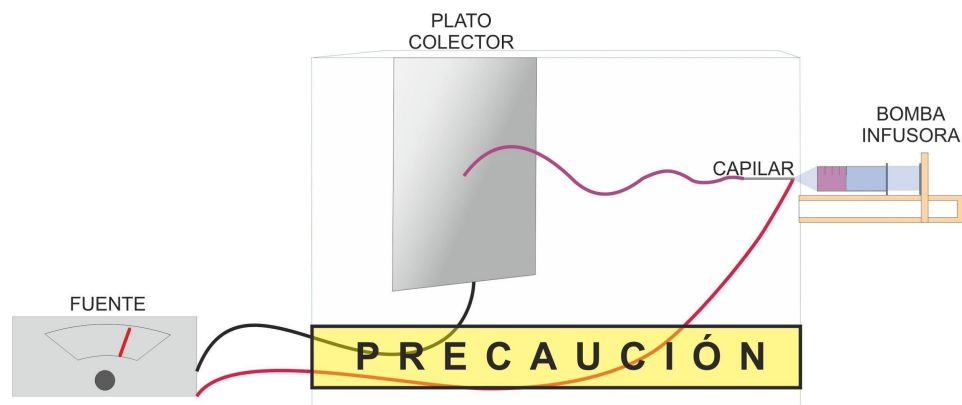


Figura 5. Esquema del electrohilado utilizado.

Existen diversos parámetros que pueden complicar el proceso de electrohilado afectando la integridad de los resultados, tales parámetros pueden dividirse en: Parámetros de la solución, de proceso y ambientales.

#### a) Parámetros de la solución

Dentro de esta categoría se encuentra la concentración de la solución del polímero, la cual es importante para la formación de nanofibras ya que puede modificar el diámetro de las fibras. Si la concentración es muy baja, en lugar de hacer nanofibras (electrohilado), se obtendrán nanopartículas (electrospray) debido a la baja viscosidad y a la alta tensión superficial de la solución. Si la concentración es ligeramente baja resultará en una combinación de gránulos y fibras. Por último, si la concentración es muy alta se producirán

fibras no nanoescaladas debido a que el aumento en la concentración ocasionará que el diámetro de las fibras incremente. Otro parámetro de la solución es la viscosidad. Ésta determina la morfología de las fibras, siendo continuas y lisas cuando la viscosidad es adecuada (Li, 2013).

#### b) Parámetros de voltaje

El gasto es uno de los parámetros más importantes ya que un gasto rápido provocará gránulos y fibras gruesas debido al poco tiempo de secado antes de llegar al colector, por lo que siempre es recomendable trabajar con un gasto lento, dándole suficiente tiempo a la solución para la polarización. Respecto a la distancia del colector con el capilar, si estos se encuentran muy cerca uno del otro se tendrá un efecto similar al del gasto rápido, la solución no tendrá suficiente tiempo para solidificarse. En cambio, si la distancia es grande se tendrá como resultado la aparición de gránulos. El voltaje puede influir en el diámetro de las fibras al igual que otros factores como la concentración del polímero o la distancia entre el colector y el capilar (Li, 2013).

#### c) Parámetros ambientales

Dentro de los ambientales, la temperatura y la humedad juegan un papel muy importante afectando significativamente el diámetro promedio de las nanofibras. Se ha demostrado que la temperatura afecta a 2 parámetros principales. Un primer parámetro es la tasa de evaporación del solvente, la cual incrementa al aumentar la temperatura. El segundo parámetro es la viscosidad de la solución del polímero, la cual decrece al aumentar la temperatura (Vrieze, 2008). Respecto a la humedad, la humedad baja puede ocasionar el secado del solvente y al mismo tiempo incrementar su velocidad de evaporación. En cambio, una humedad alta puede ocasionar fibras gruesas (Li, 2013).

## **2.5.Generalidades de los actinomicetos marinos**

Los actinomicetos pertenecen al dominio de las bacterias y a la clase de las actinobacterias, las cuales son un grupo de microorganismos unicelulares que comparten características tanto de las bacterias como de los hongos y se encuentran distribuidas en ecosistemas terrestres y acuáticos. Respecto a los actinomicetos marinos, dentro de sus funciones se encuentra la degradación de todo tipo de sustancia orgánicas como celulosa y polisacáridos. Su reproducción puede ser binaria, o bien por medio de la producción de esporas (Ranjani, 2016). Los compuestos bioactivos de los actinomicetos marinos poseen estructuras químicas distintas, las cuales pueden formar la base para la síntesis de nuevos medicamentos que podrían usarse para combatir patógenos resistentes (Subramani, 2012).

### **2.5.1. Aplicaciones de los actinomicetos**

Los actinomicetos son reconocidos por ser una fuente prometedora de una amplia gama de enzimas y por producir metabolitos primarios y secundarios. Dentro de sus aplicaciones se encuentra la producción de diversos medicamentos con funciones antitumorales, anticancerígenas y antibióticos. *Streptomyces*, *Salinispora* y *Micromonospora* son los mayores géneros productores de importantes medicamentos (Ranjani, 2016). En la tabla 1 se encuentran las aplicaciones de cada uno de los géneros mencionados.

El género *Streptomyces*, perteneciente a la familia *Streptomycetaceae*, son actinomicetos aerobios Gram-positivos formadores de esporas, altamente oxidativos que forman ramificaciones extensas. La propiedad más interesante de los *Streptomyces* es la capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos, como antifúngicos, antivirales, antitumorales, antihipertensivos, inmunosupresores y especialmente antibióticos, debido a que el 80% provienen de los *Streptomyces*, haciendo al género el mayor productor de antibióticos; su objetivo principal es inhibir el crecimiento bacteriano (De Lima, 2012).

Por otra parte, el género *Salinispora* pertenece a la familia *Micromonosporaceae*, del cual se desprenden únicamente 3 especies nombradas, *S. arenicola*, *S. pacifica* y *S.tropica*, de las cuales *S. arenicola* y *S.tropica* comparten similitudes como agentes anticancerígenos

(Millán-Aguiñaga, 2017).

Por último, *Micromonospora* es un género perteneciente a la familia Micromonosporaceae y es reconocido por ser una fuente de metabolitos secundarios de gran importancia para la biomedicina, así como por el desarrollo que causa en el crecimiento de plantas y por el papel que puede desempeñar en la descomposición de la biomasa para biocombustibles. Las especies de éste género son conocidas por sintetizar antibióticos, sobre todo aminoglucósidos, enediyne y oligosacáridos, así como antibióticos antitumorales. (Hirsch, 2010).

Tabla 1. Aplicaciones de los actinomicetos marinos.

Actinomiceto	Actividad biológica	Aplicación	Referencia
<b>Género: Streptomyces</b>			
<i>S. griseus</i>	Produce gran cantidad de metabolitos secundarios de tipo antibióticos y antitumorales.	gran de tipo y forma eficaz contra la tuberculosis.  Para inhibir el crecimiento de esporas y micelios de diversos hongos fitopatógenos.  Para bloquear la inactivación de los canales de sodio.	Gómez, 2002
<i>S. cattleya</i>	Sintetiza metabolitos fluorados.	Antibióticos: tienamicina, cefamicina C, penicilina N.	Barbe, 2011
<b>Género: Micromonospora</b>			
<i>M. lupini</i>	Produce antraquinonas.	Antitumoral.	Hirsch, 2010
<i>M. purpurea</i>	Produce gentamicina.	Antibiótico para tratar distintos tipos de infecciones causadas por	Talukdar, 2016

*Escherichia coli*, *Proteus* y  
*Pseudomonas*

**Género: Salinispora**

<i>S. tropica</i>	Agente anticancerígeno	Producción salinosporamida A.	de Fenical, 2009
<i>S. arenicola</i>	Agente anticancerígeno	Producción salinosporamida.	de Fenical, 2009

---

Los microorganismos productores de metabolitos secundarios sintetizan moléculas complejas y bioactivas en la fase de retraso y en la fase estacionaria de su crecimiento. Sin embargo, los actinomicetos, en especial el género *Streptomyces*, puede producir metabolitos secundarios en las fases exponenciales, estacionaria y de muerte. Parece ser que el agotamiento de nutrientes en tiempos de problemas ambientales, limita las condiciones de crecimiento permitiendo la formación de metabolitos secundarios (Harir, 2018).

Algunos ejemplos de los antibióticos provenientes de actinobacterias son ansamicinas (rifamicina), macrólidos (eritromicina, azitromicina y claritromicina), aminoglucósidos (estreptomicina, kanamicina, tobramicina, gentamicina y neomicina), tetraciclinas, antraciclinas (doxorrubicina), y  $\beta$ -lactama (penicilina, cefalosporina, carbapenems y monobactams). Las especies pertenecientes al género *Streptomyces* son capaces de producir un gran número de medicamentos para tratar el cáncer y enfermedades relacionadas con el corazón, así como antibióticos para tratar infecciones causadas por bacteria y hongos (Harir, 2018).

En la tabla 2 se encuentran ejemplos de medicamentos provenientes del género *Streptomyces*.

Tabla 2. Medicamentos provenientes del género *Streptomyces* (Harir, 2018).

Compuesto antibiótico	Especie de <i>Streptomyces</i>	Aplicación
Frigociclina	<i>S. griseus</i>	Antibacteriano
Tetraciclina	<i>S. achromogenes</i>	Antimicrobiano
Rapamicina	<i>S. hygrosopicus</i>	Inmunosupresor; Antifúngico
Mitomicina	<i>S. lavendulae</i>	Antitumoral
Higromicina	<i>S. hygrosopicus</i>	Antimicrobiano; Inmunosupresor.

Seguido de los antibióticos, las enzimas son el producto más importante de los *Streptomyces*, formando proteasas, lipasas, celulasas, amilasas, pectinasas y xilanasas. Las proteasas regulan la actividad de diversas proteínas, modulan sus interacciones, además crean nuevas moléculas bioactivas, contribuyen en el proceso de información celular, generan, transducen y amplifican señales moleculares. Es por esto que las proteasas influyen en la replicación y transcripción del ADN, así como en la proliferación y diferenciación celular, siendo sus características más importantes, para el tema de las quemaduras, la reparación de heridas y hemostasia. Dentro de las aplicaciones industriales, se encuentra la pronasa proveniente de *S. griseus* y la kerase de *Streptomyces fradiae*, la cuales se utilizan para la producción comercial de productos biotecnológicos como proteínas hidrolizadas de diferentes fuentes de proteínas (Harir, 2018; López, 2008).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Bacterias en fibras poliméricas

El uso de bacterias en fibras poliméricas se ha encontrado en diversos estudios realizados anteriormente. A continuación, se enlistan ejemplos con el tipo de polímero y bacterias que fueron utilizadas, así como el objetivo de cada uno.

- 1) Uso de fibras poliméricas de óxido de polietileno 99-Polipropileno óxido 67-polietileno óxido 99 triblock, creado mediante electrohilado, encapsulando *Pseudomonas*, *Zymomonas* y *Escherichia*. La presencia de bacterias dentro de las fibras fue confirmada por medio de microscopía de fluorescencia y SEM.

Su objetivo fue demostrar el potencial de la técnica de electrohilado para la encapsulación e inmovilización de bacterias en forma de una biopelícula sintética, mientras conservan su actividad metabólica (Liu, 2009).

- 2) Uso de fibras poliméricas de polietileno y polipropileno con muestras de *Escherichia coli*; *Bacteroides distasonis* y *Staphylococcus epidermidis*.

Su proyecto tuvo como objetivo observar la rapidez con la que las bacterias migran a través de la fibra polimérica en un medio de agar (Mahmoud, 1993).

- 3) Uso de fibras naturales, polímeros (celulosa acetato butirato y poli (ácido L-láctico)) y la bacteria *Acetobacter xylinum*.

El propósito de su estudio es modificar las superficies de las fibras naturales utilizando bacterias y su celulosa para mejorar su adhesión a polímeros renovables (Pommet, 2008).

- 4) Uso de la bacteria *Lactobacillus acidophilus* para encapsularla en nanofibras de diferentes polímeros (poli (vinil alcohol) y poli (vinil pirrolidona)).

Su estudio tuvo como objetivo investigar la capacidad del electrohilado para la administración de biodrogas (Nagy, 2014).

- 5) Encapsulación de bacterias y virus en nanofibras electrohiladas con el polímero PVA, las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* y *Staphylococcus albus*.

Su proyecto tuvo como propósito encapsular y mantener la activación del material biológico (Salalha, 2006).

- 6) Nanofibras Compuestas de Polímero/Bacterias creadas por electrohilado de bacterias vivas protegidas por micropartículas de hidrogel.

Su estudio tiene como objetivo la encapsulación de bacterias (*Micrococcus luteus*) vivas en el polímero PEO y partículas de hidrogel de PVA como agente protector de las bacterias (Gensheimer, 2011).

### **3.2. Actinomicetos en fibras poliméricas**

Hasta el momento no se ha encontrado estudio alguno que involucre actinomicetos en la realización de nanofibras poliméricas.

### **3.3. Problemática de las quemaduras**

Según los datos más recientes de la organización mundial de la salud (OMS), las quemaduras son un problema de salud pública a nivel mundial provocando alrededor de 180,000 muertes al año, siendo las lesiones por quemaduras no fatales las principales causas de pérdida de años de vida y morbilidad las cuales conllevan a una hospitalización prolongada, desfiguración y discapacidad. La mayoría se produce en los países de ingreso bajo y mediano sobre los de ingreso alto, existiendo una correlación con la posición socioeconómica dentro de cada país. Estas lesiones son prevenibles si se cuenta con medidas de seguridad adecuadas, sin embargo, existen factores de riesgo que aumentan la probabilidad de quemaduras, sobre todo en el ámbito doméstico y laboral en donde existe una exposición al fuego o acceso fácil a químicos. Las estadísticas demuestran que las quemaduras predominan en mujeres y niños siendo menos comunes en hombres (Organización Mundial de la Salud, 2008).

### **3.4. Apósitos cutáneos en las quemaduras.**

Existen numerosos materiales para apósitos cutáneos disponibles para el tratamiento parcial de quemaduras. La selección de apósitos debe basarse en sus efectos de curación, en su facilidad de aplicación y remoción, así como en sus requerimientos de cambio de apósito, costo y confort del paciente. Las heridas por quemaduras suelen perder grandes cantidades de

fluidos por medio de la evaporación y exudación, por lo que es necesario que los apósitos tengan la capacidad de absorber todo el fluido y mantener una alta humedad en la herida para fomentar la granulación y asistir a la epitelización. Como principal función, el apósito debe proveer una barrera bacteriana para prevenir infecciones, así como contar con características mecánicas que se acoplen al movimiento del individuo.

Dentro de los apósitos más comunes se encuentra la combinación de una gasa impregnada con parafina y un algodón absorbente de lana, y la crema de sulfadiazina de plata utilizada desde 1968 para minimizar el riesgo.

En el presente trabajo se utilizó el extracto NCIM 2417 correspondiente a la especie *S. aureofaciens*. A la especie se le atribuye la producción de antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas; su primer antibiótico fue la clortetraciclina (aureomicina). Como mecanismo de acción, las tetraciclinas pueden tener un efecto bacteriostático o bien, en altas concentraciones actúa como bactericida (Morejón, 2003). El segundo extracto utilizado fue NCIM 2499 correspondiente a la especie *S. lavendulae*. A la especie se le atribuye la producción de estreptotricina.

#### **4. HIPÓTESIS**

Debido a que anteriormente se han realizado exitosamente fibras poliméricas cargadas con extractos bacterianos para diversas aplicaciones, aunque no se hayan realizado con actinomicetos específicamente, se puede suponer que es viable el desarrollo de fibras poliméricas con extractos de especies de actinomicetos de manera efectiva.

Respecto a la prueba antimicrobiana, se sospecha que las fibras serán capaces de proveer un efecto antimicrobiano debido a las propiedades de las especies utilizadas de los actinomicetos, *S.aureofaciens* y *S.lavendulae*, puesto que su género *Streptomyces* es conocido por poseer un efecto antimicrobiano, entre otros .

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Con la realización de este estudio, se espera crear fibras poliméricas para aplicaciones biomédicas, que puedan ser utilizadas en zonas corporales afectadas por quemaduras, pie diabético y heridas, cuya función será principalmente antimicrobiana, permitiendo como consecuencia aliviar la lesión en menor tiempo con menor dolor.

Se pretende verificar la viabilidad del desarrollo de fibras poliméricas con extractos bacterianos pertenecientes a especies de actinomicetos, determinando así la existencia del extracto en las fibras, así como su respuesta antimicrobiana.

## **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

En este estudio, se busca analizar la viabilidad de utilizar fibras poliméricas electrohiladas con extractos de actinomicetos marinos, para ser utilizadas como sistemas antibacterianos para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Se desea caracterizar las fibras a través de un análisis termogravimétrico y de calorimetría diferencial de barrido, con el fin de evaluar su comportamiento térmico. Una vez obtenidas las fibras se tiene como propósito observar las fibras a través del microscopio electrónico de barrido para observar su morfología, esperando obtener fibras homogéneas con actividad bacteriana.

De igual manera, se pretende describir sus propiedades para determinar la existencia del extracto en las fibras, así como sus características físicas resultantes. Así mismo, se desea identificar los cambios existentes que puedan ocurrir al agregar el extracto bacteriano al polímero y así señalar los cambios presentes en las fibras que presentan o no el dicho extracto, permitiendo comparar puntos de fusión, descomposición, degradación, y calcinación.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1. Análisis antimicrobiano**

El análisis antimicrobiano fue realizado a los extractos crudos puros de los actinomicetos marinos. Las muestras se colocaron en el fondo de placas de 96 pocillos. Para los ensayos se utilizaron las cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, se cultivaron en un medio Mueller-Hinton previamente esterilizado durante 24 h, a 35 °C. Posteriormente, se estandarizó la absorbancia bacteriana de las cepas a 0.5 McFarland en comparación con un tubo estándar (0.132 abs a 620 nm,  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) con solución salina. Una vez que los cultivos celulares estuvieron listos, se agregaron 150 µL de medio limpio a cada pocillo en el que se colocaron las fibras. Luego, se agregaron 50 µL de cada inóculo (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y medio limpio). Como control negativo, se colocaron 150 µL de medio limpio y 50 µL de cada cepa, sin fibras. Todas las células bacterianas expuestas con fibras se incubaron durante 24 h, 35 °C. Como las fibras no se disuelven, con la ayuda de fórceps estériles, se extrajeron muestras y se colocaron en un nuevo pozo, se lavaron con 200 µL de medio limpio, se descartaron las fibras y se midió la solución en un lector de microplacas (Thermo Scientific) a 620 nm.

#### **7.1.1. Preparación de medio de cultivo**

Para la preparación del medio de cultivo, inicialmente se pesaron 2.3 g de agar nutritivo para preparar una solución de 100 ml. De acuerdo al procedimiento, se colocaron 100 ml de agua destilada en un matraz que posteriormente se colocó sobre una plancha a temperatura de 85-100 °C. Se añadió poco a poco el agar nutritivo y con ayuda de un agitador magnético se mezcló perfectamente toda la sustancia.

Dicha mezcla tenía que llegar a su punto de ebullición para que quedara lista, por lo que en el tiempo intermedio se le dio atención a la campana de extracción, en donde se llevaron a cabo procesos de desinfección y limpieza para recibir adecuadamente el agar nutritivo. Después de estar lista, en la campana de extracción se colocó dentro de los

matraces de esterilización —puestos en la autoclave durante una hora— el agar nutritivo obtenido; se dejó enfriar por aproximadamente 15 minutos.

Dentro de la campana de extracción, se colocaron cuatro cajas Petri, en las cuales se colocaron 25 ml de agar nutritivo. Durante 15 minutos dicho medio de cultivo se mantuvo expuesto a luz ultravioleta. Los medios de cultivo obtenidos fueron guardados en el refrigerador para después utilizarlos en la preparación de cepas bacterianas.

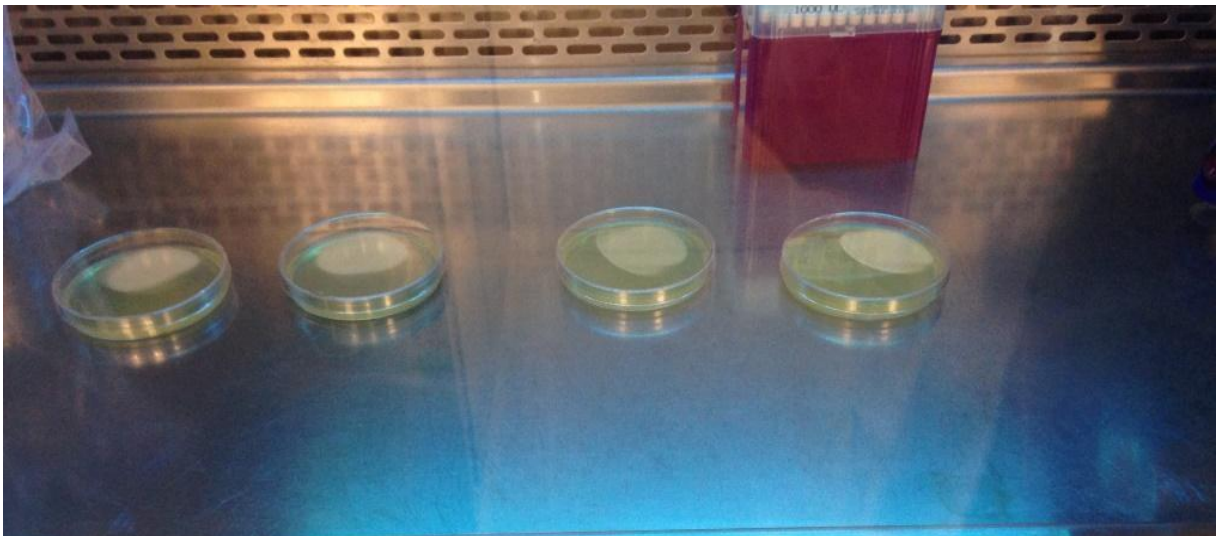


Figura 6. Medios de cultivo expuestos a luz ultravioleta.

### 7.1.2. Preparación de cepas bacterianas

- 1) Se colocaron las cuatro cajas Petri de medio de cultivo dentro de la campana de seguridad biológica tipo 2 junto con los instrumentos que se necesitan para preparar las cepas bacterianas.
- 2) Con una micropipeta se obtuvo una muestra de la bacteria *Escherichia Coli*, *Estafilococos* y *Pseudomona*.
- 3) Dichas muestras fueron colocadas en el medio de cultivo.
- 4) En el micro-incinerador se colocaron las asas correspondientes para poder sembrar dichas bacterias.
- 5) Se sembraron cada una de ellas y al terminar, a las cajas Petri se les colocó parafilm para cubrirlas.

- 6) Dentro de la incubadora se colocaron las 4 cajas Petri a una temperatura de 37 °C y durante algunos días se observaron los resultados de las respectivas cepas bacterianas.

## 7.2. Preparación de soluciones de PCL con extractos bacterianos

Para cada muestra, se utilizó una solución de PCL al 10% disuelto en cloroformo, a la cual se le agregó un porcentaje del extracto bacteriano; ambos extractos fueron agregados por separado al 1% y 5% de la solución respectivamente. Posteriormente se realizó el electrohilado de las muestras, observándolas por microscopía electrónica de barrido. El cloroformo se evapora con facilidad, si resultan quedar rastros de cloroformo, se puede utilizar un horno al vacío.

La solución del PCL se realizó al 10% respecto al cloroformo utilizado, siguiendo la siguiente relación:

$$\begin{aligned} \% \text{ m/v} &= (\text{g de soluto}) / (\text{mL de solvente}) \times 100 & (1) \\ 10 \% &= (\text{g de PCL}) / (\text{mL cloroformo}) \times 100 \end{aligned}$$

Posteriormente se agregó el extracto bacteriano a cada vial en distintas proporciones. Debido a que se contaba con 2 tipos de extractos y cada uno se adicionó en 2 porcentajes de concentración, el número total de muestras fue de 4, teniendo 2 muestras para el extracto NCIM 2417 (una al 1% y otra al 5%) y 2 muestras para el extracto NCIM 2499 (una al 1% y otra al 5%). La relación para el extracto bacteriano respecto a la solución de PCL y cloroformo fue la siguiente:

Para 1 %:

$$\begin{aligned} \% \text{ v/v} &= (\text{ml de soluto}) / (\text{mL de solución}) \times 100 & (2) \\ 1\% &= (\text{ml de extracto bacteriano}) / (\text{mL solución PCL al 10\%}) \times 100 \end{aligned}$$

Para 5 %:

$$\% \text{ v/v} = (\text{ml de soluto}) / (\text{mL de solución}) \times 100 \quad (2)$$

$$5\% = (\text{ml de extracto bacteriano}) / (\text{mL solución PCL al 10\%}) \times 100$$

Una vez obtenidas las soluciones PCLNCIM2417 y PCLNCIM2499, fueron agitadas a 220 rpm por 45 minutos a 70°C.

### 7.3. Electrohilado de PCL con extractos bacterianos

En la tabla 3 se muestran los parámetros utilizados para el electrohilado de todas las soluciones de PCL con extractos bacterianos, enlistados con su código correspondiente según su composición química, el voltaje empleado, la distancia entre el colector-capilar y el flujo. Debido a que el equipo de electrohilado con el que se trabajó es rudimentario, estos tres parámetros son los más importantes a considerar para la obtención de fibras.

Tabla 3: Parámetros del electrohilado de PCL con extractos bacterianos.\*

Código	Composición química
PCLc	PCL
PCLNCIM2417-1	PCL y NCIM 2417 al 1%
PCLNCIM2417-5	PCL y NCIM 2417 al 5%
PCLNCIM2499-1	PCL y NCIM 2499 al 1%
PCLNCIM2499-5	PCL y NCIM 2499 al 5%

\*Voltaje: 20 kV; Distancia: 15 cm; Flujo 2.5 ml/h

### 7.4. Caracterización de fibras electrohiladas

Las fibras obtenidas fueron evaluadas según su morfología y propiedades del polímero,

observando así los cambios en sus propiedades físicas con el fin de verificar la presencia de los extractos en las fibras resultantes. Para la interpretación de las muestras, las fibras fueron analizadas bajo microscopio electrónico de barrido; de igual manera se realizó el análisis termogravimétrico y la calorimetría diferencial de barrido.

#### **7.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

Para evaluar la morfología y porosidad de las fibras fabricadas, se recortaron segmentos de 0.5 cm x 0.5 cm, los cuales se fijaron a colectores con cinta adhesiva metálica y se recubrieron con partículas de oro por medio de pulverización catódica. Los estudios se realizaron en un microscopio de emisión de campo JEOL JSM 7600F.

#### **7.4.2. Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Para el análisis termogravimétrico, se cortaron muestras con un peso aproximado de 5 mg y se colocaron en charolas de platino, estas se calentaron a 25°C incrementando hasta los 600°C con una rampa de calentamiento de 10°C/min en atmósfera de nitrógeno.

En el caso de la calorimetría diferencial de barrido, se utilizó el dispositivo TA Instruments DSC Q100 para la evaluación de muestras. Se tomaron muestras de la misma manera que para el análisis termogravimétrico, pero en este caso se colocaron en bandejas de platino que posteriormente se prensaron y sellaron. Las muestras se procesaron con las mismas características del análisis termogravimétrico y se analizaron con el software TA Universal Analysis.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1. Actividad antimicrobiana

En la tabla 4, se puede observar la bioactividad de ambos extractos comparados con los antibióticos comerciales, se puede apreciar que el extracto NCIM2417 tiene bioactividad contra *Candida albicans* a las 24 y 48 hrs después de haber sido expuestos con el hongo, demostrando que tienen una capacidad de inhibir el crecimiento fungal con tan solo 0.006 mg/ml para el NCIM 2417 y hasta con un 0.003 mg/mL para el extracto NCIM 2499, concentración similar a la del control Fluconazol, el cual es un antibiótico comercial. En el caso de la actividad antibacteriana, solo *Escherichia coli* fue sensible a la presencia de ambos extractos de actinomicetos inhibiendo un 50% del crecimiento bacteriano después de 72 horas de exposición con el MIC de 0.003 mg/mL para ambos casos. El crecimiento del resto de las bacterias no fue alterado con la presencia de ninguno de los extractos.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los extractos de actinomicetos NCIM2417 y NCIM2499.

	<i>Candida albicans</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomona aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
NCIM 2417	0.00 6	0.00 3	0.4	NA	NA	0.003	NA	NA	NA	NA	NA	0.4
NCIM 2499	0.00 3	NA	NA	NA	NA	0.003	0.01 3	NA	NA	NA	NA	NA
FCZ	0.00 3	0.00 3	0.00 3	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GEN	*	*	*	0.003	0.00 3	0.003	0.00 3	0.00 3	0.00 3	0.00 3	0.00 3	0.00 3
	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr

FCZ: Fluconazol; GEN: Gentamicina; NA: Sin Actividad

Al realizar los estudios antimicrobianos de nuestros extractos contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y el hongo *Candida albicans*, se puede observar que ambos extractos poseen cierta bioactividad que es interesante estudiar, de manera más profunda. Para obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) de ambos extractos NCIM 2417 y NCIM 2499, diferentes concentraciones fueron probadas a través de diluciones base 10 (0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.013, 0.006 y 0.003 mg/mL). Teniendo en cuenta que entre menor sea la concentración necesaria para inhibir el crecimiento microbiano de al menos el 50% es más interesante la actividad bioactiva o al menos tener una bioactividad igual o mejor que los antibióticos seleccionados como controles fluconazol y gentamicina.

En la literatura, una gran cantidad de estudios han demostrado la capacidad antimicrobiana de los actinomicetos, donde estos han sido extraídos por fuentes naturales como nuestras muestras (Chaudhary, et al. 2013; Charousová, et al. 2017; Sengupta, et al. 2015; Durai Pandiyan, et al. 2010; Rahman, Islam, & Islam, 2011). La actividad antifungal contra *Candida albicans* de nuestro trabajo corresponde con lo reportado por Shobha, & Onkarappa, 2011, donde dos *Streptomyces* extraídos del suelo de la región de Kodachadri, India, presentaron bioactividad contra este hongo. En el caso de la actividad contra la cepa *Escherichia coli*, presentada en nuestros extractos, dicha bioactividad corresponde a lo reportado por Sriprechasak, & Athipornchai, 2019.

La mayoría de las bacterias de importancia clínica pueden adquirir y expresar resistencia a los agentes antimicrobianos que se usan en forma habitual para tratar las infecciones que causan. Por consiguiente, una vez que se aísla un microorganismo en el laboratorio, su caracterización frecuentemente incluye pruebas para detectar resistencia a los antimicrobianos. Los procedimientos utilizados para determinar los perfiles de sensibilidad antimicrobiana y detectar resistencia a los agentes que pueden usarse con fines terapéuticos se denominan pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (Oltra Hostalet et al., 2018).

## 8.2. Electrohilado de PCL

Diferentes parámetros del electrohilado fueron evaluados para determinar cuáles son los parámetros óptimos para la formación de las fibras. Al final, la formación de las fibras fue exitosa utilizando una potencia fija de 20 kV, un caudal de flujo de solución 0.450 mL/h constante, utilizando una aguja 22G x 40 mm, a una distancia del colector de 10 cm, bajo una temperatura ambiente en el rango de los 21 - 22°C, con una humedad relativa de 32 - 36%. Dichas condiciones fueron probadas en nuestro equipo de electrohilado previamente reportado en trabajos anteriores (Velasco-Barraza et al., 2016).

La poli (caprolactona), es un polímero sintético de los más utilizados en las aplicaciones médicas gracias a su biocompatibilidad y lenta biodegradación. Combinando inherentes propiedades de la matriz de PCL con las características de las nanofibras resulta un material prometedor que puede ser adecuado para diferentes aplicaciones, incluyendo las aplicaciones biomédicas y celdas solares orgánicas (Mochane et al., 2019).

Por otro lado, entre las ventajas de las estructuras nanofibrosas las cual las hacen interesantes para las celdas solares se incluyen: amplia área superficial, diámetro promedio de poro pequeño y alta porosidad (Villarreal-Gómez et al., 2016).

Con el objetivo de determinar el solvente óptimo que se va a utilizar la el electrohilado del PCL, se revisaron en la literatura diferentes solventes utilizados para la disolución del polímero, es necesario resaltar, que el objetivo principal es lograr una formación homogénea de las fibras sin la formación de bulbos, que disminuya la reproducibilidad de un futuro producto terminado. Se ha reportado, que la morfología de las fibras electrohiladas de PCL depende del tipo de solvente utilizado, los parámetros del electrohilado, la concentración del solvente, la concentración del polímero y las diferentes proporciones de solventes utilizados para dicha disolución (Mochane et al., 2019).

Por mucho tiempo, el cloroformo ha sido el solvente más utilizado para el electrohilado de PCL, gracias a su solubilidad y la obtención de fibras con ausencia de bulbos. (Enis et al., 2016). En dicho estudio, compararon el efecto de diferentes solventes

como el cloroformo, ácido fórmico y ácido acético y solventes binarios como ácido fórmico/etanol, ácido fórmico/metanol, ácido fórmico/cloroformo, ácido acético/cloroformo, ácido acético/etanol, ácido acético/metanol y ácido fórmico/ácido acético. Entre todos los solventes y combinaciones evaluadas descubrieron que el uso del ácido acético conducía a la formación de bulbos solamente, el ácido fórmico promovió la formación de fibras con bulbos y, por el contrario, el cloroformo permite la formación de fibras homogéneas sin bulbos (Enis et al., 2016).

Con respecto a las mezclas estudiadas por el grupo de Enis (2016), el ácido fórmico/cloroformo mostró la efectividad para producir fibras pequeñas de aproximadamente 500 nm, sin embargo, estas fibras presentan bulbos. Sin embargo, el solvente binario óptimo encontrado fue ácido fórmico/ácido acético el cual ayudó a fabricar fibras a escalas nanométricas, sin embargo, se presentaron bulbos.

Gracias a estos reportes en nuestro estudio se determinó utilizar cloroformo como solvente utilizando una concentración del 10%, ya que, en otros estudios de nuestro equipo de trabajo, esta concentración fue la adecuada para la formación de las fibras poliméricas (Álvarez-Suarez et al. 2020).

### **8.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Las fibras obtenidas en este trabajo muestran estar distribuidas de manera aleatoria en el colector, aunque no muestran un diámetro homogéneo en el campo de visualización, no se presentan bulbos evidentes.

La descripción de la morfología y diámetro de las fibras se explica a continuación:

### 8.3.1. Fibras de PCLc

En el caso de las fibras de poli (caprolactona) las cuales son las fibras que no han sido funcionalizadas con ningún compuesto, se puede observar que dichas fibras están llenas de esferas de polímero. A pesar de esto, las fibras se encuentran muy delgadas y homogéneas (Figura 7). Sin embargo, se puede apreciar que las fibras están dispuestas de manera aleatoria y el andamio en general es una estructura tridimensional fibrosa.

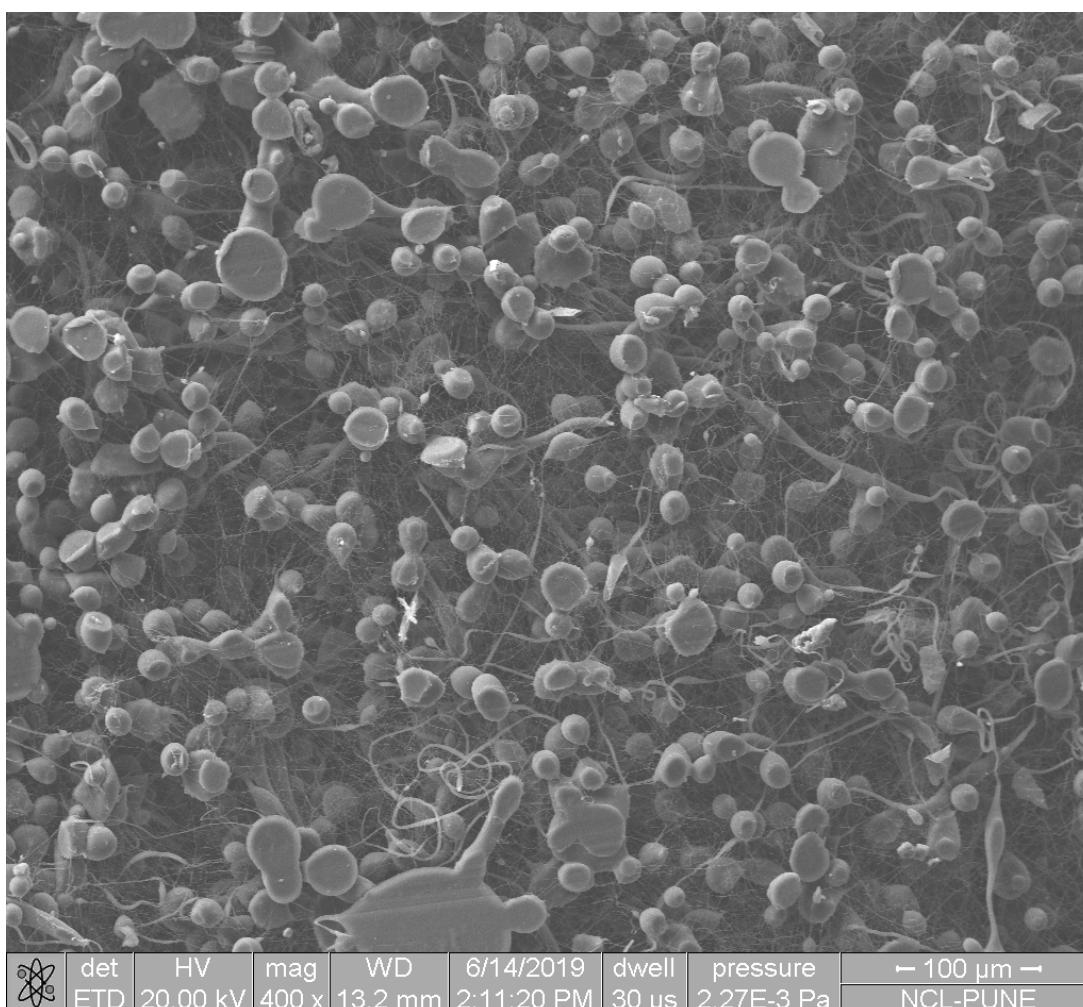


Figura 7. Micrografías SEM de nanofibras de PCL control (400 x).

Esta formación de esferas, se puede deber a la alta humedad presente en el ambiente al momento de fabricar las fibras, el 5% de humedad de manejo entre los 20-40% de humedad.

Nezarati, et al. (2013), reportó el efecto de la humedad en la formación de fibras por electrohilado. En su estudio, discute los efectos de la humedad relativa en la morfología de las fibras donde dicha configuración es influenciada por la hidrofobicidad del polímero, propiedades del solvente y la carga aplicada. Así mismo, al hacer experimentos de electrohilado con diferentes porcentajes de humedad utilizando la poli (caprolactona) al 18% disuelto en Cloroformo: N, N- dimetilformamida (DMF) 80:20, este grupo de investigadores se dio cuenta que al utilizar 5% de humedad relativa, entre un 18-34% de las fibras resultaron rotas, por otro lado, al usar un 20% de humedad aproximadamente el 49% de las fibras también resultaron rotas, en el caso de usar una humedad relativa del 35% aproximadamente un 32 % de las fibras resultaron quebradizas, y así hasta ir aumentando hasta un 75% de humedad donde ya hubo una formación de fibras porosas. En resumen, el polímero PCL necesita un porcentaje de humedad alto para la fabricación óptima de las fibras.

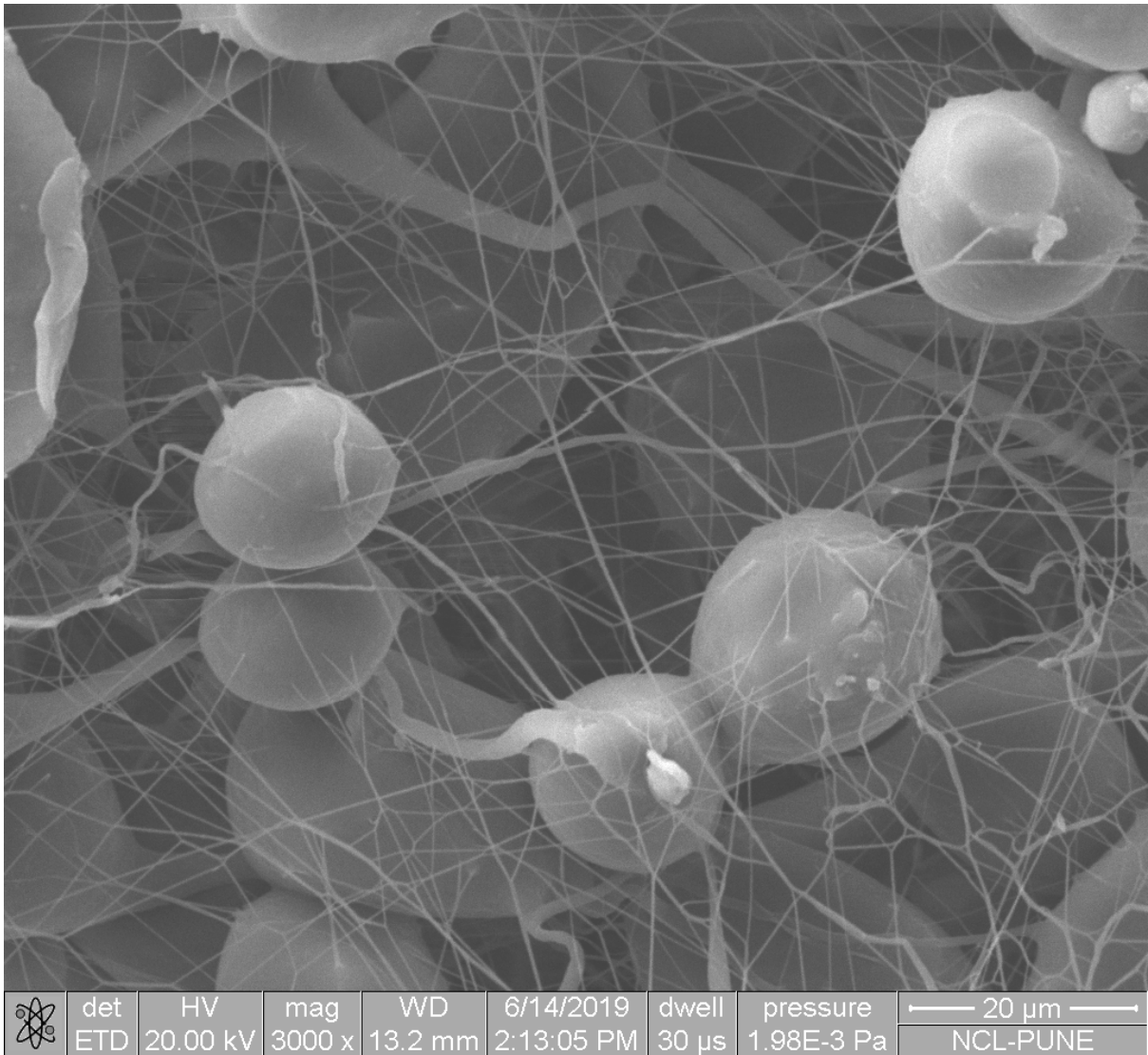


Figura 8. Micrografías SEM de nanofibras de PCL control (3000 x).

Por otro lado, al aumentar la amplificación de la micrografía por SEM se puede observar que la superficie de las fibras de PCL es lisa y continua, sin una porosidad evidente en la superficie de las mismas, pero con ciertas irregularidades en las mismas (Figura 8).

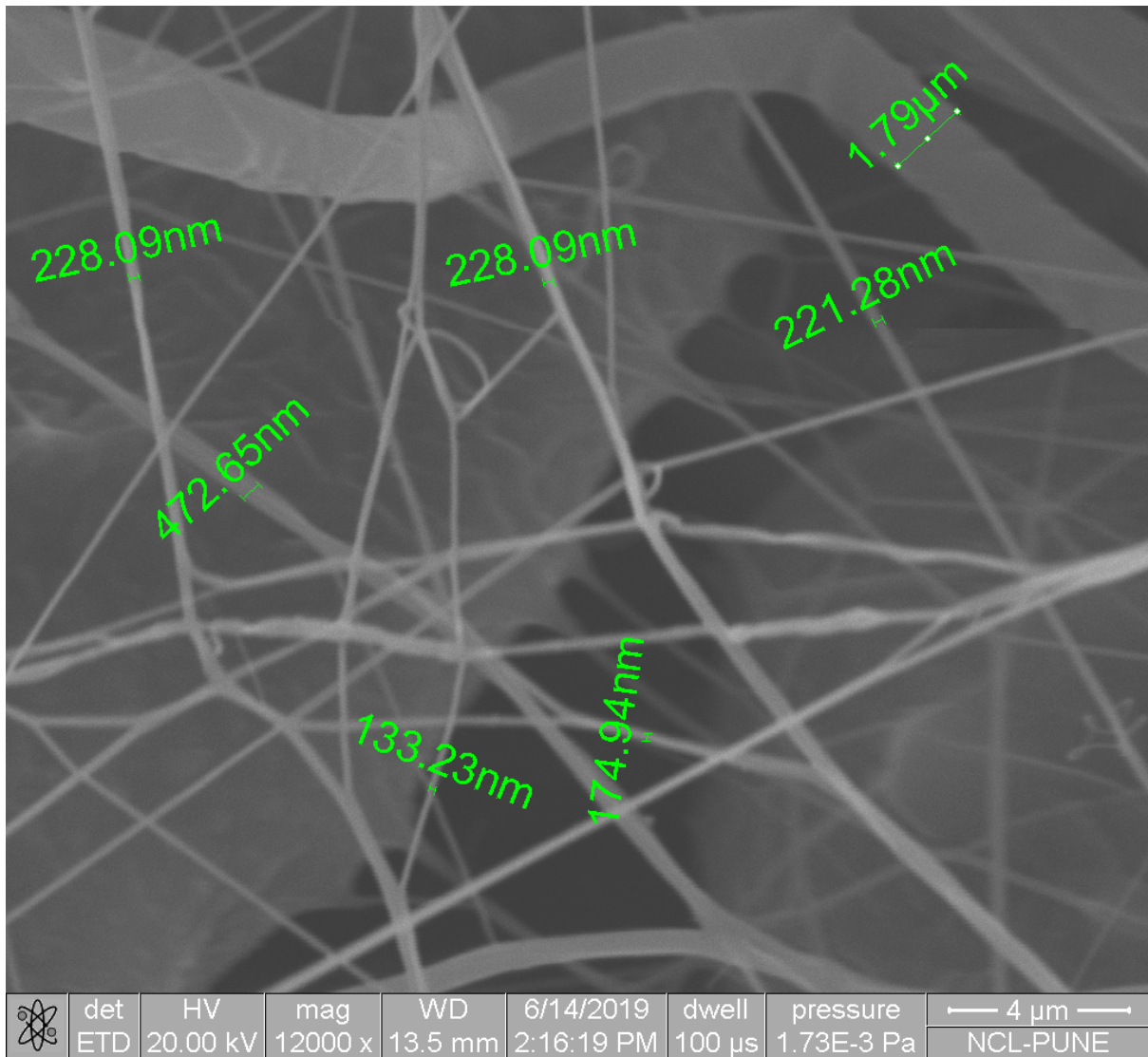


Figura 9. Micrografías SEM de nanofibras de PCL control (12,000 x).

Tomando en cuenta algunas mediciones de las fibras, las fibras más delgadas miden 133.23 nm y las fibras más gruesas miden 1.79 µm, a pesar de la gran variedad entre estas dos mediciones, la figura 9, demuestra una homogeneidad en el diámetro de las fibras. A pesar de la formación de los bulbos en las fibras debido a la falta de evaporación del solvente y poco % de humedad relativa, las fibras obtenidas fueron muy delgadas, casi llegando al límite de los 100 nm.

Con el software Image J, se determinó el diámetro promedio de las fibras a través de 30 mediciones de 30 fibras diferentes, obteniéndose que el diámetro promedio de las fibras es de  $0.24 \pm 0.07$  nm, donde se obtuvo una distribución homogénea y con una baja desviación

estándar, donde de un 57% de las fibras poseen un diámetro de 0.16-0.237 nm, seguido de un 40% que presenta un diámetro de entre 0.237-0.314 nm.

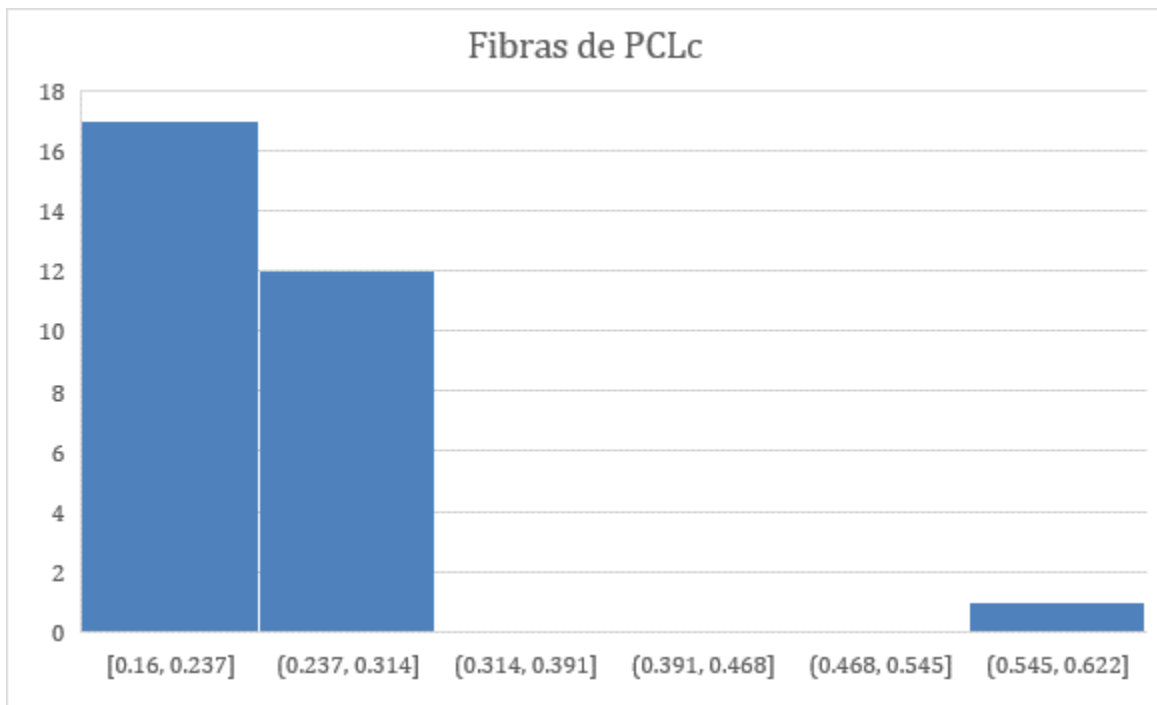


Figura 10. Histograma de distribución de los diámetros de las fibras de PCLc.

### 8.3.2. Fibras de PCL/NCIM2417-1

En el caso de las fibras PCL/NCIM2417-1, también se puede observar una recolección en distribución aleatoria al colector, así mismo, se puede apreciar un aumento en el grosor y una estructura tridimensional, no se aprecia presencia de bulbos, aunque hay mayor dispersión en el grosor de las fibras que conforman al andamio, esto puede deberse a los cambios constantes de los parámetros de electrohilado en el proceso de la fabricación de estas fibras, como la distancia utilizada en el inyector y el colector, el voltaje y los cambios del porcentaje de humedad (Figura 11).

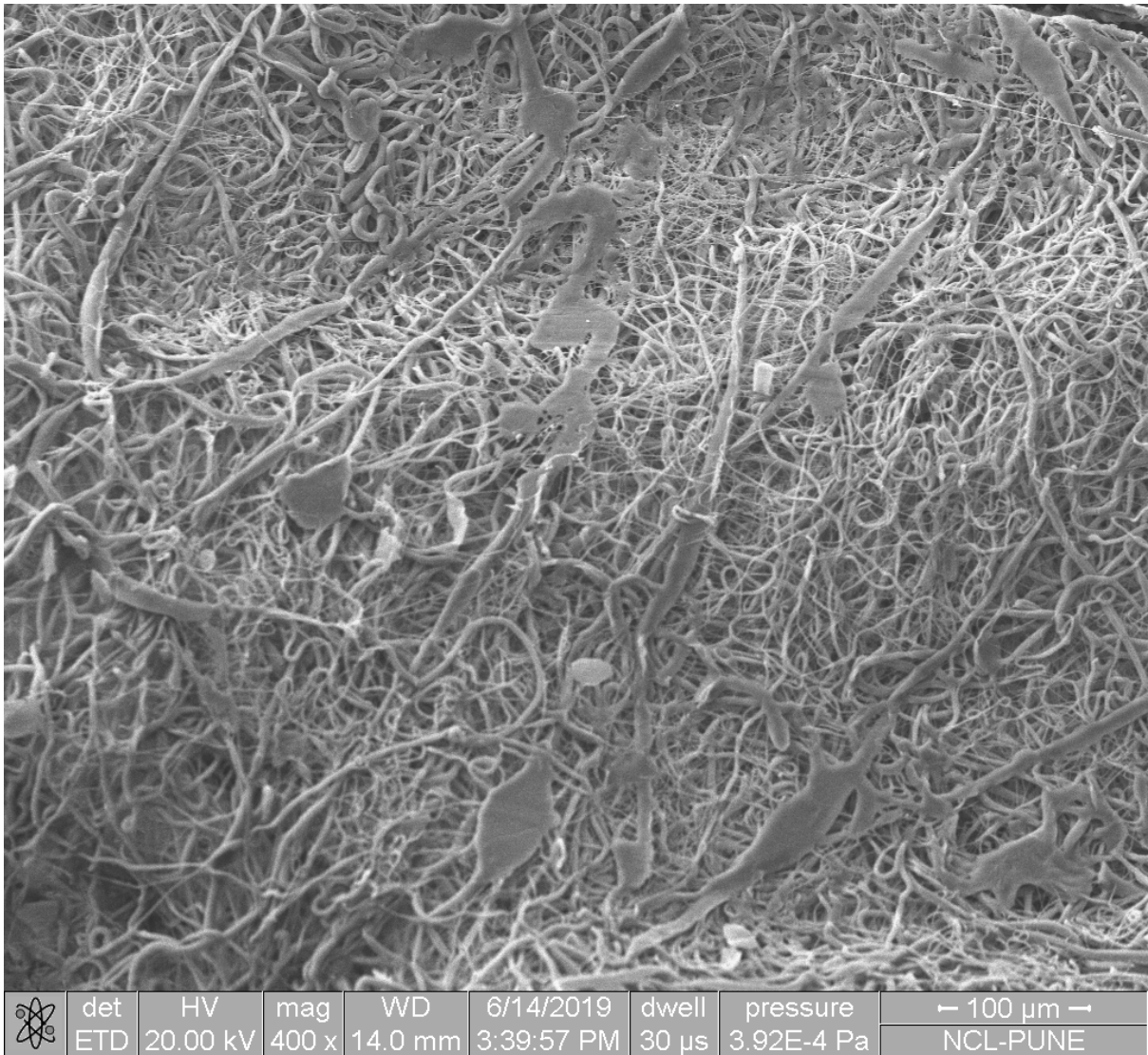


Figura 11. Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2417-1 (400 x).

En el caso de las figuras 12 y 13, las cuales son micrografías que está aumentada 3000x y 12,000 x, respectivamente, no se aprecian bulbos, por lo que se atribuye a una afinidad de los solventes y la disolución del polímero y el extracto bacteriano, quedando inmerso en la fibra.

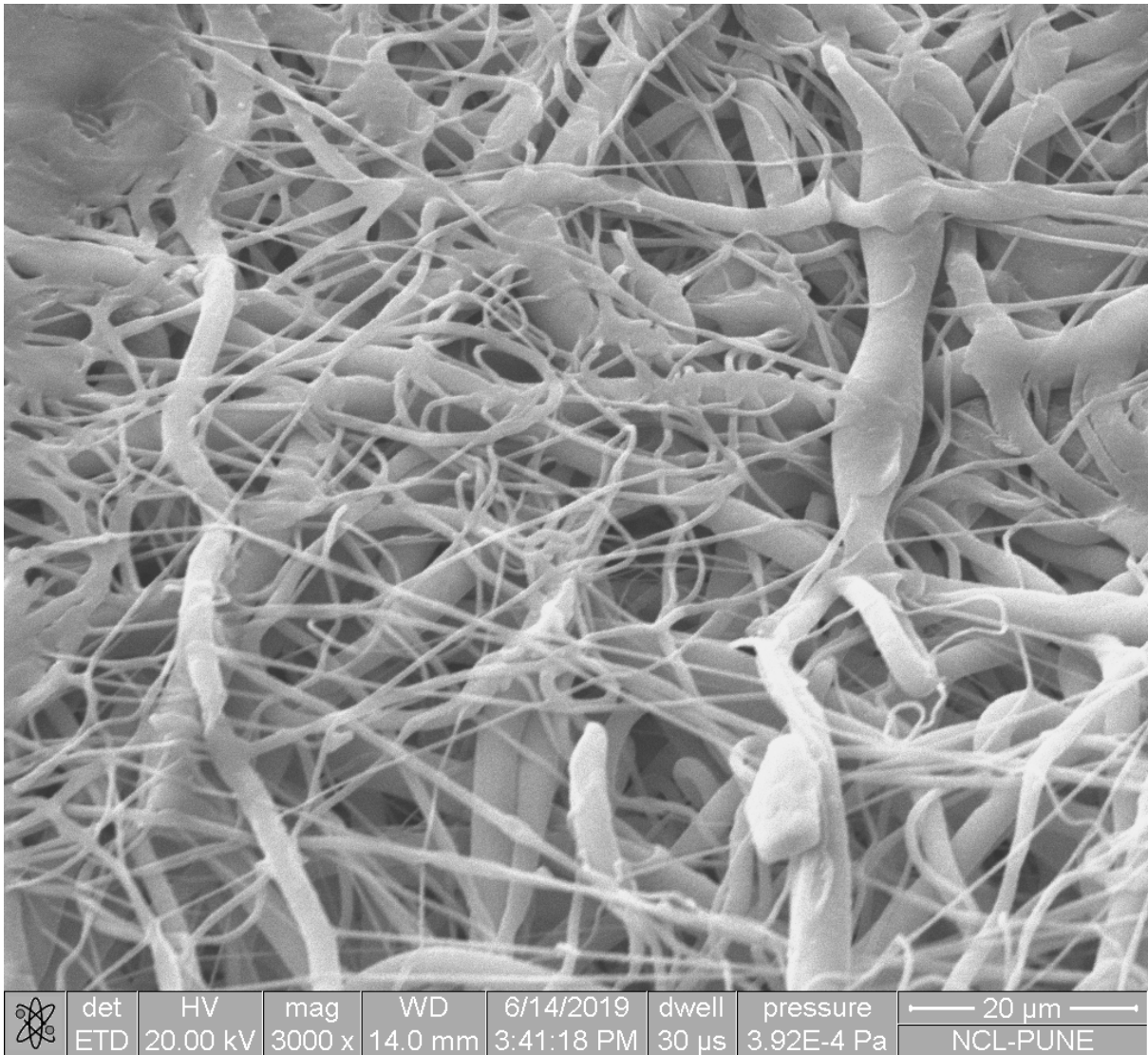


Figura 12. Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2417-1 (3000 x).

Sin embargo, las fibras se aprecian muy irregulares y con poco control del electrohilado, debido de igual manera al cambio de condiciones de trabajo en el proceso de electrohilado.

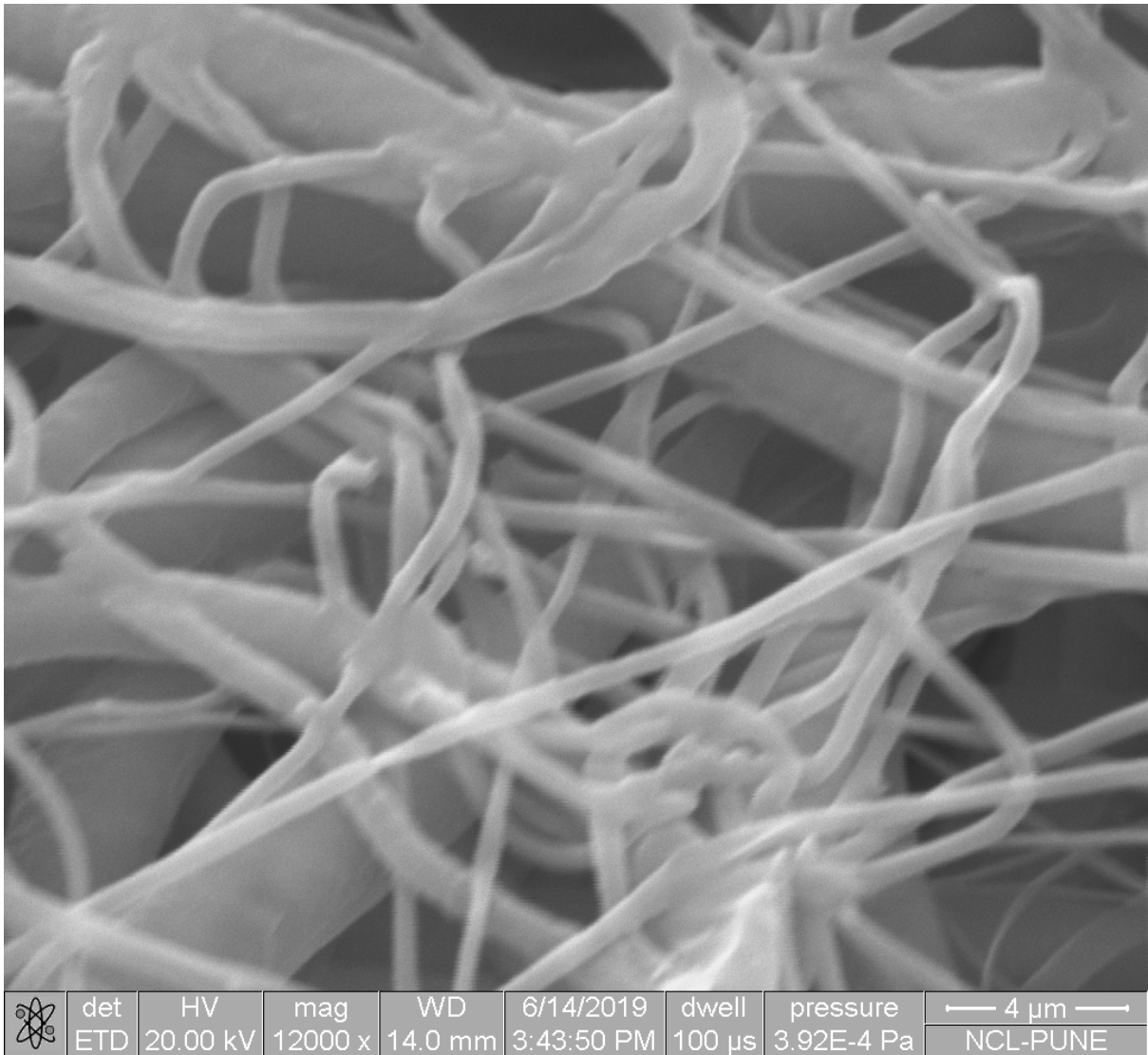


Figura 13. Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2417-1 (12, 000 x).

Con el software Image J, se determinó el diámetro promedio de las fibras a través de 30 mediciones de 30 fibras diferentes, obteniéndose que el diámetro promedio de las fibras es de  $41.94 \pm 40.84$  nm, donde se obtuvo una distribución homogénea y con una alta desviación estándar, donde los rangos de fibras más prominente se encuentran en el rango de 16.45-65.45 nm, seguido de un rango de 114.45-163.45 nm, por último, las fibras con menor proporción se tienen un diámetro de 65.45-114.45 nm.

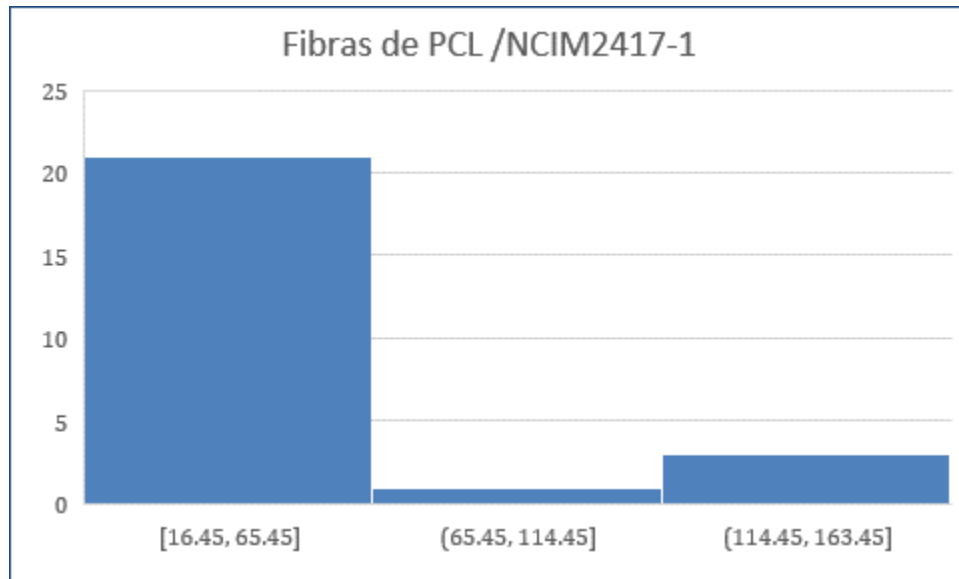


Figura 14. Histograma de distribución de los diámetros de las fibras de PCL/NCIM2417-1.

### 8.3.3. Fibras de PCL/NCIM2417-5

En el caso de las fibras PCL/NCIM2417-5, también se puede observar una recolección en distribución aleatoria al colector, así mismo, se puede observar un grosor uniforme y delgado, de tal manera que las fibras pueden apreciarse homogéneas, se puede también observar una estructura tridimensional, que integran solo fibras delgadas, no se aprecia presencia de bulbos ni artefactos en el andamio (Figura 15).

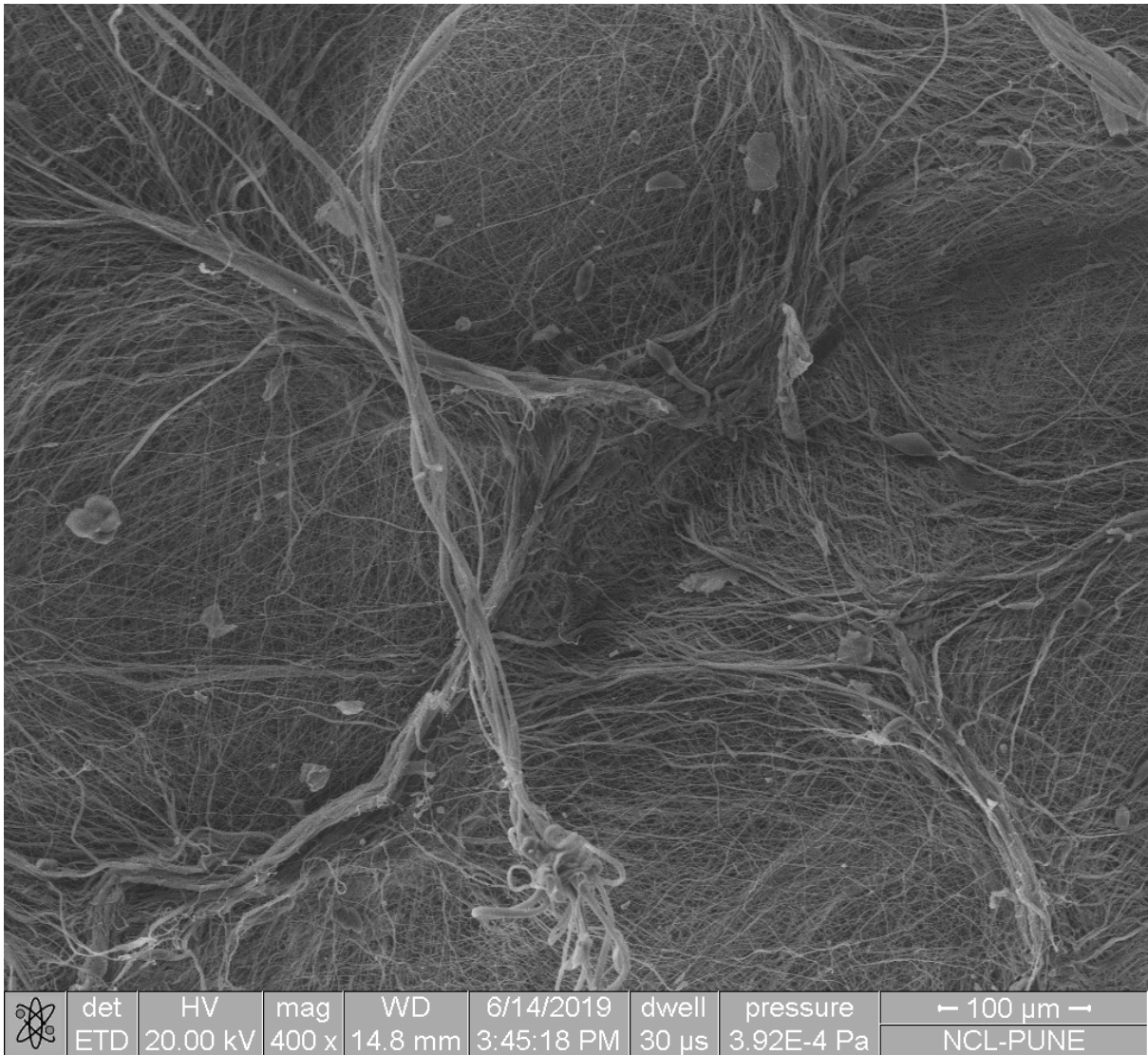


Figura 15. Fibras de PCL /NCIM2417-5 (400 x).

En el caso de las figuras 16 y 17, las cuales son micrografías que esta aumentada 3000 x y 20,000 x, respectivamente, como en las otras dos muestras con menor proporción del complejo, no se puede apreciar residuos del extracto bacteriano, el cual quedó inmerso en la fibra, alojándose en toda la masa de las mismas.

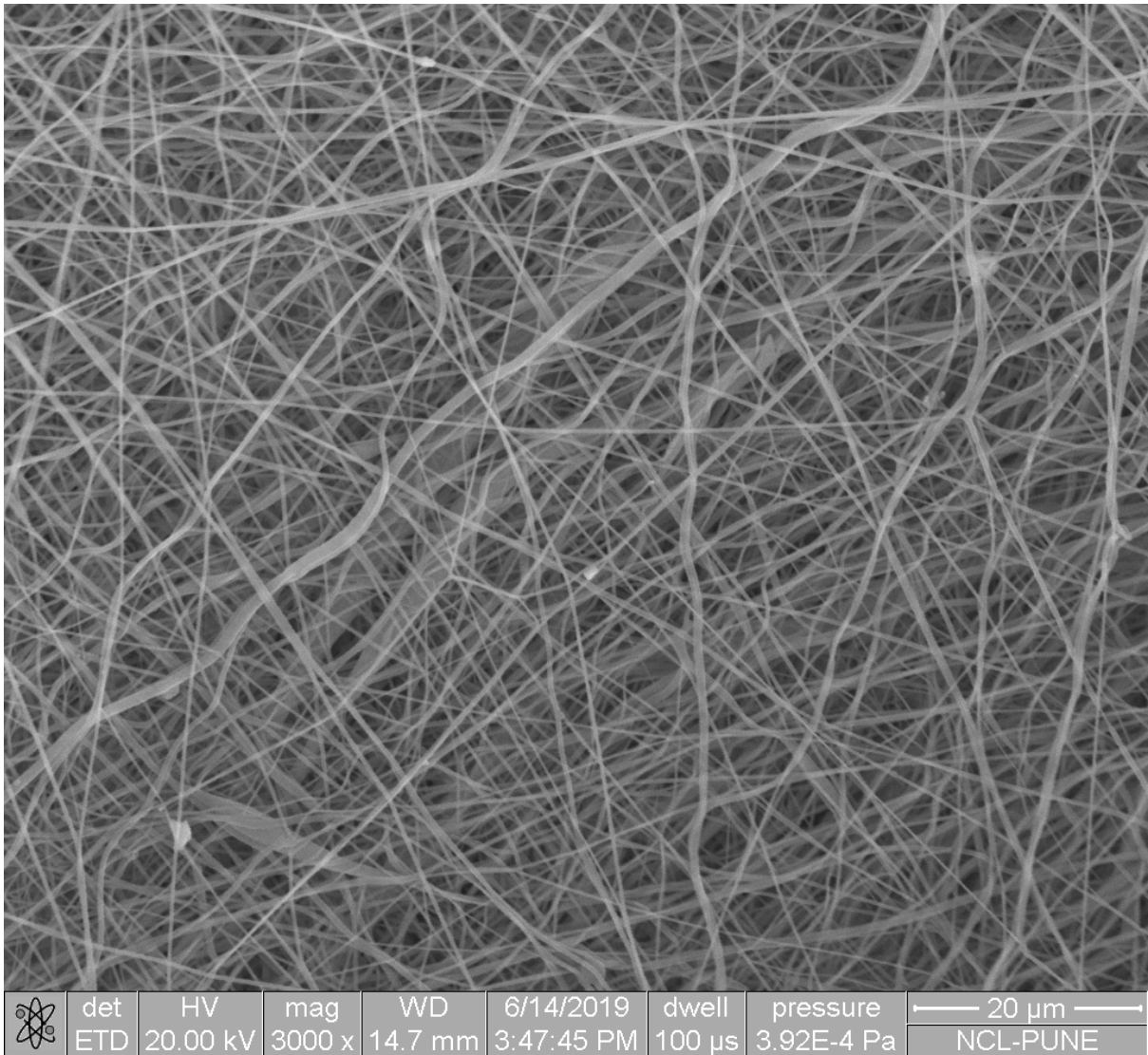


Figura 16. Fibras de PCL /NCIM2417-5 (3000 x).

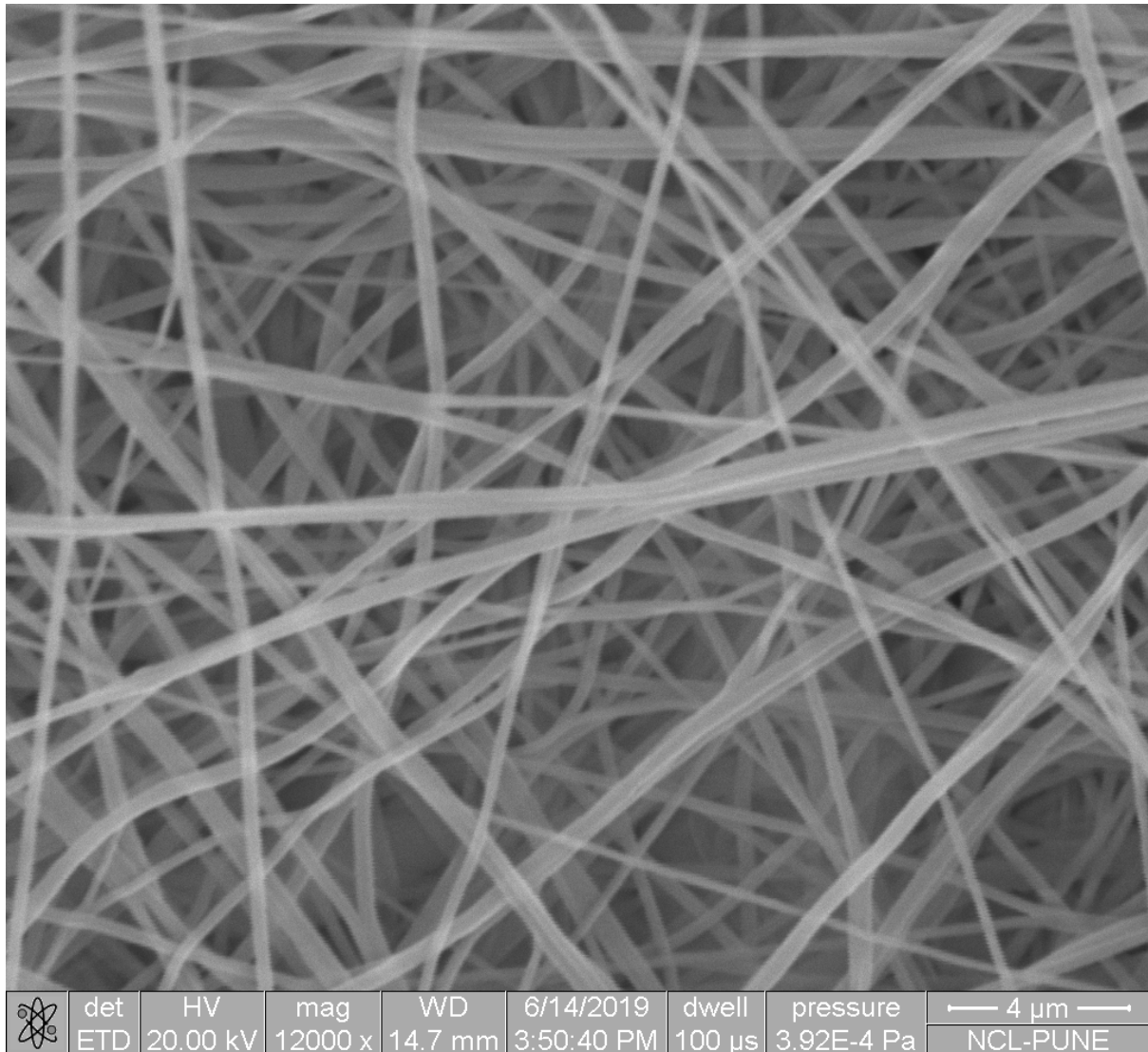


Figura 17. Fibras de PCL /NCIM2417-5 (20,000 x).

Con respecto al diámetro de los andamios PCL /NCIM2417-5, se tomó en consideración la figura 16, la cual es una micrografía con amplificación de 500 x y permite medir la mayor cantidad de fibras posibles. También, se realizaron 30 mediciones. Por consiguiente, el diámetro promedio de las fibras de la muestra PCL /NCIM2417-5 es  $14.73 \pm 2.89$  nm, las cuales son fibras más delgadas que las fibras de PCL control.

Según su histograma, la distribución más predominante es entre 3.11 a 3.92 μm y 3.92 a 4.73 μm, seguido de un rango de 2.3 a 3.11 μm, continuando con el rango entre 4.73 a 5.54 μm, seguido de un rango de 1.49 a 2.3 μm finalizando con la distribución donde existen

menor cantidad de fibras, que se encuentran entre 5.54 a 6.35  $\mu\text{m}$  (figura 18).

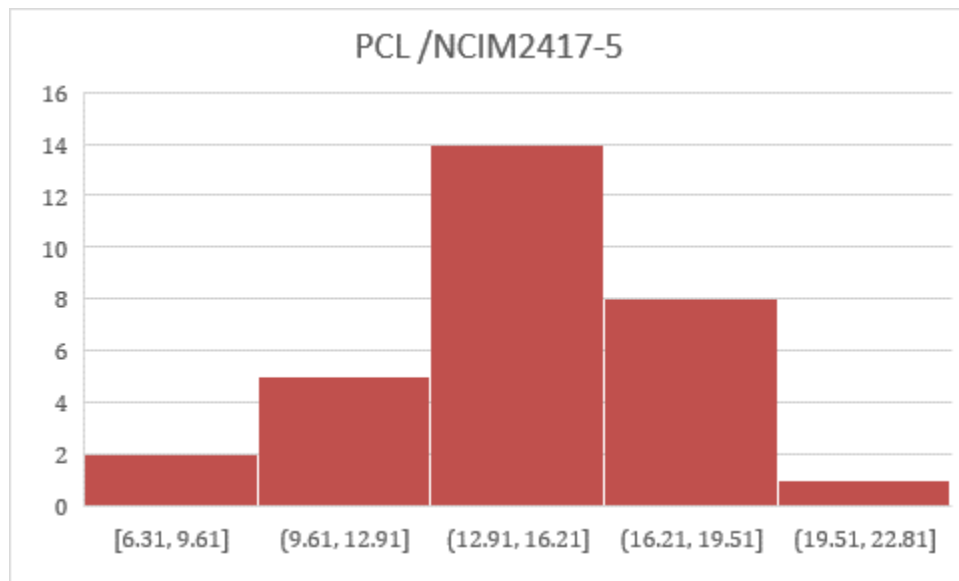


Figura 18. Histograma de PCL /NCIM2417-5. Distribución de diámetros de fibras.

#### 8.3.4. Fibras de PCL/NCIM2499-1

Para las fibras de PCL/NCIM2499-1, el proceso de electrohilado no fue muy eficiente, ya que la formación de las fibras es defectuosa e irregular, en la figura 21, se observa que el jet del polímero llegó débilmente al colector, sin llegar a formar las fibras, por lo que no se considera óptimo las condiciones de electrohilado para esta muestra. Sin embargo, un film fue producido donde algunas secciones se pueden apreciar algunas fibras irregulares pero visibles, dichas secciones fueran ampliadas, recortadas y caracterizadas, pero un mejor control del electrohilado es necesario para futuros trabajos

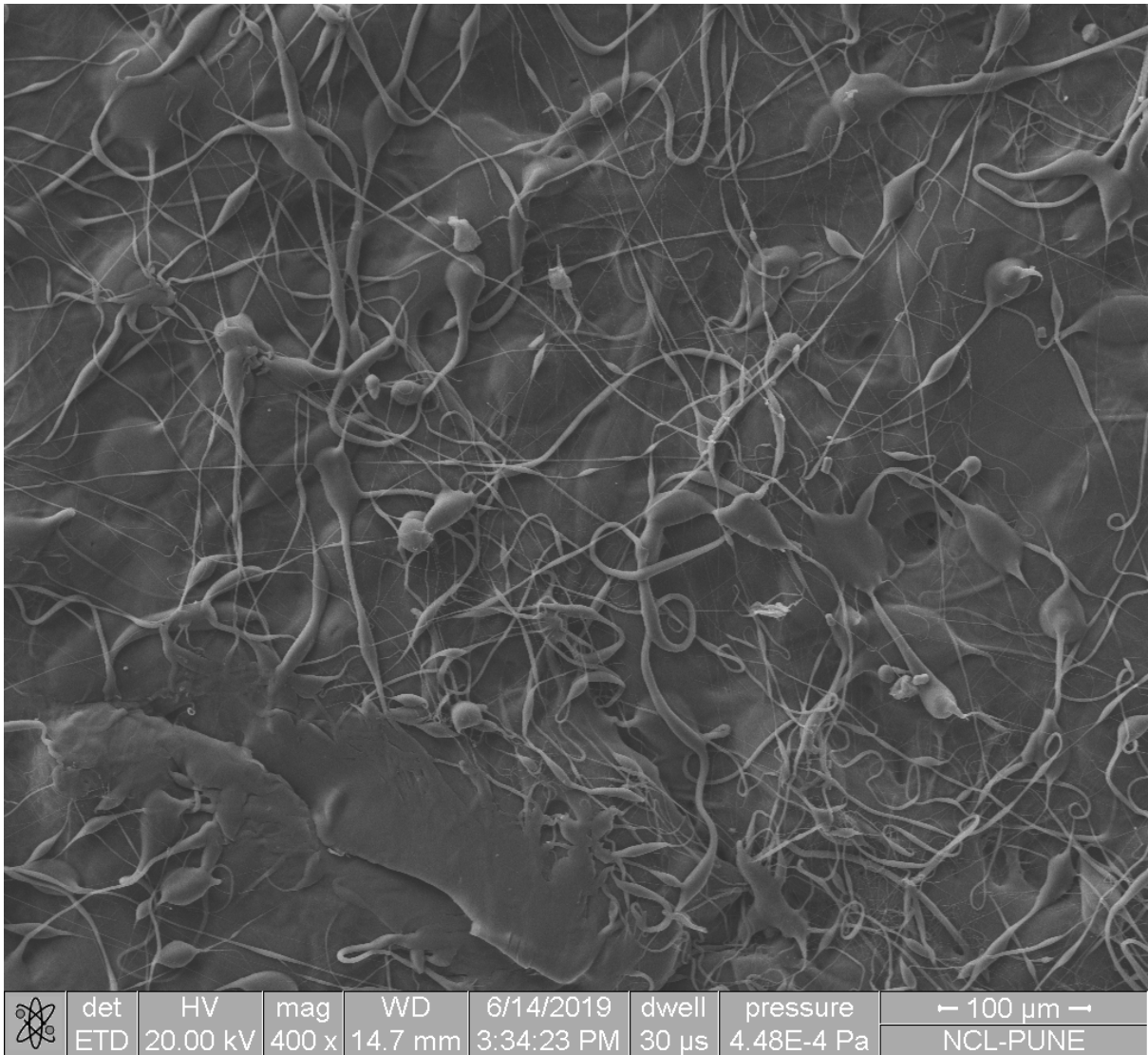


Figura 19. Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-1 (400 x).

Las figuras 20 y 21 son micrografías aumentadas a 3000 x y 12,000 x, de una sección del filme de la fotografía ampliada a 400 x, en dichas imágenes se pueden observar algunas fibras muy delgadas y otras extremadamente gruesas, dichas secciones ampliadas muestran escasas fibras en el campo, donde las fibras más gruesas pudieran presentar una morfología que asemeja a la presencia de bulbos.

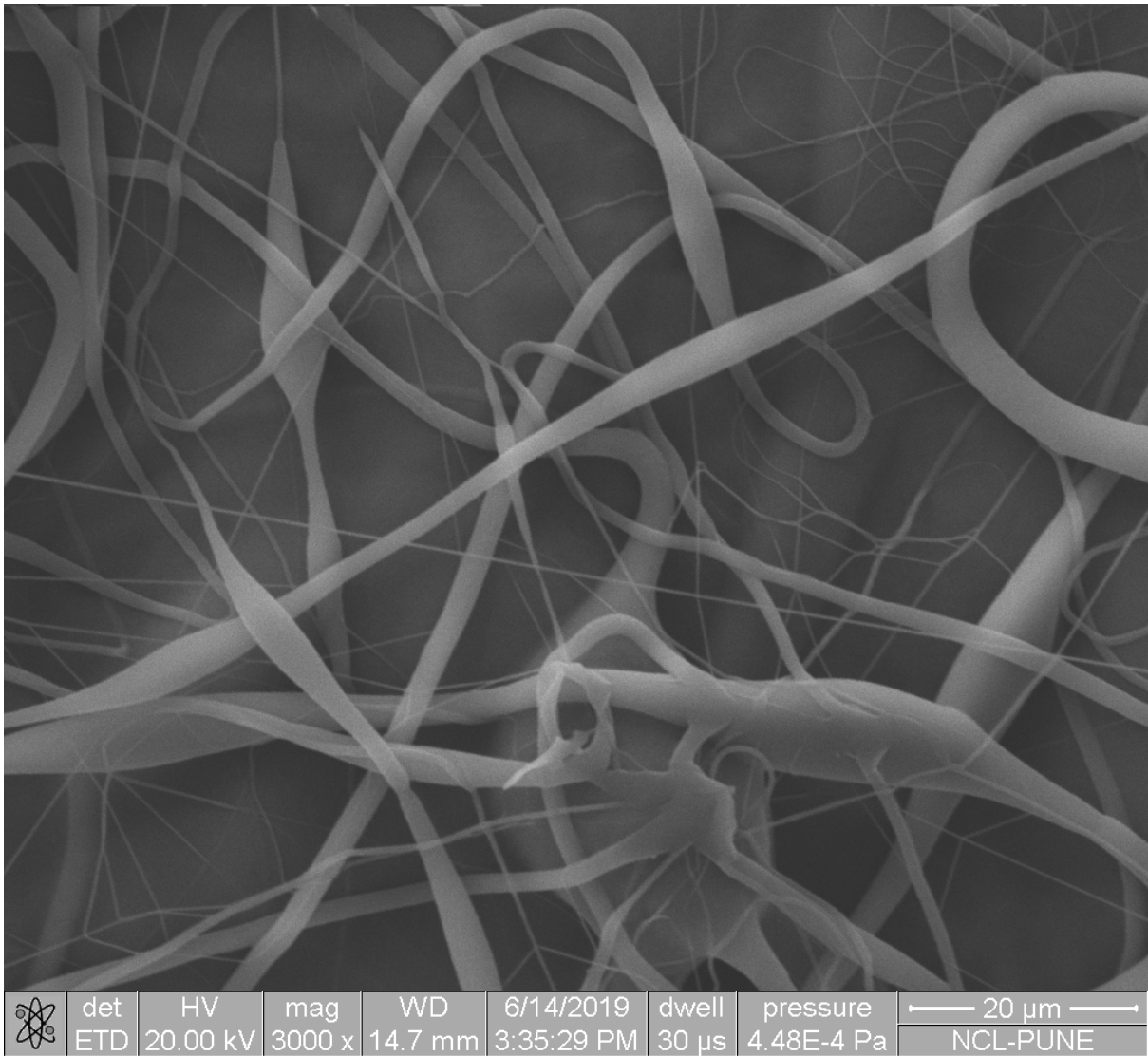


Figura 20. Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-1 (3,000 x).

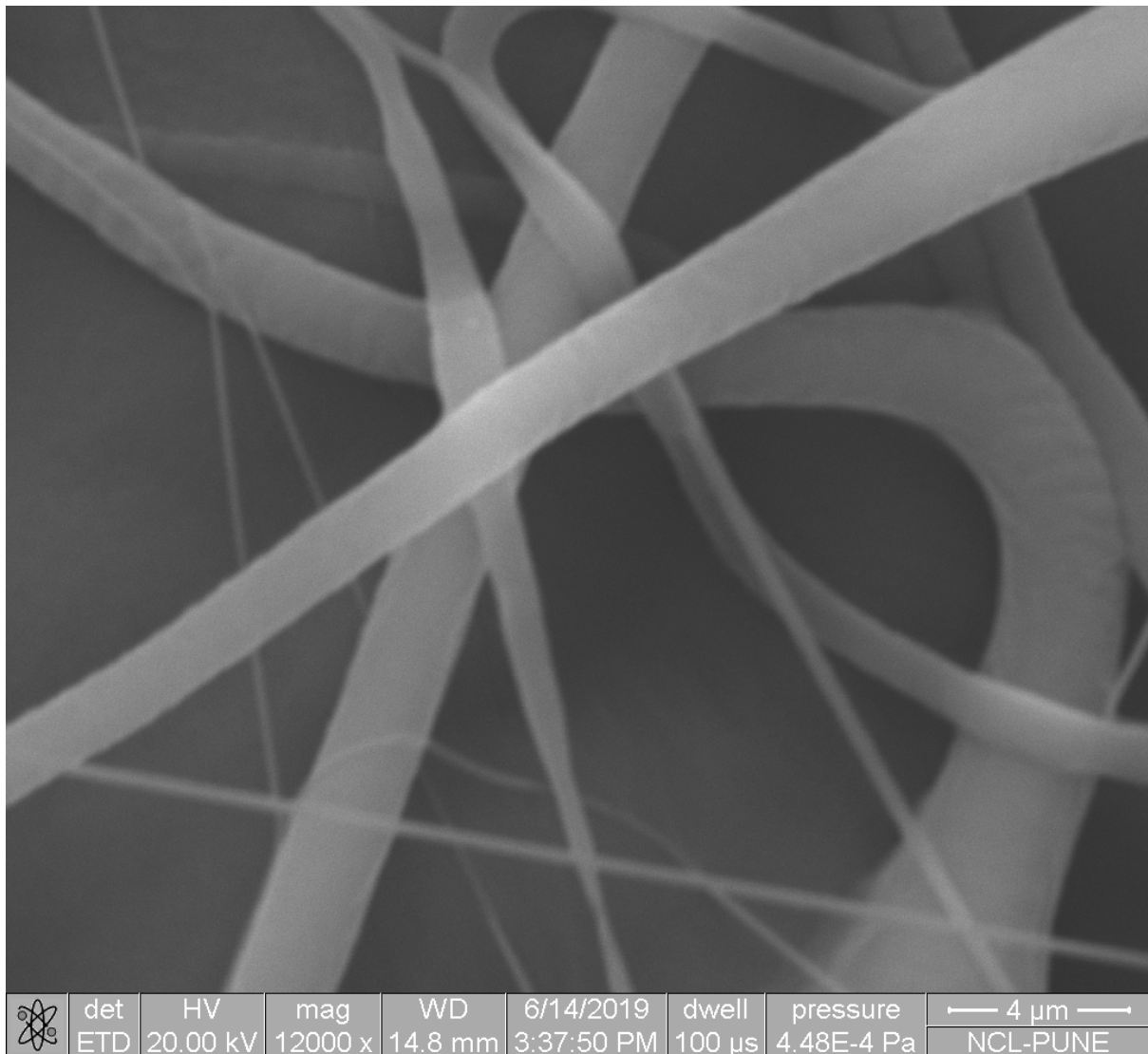


Figura 21. Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-1 (12,000 x).

Con respecto al diámetro de los andamios PCL /NCIM2499-1, se tomó en consideración la figura 20, la cual es una micrografía con amplificación de 3000 x y permite medir la mayor cantidad de fibras posibles. También, se realizaron 30 mediciones. Por consiguiente, el diámetro promedio de las fibras de la muestra PCL / NCIM2499-1 es  $1.29 \pm 0.93 \mu\text{m}$ , las cuales son fibras mucho más delgadas que las fibras de PCL control.

La distribución más predominante, según su histograma es entre 0.31 a 1.41  $\mu\text{m}$ , seguido de un rango de 1.41.3 a 2.51  $\mu\text{m}$ , continuando con el rango entre 2.51 a 3.61  $\mu\text{m}$ , de igual manera y con la misma proporción se encuentran diámetros con un rango de 3.61 a 4.71  $\mu\text{m}$  (figura 22).

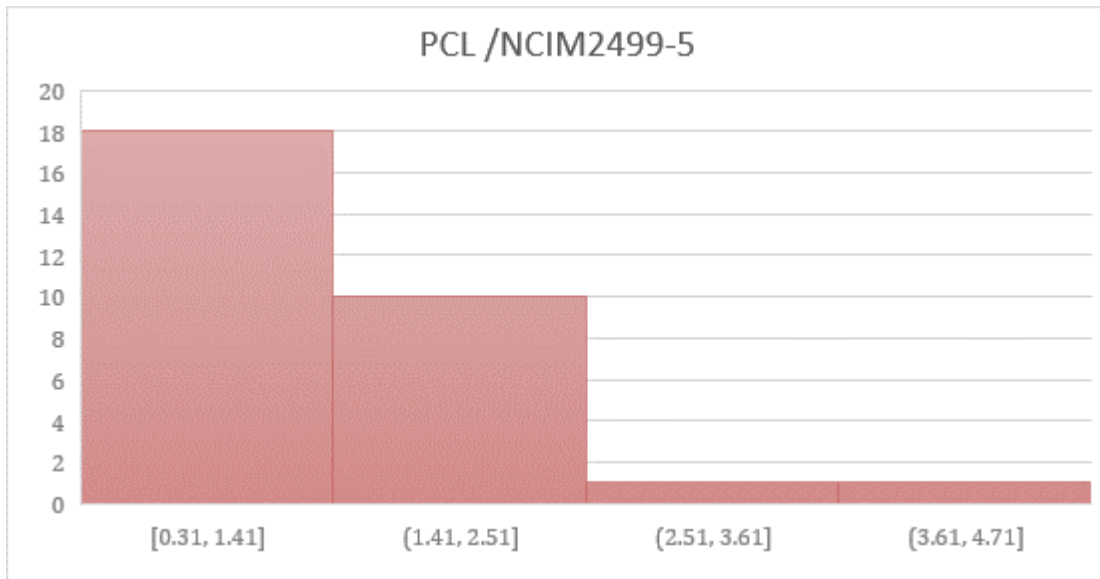
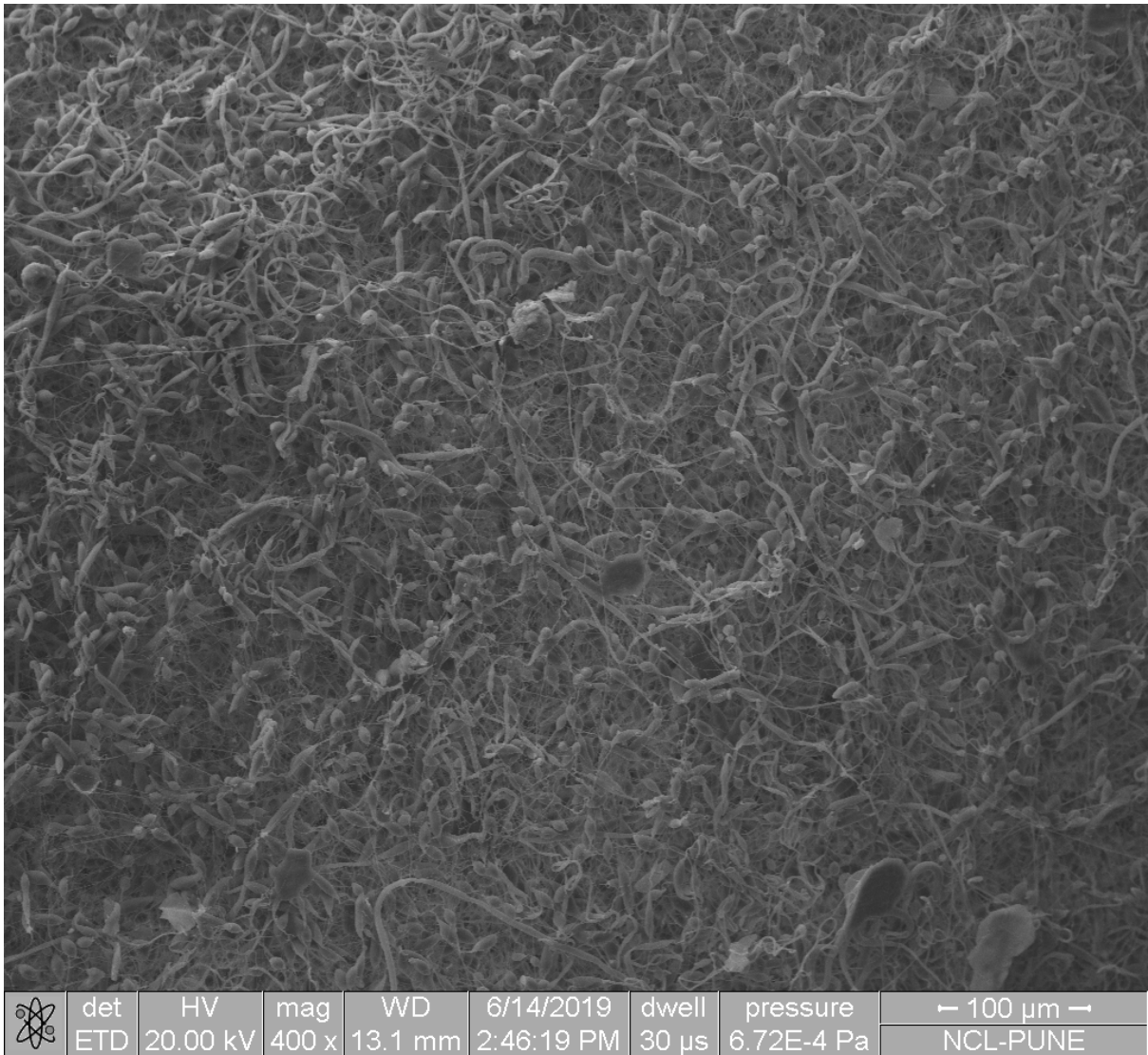


Figura 22. Histograma de PCL /NCIM2499-1. Distribución de diámetros de fibras.

### 8.3.5. Fibras de PCL/NCIM2499-5

Finalmente, para las muestras de fibras PCL /NCIM2499-5 podemos observar la creación de un andamio tridimensional con fibras electrohiladas irregulares con una gran cantidad de artefactos inmersos entre las fibras. Aunque en esta muestra las fibras son evidentes, se puede teorizar que los artefactos e irregularidades evidentes en la superficie de las fibras es debido a la poca disolución del extracto bacteriano en la solución polimérica (Figura 23).

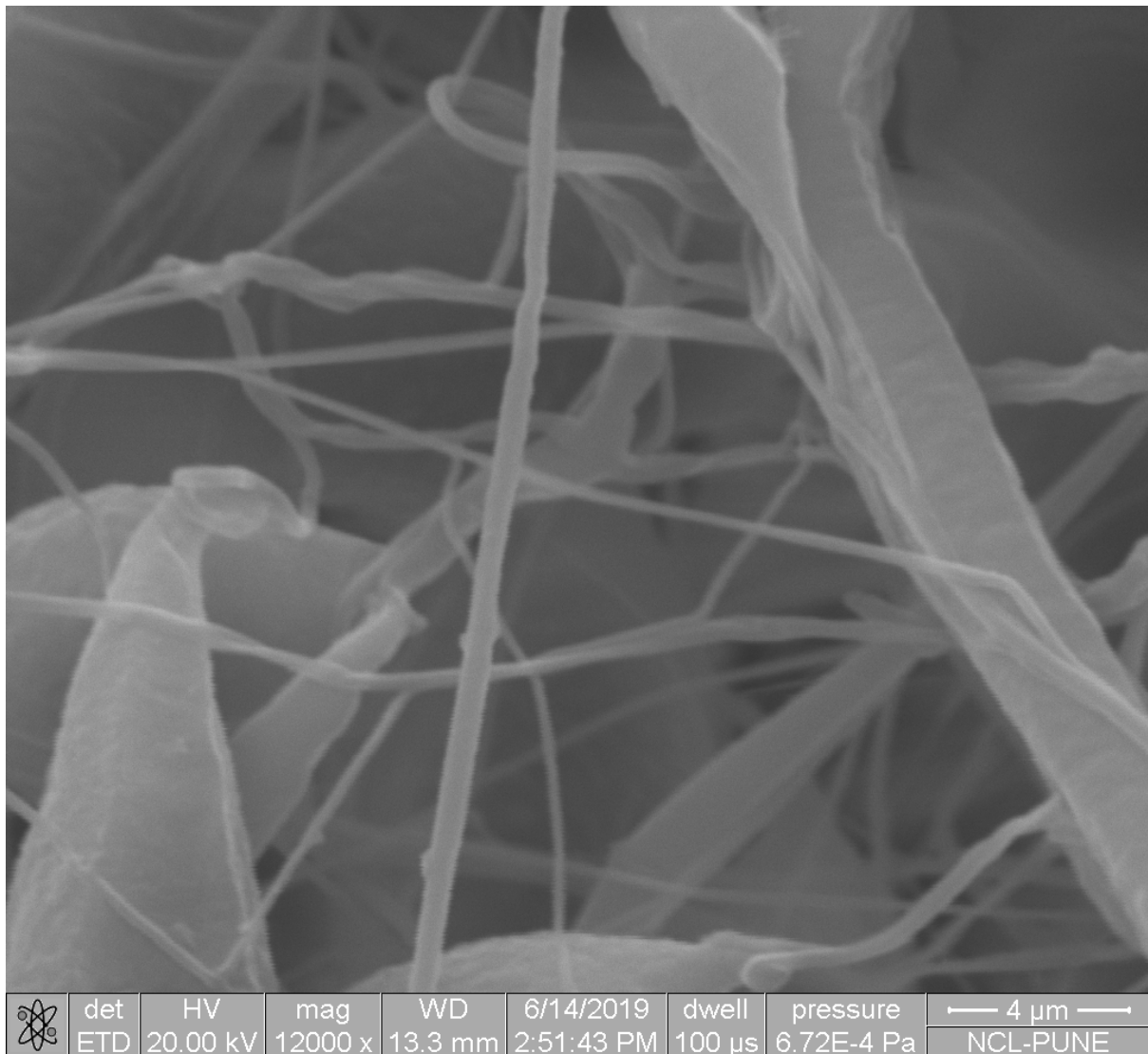


**Figura 23.** Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-5 (4000 x).

En la figura 24 se puede observar, el ejemplo de un artefacto predominante entre la estructura tridimensional de dichas fibras, se aprecia una forma esférica con un diámetro de 287.63 μm que se presume que es parte del extracto bacteriano que no se disolvió en la solución polimérica.



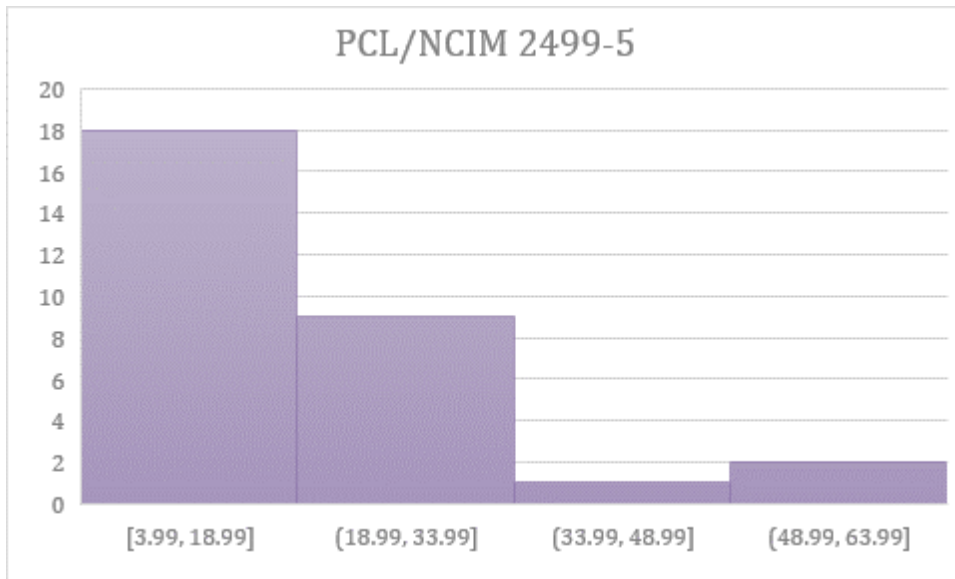
**Figura 24.** Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-5 (3,000 x).



**Figura 25.** Micrografías SEM de nanofibras de PCL/NCIM2499-5 (12,000 x).

Con respecto al diámetro de los andamios PCL /NCIM2499-5, se tomó en consideración la figura 24, la cual es una micrografía con amplificación de 3000 x y permite medir la mayor cantidad de fibras posibles. También, se realizaron 30 mediciones. Por consiguiente, el diámetro promedio de las fibras de la muestra PCL / NCIM2499-5 es  $19.27 \pm 13.32 \mu\text{m}$ , las cuales son fibras mucho más delgadas que las fibras de PCL control.

La distribución más predominante, según su histograma es entre  $3.99$  a  $18.99 \mu\text{m}$ , seguido de un rango de  $18.99$  a  $33.99 \mu\text{m}$ , continuando con el rango entre  $48.99$  a  $63.99 \mu\text{m}$ , finalizando con un rango de  $33.99$  a  $48.99 \mu\text{m}$  (figura 26).



**Figura 26.** Histograma de PCL /NCIM2499-5. Distribución de diámetros de fibras.

Los diámetros de las fibras, tiene la capacidad de ser controlados a través de la manipulación de los parámetros del electrohilado, como el voltaje, concentración de la solución polimérica, porcentaje de humedad y la distancia entre el inyector y el colector. (El-hadi y Al-Jabri, 2016; Velasco-Barraza et al., 2016).

Una vez analizados los resultados anteriores, considerando sus respectivas características, pueden considerarse las fibras de PCL/NCIM2417-5 como el mejor resultado obtenido. Aunque en todos los resultados se puede observar una recolección en distribución aleatoria al colector, a diferencia de las otras fibras, las de PCL/NCIM2417-5 presentan un grosor uniforme y delgado, de tal manera que las fibras pueden apreciarse homogéneas. De igual manera se puede observar también una estructura tridimensional, que integran sólo fibras delgadas; no se aprecia la presencia de residuos del extracto bacteriano — el cual quedó inmerso en la fibra, alojándose en toda la masa de las mismas fibras —, de bulbos ni artefactos en el andamio, por lo que se atribuye a una afinidad de los solventes y la disolución del polímero y el extracto bacteriano. Estas características pueden apreciarse mejor en la figura 15.

Así como en este trabajo, la poli (caprolactona) se ha utilizado ampliamente como polímero base para la fabricación de fibras electrohiladas (Mochane et al., 2019), por

ejemplo: se ha mezclado con quitosano, cuyas fibras resultantes son de  $400 \times 10^{-3}$  nm (Fadaie et al., 2018), con óxido de zinc (ZnO), donde se obtuvieron fibras de tamaño entre  $1.019\text{--}0.511 \times 10^{-3}$  nm (Prado-Prone et al., 2018), con óxido de grafeno reducido con fibras de 380–410 nm (Marrella et al., 2018), entre otros.

#### 8.4. Calorimetría diferencial de barrido

En la Tabla 5, se puede apreciar que la temperatura de descomposición o degradación ( $T_d$ ) de las fibras PCL, PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499 se encuentran entre los 362-370 °C, siendo las fibras de PCLc (control), la muestra con menor temperatura. La temperatura de degradación reportada para el PCL es de 380 °C. (Patrício et al., 2013). Finalmente, las temperaturas que corresponden con la temperatura máxima ( $T_{max}$ ) de los termogramas DSC varían entre los 409°C-420°C, siendo las fibras de PCLc las de menor  $T_{max}$ .

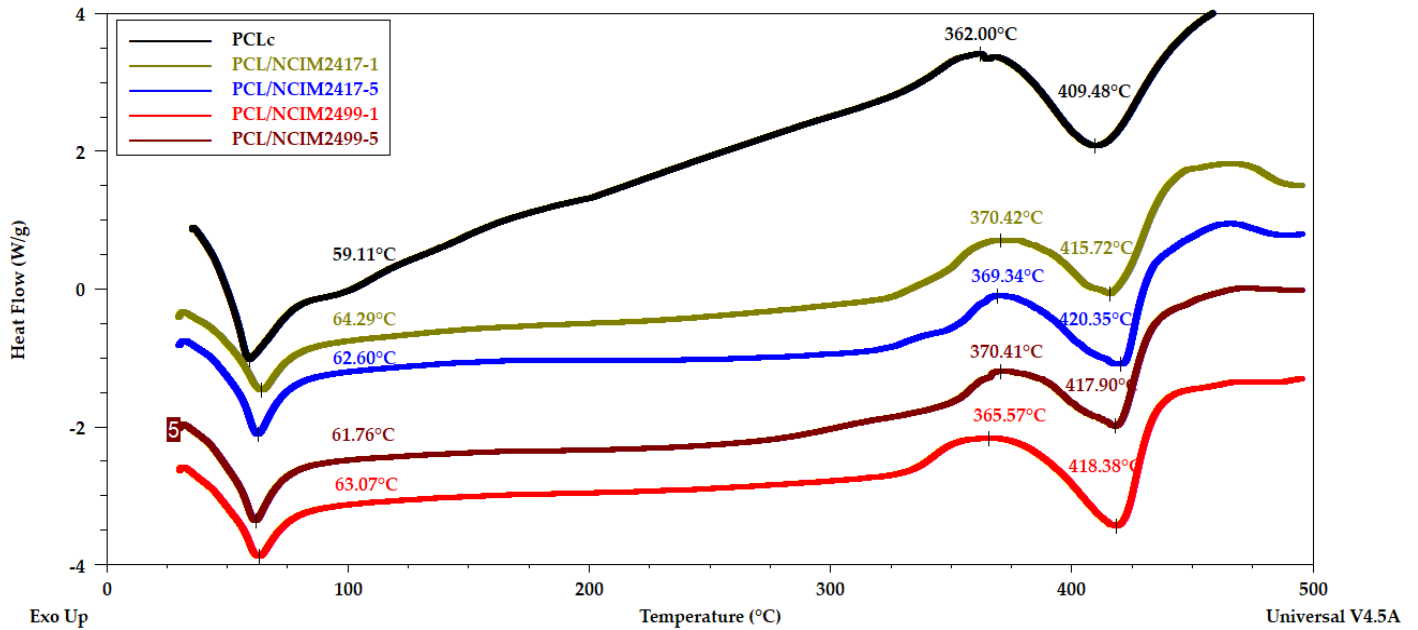
Tabla 5. Análisis de calorimetría diferencial de barrido de las fibras PCL, PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499.

Muestra	T <sub>f</sub> (°C)	T <sub>d</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)
PCLc	59.11	362.00	409.48
PCL/NCIM2417-1	64.29	370.42	415.72
PCL/NCIM2417-5	62.60	369.34	420.35
PCL/NCIM2499-1	61.76	370.41	417.90
PCL/NCIM2499-5	63.07	365.57	418.38

T<sub>f</sub>: Temperatura de fusión; T<sub>d</sub>: Temperatura de descomposición; T<sub>max</sub>: Temperatura máxima.

En el siguiente apartado, se observan las temperaturas características de las fibras de PCL y PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499, donde se puede apreciar que todas las muestras tienen presente un cambio de flujo de temperatura entre los 59 a 64 °C, esta temperatura corresponde a la temperatura de fusión ( $T_f$ ), reportada en la literatura (Abedalwafa et al., 2013), aunque hay algunas variaciones en temperatura entre las muestras, no es una diferencia significativa.

Por consiguiente, las fibras PCL/NCIM2417 poseen una temperatura de fusión dentro del rango reportado para las fibras de PCL puro (59 a 64 °C), comparando entre las dos proporciones del extracto NCIM2417 se puede afirmar que las fibras que poseen una mayor proporción del extracto (PCL/NCIM2417-5) presentan una temperatura de fusión menor (62.60°C). En el caso de las fibras de PCL/NCIM2499 se puede apreciar que la temperatura de fusión de es cercana a las fibras de PCL puro, y además entran en el rango de temperatura reportada para este polímero, comparando entre las dos proporciones del extracto NCIM2499, las fibras que tienen mayor proporción del extracto (PCL/NCIM2499-5) presenta una temperatura de fusión menor (61.76 °C) que la que tiene menos proporción del extracto (63.07 °C). Por lo tanto, en ambos grupos de muestra entre menor sea la proporción de extracto añadido mayor en su punto de fusión. Todas las fibras con extracto presentan una temperatura de fusión mayor que las fibras de PCL control, esto se puede conferir que la adición del extracto eleva el punto de fusión de las fibras (figura 27).



**Figura 27.** Termograma DSC de las fibras de PCL, PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499.

La poli (caprolactona) es un polímero semicristalino con una estructura regular, cuya temperatura de fusión reportada se encuentra entre los 59 a 64 °C, y su temperatura de transición vítrea se encuentra a los -60 °C, ya que posee un cuerpo con estructura semi cristalina, lo que le da alta dureza, debido a sus dominios amorfos cuando están en el estado elástico. (Abedalwafa et al., 2013)

### 8.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

En la tabla 6 se puede observar las temperaturas necesarias para degradar a las diferentes fibras de PCL, PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499.

**Tabla 6.** Análisis termogravimétrico de las fibras PCL, PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499.

Muestra	T <sub>0d</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	T <sub>q</sub> (°C)
PCLc	357.61°C	404.96°C	441.19°C
PCL/NCIM2417-1	361.78°C	404.51°C	434.10°C
PCL/NCIM2417-5	343.37°C	402.36°C	429.37°C
PCL/NCIM2499-1	337.56°C	404.82°C	428.42°C

---

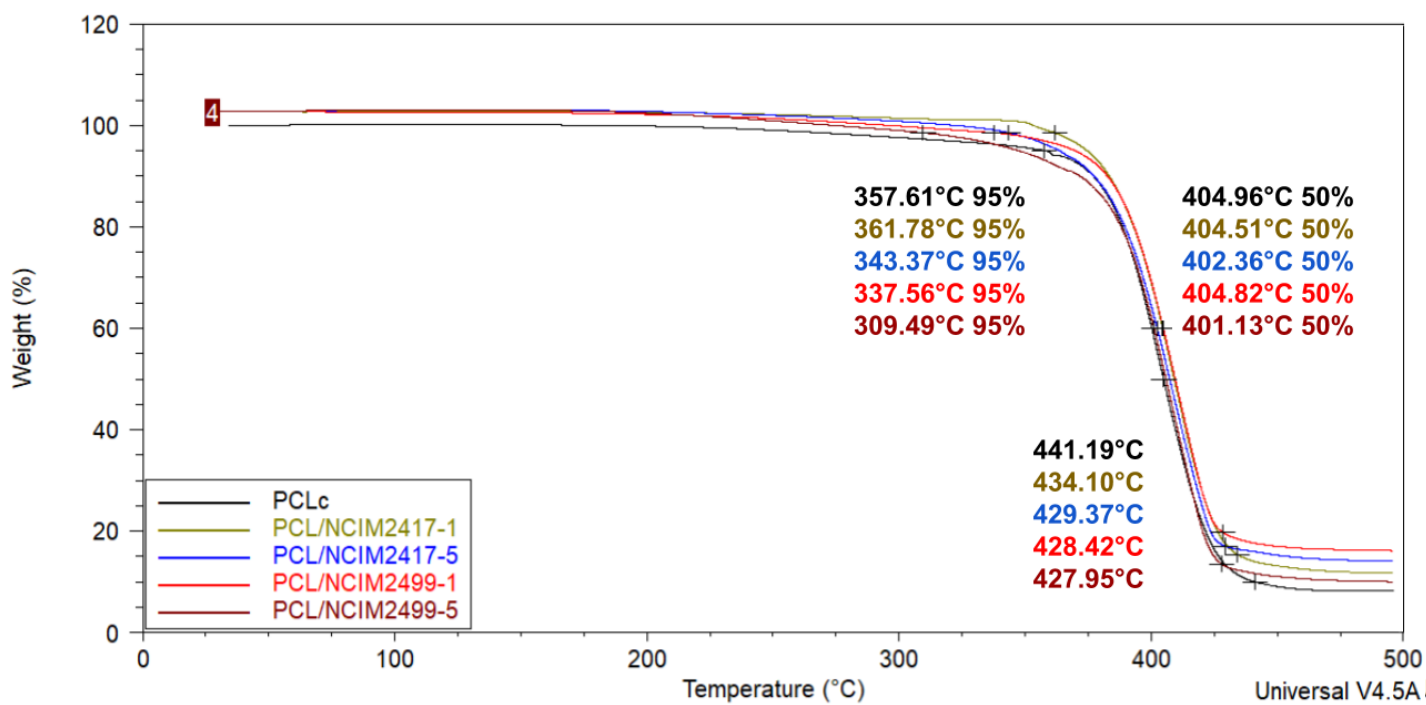
**T<sub>0d</sub>**: Temperatura inicial de degradación; **T<sub>c</sub>**: Temperatura crítica; **T<sub>q</sub>**: Temperatura de calcinación.

Se puede observar que las fibras requieren altas temperaturas (>300 °C) para degradar un 5% de masa de cada material. Las fibras que necesitó menor temperatura para perder el 5% de su masa fueron las fibras de PCL/NCIM2499-5, dicha temperatura corresponde a 309.49°C, y la muestra que presentó una temperatura mayor fue la muestra PCL/NCIM2417-1 con un 361.78°C, de manera general se puede observar, que entre mayor sea la proporción de extracto añadido a la solución polimérica menor es la temperatura necesaria para degradar una masa inicial en las muestras.

Esta pérdida de masa corresponde a la pérdida del solvente, se puede apreciar que a mayor proporción del complejo menor es la temperatura necesaria para iniciar con lo que se llama la temperatura de descomposición inicial (TDI). Está reportado que la temperatura de descomposición inicial (TDI) del PCL es 378.3 °C (Castilla-Cortázar et al., 2019), la cual es similar a nuestro trabajo.

Al llegar al 50% de pérdida de masa se puede apreciar que todos los sistemas fibrosos necesitan una temperatura muy similar entre los 404°C, también teniendo la observación que entre mayor es la proporción del extracto de actinomiceto en las fibras menor temperatura es necesario alcanzar para degradar la mitad de su masa. A esta temperatura se le denomina temperatura crítica (T<sub>c</sub>).

Así mismo, las fibras de PCL perdieron su mayor parte de la masa a los 441.19°C, dicha temperatura corresponde a la temperatura máxima (T<sub>max</sub>). La T<sub>max</sub> reportada para PCL es de 412.2 °C (Castilla-Cortázar et al., 2019), con respecto a las muestras con extracto bacteriano, ocupan una temperatura menor que la del control, teniendo el mismo patrón que las dos temperaturas anteriores, es decir, entre mayor es el contenido de actinomiceto, menor es la temperatura necesaria para degradar la mayor parte de su masa (Figura 28, Tabla 6)



**Figura 28.** Análisis termogravimétrico de las fibras de PCL, PCL/NCIM2417 y PCL/NCIM2499.

## 9. CONCLUSIONES

En este estudio se ha demostrado que la técnica de electrohilado es una técnica fácil, versátil y prometedora para fabricar nanofibras poliméricas funcionalizadas con extractos de actinomicetos que tiene capacidad antimicrobiana. Entre los resultados obtenidos se puede mostrar una dificultad para la preparación de las fibras con las condiciones propuestas, sin embargo, estructuras tridimensionales fueron resultantes con las condiciones planteadas. Los análisis termogravimétricos demostraron una alta estabilidad térmica en todas las fibras que contenían actinomicetos marinos. Con respecto a la actividad antimicrobiana de los extractos los extractos NCIM 2417 y NCIM 2499 poseen actividad antifungal para *Candida albicans* utilizando una concentración de 0.003 mg/mL, y actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, con la misma concentración, es importante destacar que dicha capacidad antimicrobiana de ambos extractos es similar a los antimicrobianos fluconazol y gentamicina. Las bacterias *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* no fueron afectadas por la presencia de los extractos de actinomicetos. Como objetivo futuro se pretende optimizar la fabricación de las fibras poliméricas con los extractos bacterianos y evaluar su capacidad antimicrobiana con los andamios fibrosos. Este estudio provee las bases necesarias para la optimización y creación de apósitos cutáneos con capacidad antimicrobiana para el tratamiento de heridas en piel, pie diabético y quemaduras.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Arias, J., Aller, M., Arias, J., & Lorente, L. (2001). Generalidades Médico - Quirúrgicas. Tebar. pp. 158-160.
- Barbe, V., Bouzon, M., Mangenot, S., Badet, B., Poulain, J., Segurens, B., ... Weissenbach, J. (2011). Complete Genome Sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a Producer of Antibiotics and Fluorometabolites. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 5055–5056. doi:10.1128/jb.05583-11
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Bunyaphatsara, N., Jirakulchaiwong, S., Thirawarapan, S., & Manonukul, J. (1996). The efficacy of Aloe vera cream in the treatment of first, second and third degree burns in mice. *Phytomedicine*, 2(3), 247–251.
- Castilla-Cortázar, I., Vidaurre, A., Marí, B., & Campillo-Fernández, A. J. (2019). Morphology, Crystallinity, and Molecular Weight of Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/Graphene Oxide Hybrids. *Polymers*, 11(7), 1099. <https://doi.org/10.3390/polym11071099>.
- Castillo, P. (2003). Quemaduras. Conceptos para el médico general. p58-62.
- Charousová, I., Medo, J., Halenářová, E., & Javoreková, S. (2017). Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 8(2), 46–51. [https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR\\_161\\_16](https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_161_16).
- Chaudhary, H. S., Yadav, J., Shrivastava, A. R., Singh, S., Singh, A. K., & Gopalan, N. (2013). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(2), 118–123. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.111528>.

- De Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of infectious diseases*, 16(5), 466-471.
- Duque Sánchez, L.M.; Rodriguez, L.; López, M. (2014). Electrospinning: La Era de las Nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(141), 10–27.
- Duraipandiyam, V., Sasi, A. H., Islam, V. I. H., Valanarasu, M., & Ignacimuthu, S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Médicale*, 20(1), 15–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2009.11.002>.
- El-hadi, A. M., & Al-Jabri, F. Y. (2016). Influence of electrospinning parameters on fiber diameter and mechanical properties of poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) and polyanilines (PANI) blends. *Polymers*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/polym8030097>.
- Enis, I. Y., Vojtech, J., & Sadikoglu, T. G. (2016). Alternative solvent systems for polycaprolactone nanowebs via electrospinning. *Journal of Industrial Textiles*, 47(1), 57–70. <https://doi.org/10.1177/1528083716634032>.
- Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K., & Potts, B. C. (2009). Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(6), 2175–2180. doi: 10.1016/j.bmc.2008.10.075
- Gensheimer, M., Brandis-Heep, A., Agarwal, S., Thauer, R. K., & Greiner, A. (2011). Polymer/Bacteria Composite Nanofiber Nonwovens by Electrospinning of Living Bacteria Protected by Hydrogel Microparticles. *Macromolecular Bioscience*, 11(3), 333–337. doi:10.1002/mabi.201000310
- Gómez, V. (2012). *Streptomyces griseus*: características, ciclo biológico y usos. En *LifeDer*.
- Hanumadass, M. (2006). *Arte y Ciencia del cuidado de heridas por quemaduras*. Editoriales amolca.
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Fortas, Z., & Pogni, R. (2018). *Streptomyces* secondary

- metabolites. *Basic Biology and Applications of Actinobacteria*, 99-122.
- Hirsch, A. M., & Valdés, M. (2010). Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 536–542. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.023
- Kearns, R. D., Holmes 4th, J. H., & Cairns, B. A. (2013). Burn injury: what's in a name? Labels used for burn injury classification: a review of the data from 2000-2012. *Annals of burns and fire disasters*, 26(3), 115.
- Labet, M., & Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, 38(12), 3484-3504.
- Li, Z., & Wang, C. (2013). Effects of Working Parameters on Electrospinning. *One-Dimensional Nanostructures*, 15–28. doi:10.1007/978-3-642-36427-3\_2.
- Liu, Y., Rafailovich, M. H., Malal, R., Cohn, D., & Chidambaram, D. (2009). Engineering of bio-hybrid materials by electrospinning polymer-microbe fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14201–14206. doi:10.1073/pnas.0903238106 sci-hub.tw/10.1073/pnas.0903238106
- Lloyd, E., Rodgers, B., Michener, M., Williams, M. (2012). Outpatient burns: prevention and care. En NCBI. Disponible en <http://www.familypracticeresidency.org/webres/File/Conferences/10-15-14%20AFP%20Review%20-%20Hennings.pdf>
- Local, T. (2014). Tratamiento de las quemaduras. Universidad Computense de Madrid. p.1–8. Disponible en <http://desastres.usac.edu.gt/documentos/pdf/spa/doc12535/doc12535-contenido.pdf>
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433-30437.
- Mahmoud, W. M., Vieth, R. F., & Coughlin, R. W. (1993). Migration of bacteria along synthetic polymeric fibers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 4(6),

567–578. doi:10.1163/156856293x00212

Maldonado, L. A. (2005). *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 55(5), 1759–1766. doi:10.1099/ijs.0.63625-0

Mayo Clinic. (2008). Quemaduras. En Mayo Clinic. Disponible en <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/burns/diagnosis-treatment/drc-203705>  
45

Millán-Aguíñaga, N., Chavarria, K. L., Ugalde, J. A., Letzel, A.-C., Rouse, G. W., & Jensen, P. R. (2017). Phylogenomic Insight into *Salinispora* (Bacteria, Actinobacteria) Species Designations. Scientific Reports, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-02845-3

Mochane, M. J., Motsoeneng, T. S., Sadiku, E. R., Mokhena, T. C., & Sefadi, J. S. (2019). Morphology and Properties of Electrospun PCL and Its Composites for Medical Applications: A Mini Review. Applied Sciences, 9(11), 2205. <https://doi.org/10.3390/app9112205>

Morejón García, M., Salup Díaz, R., & Cué Brugueras, M. (2003). Actualización en tetraciclinas. Revista Cubana de Farmacia, 37(3), 1-1.

Nagy, Z. K., Wagner, I., Suhajda, A., Tobak, T., Harasztos, A. H., Vigh, T., ... Marosi, G. (2014). Nanofibrous solid dosage form of living bacteria prepared by electrospinning. Express Polymer Letters, 8(5), 352–361. doi:10.3144/expresspolymlett.2014.39  
<http://sci-hub.tw/10.3144/expresspolymlett.2014.39>

Oltra Hostalet, F., Núñez-Núñez, M., Portillo Cano, M. del M., Navarro Bustos, C., Rodríguez-Baño, J., & Retamar Gentil, P. (2018). Análisis de la calidad de uso de antimicrobianos en el servicio de urgencias de un hospital de tercer nivel TT - Analysis of quality antimicrobial agent use in the emergency department of a tertiary care hospital. Emergencias (Sant Vicenç Dels Horts), 30(5), 297–302. Retrieved from <http://emergencias.portalsemes.org/descargar/anlisis-de-la-calidad-de-uso-de-antimicro>

bianos-en-el-servicio-de-urgencias-de-un-hospital-de-tercer-nivel/force\_download/

- Organización Mundial de la Salud (2008). A WHO plan for Burn Prevention and Care.
- Polytechnic, L. (1983). Numerical Classification of Streptomyces and Related Genera. En NCBI. DOI: 10.1099/00221287-129-6-1743
- Pommet, M., Juntaro, J., Heng, J. Y. Y., Mantalaris, A., Lee, A. F., Wilson, K., ... Bismarck, A. (2008). Surface Modification of Natural Fibers Using Bacteria: Depositing Bacterial Cellulose onto Natural Fibers to Create Hierarchical Fiber Reinforced Nanocomposites. *Biomacromolecules*, 9(6), 1643–1651. doi:10.1021/bm800169g
- Pompa, D. (2017). Estudio de Nanofibras de Gelatina/Colágeno con Potenciales Aplicaciones Médicas y Biotecnológicas. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Marina, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México.
- Rahman, M. A., Islam, M. Z., & Islam, M. A. U. (2011). Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnology Research International*, 2011, 857925. <https://doi.org/10.4061/2011/857925>.
- Ranjani, A., Dhanasekaran, D., & Gopinath, P. M. (2016). An Introduction to Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. doi:10.5772/62329
- Ronald, K., Foley, M., Pérez, E. (2019). Clasificación de Quemaduras. En Universidad de Rochester Centro Médico. Disponible en <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=90&ContentID=P09575>
- Salalha, W., Kuhn, J., Dror, Y., & Zussman, E. (2006). Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, 17(18), 4675–4681. doi:10.1088/0957-4484/17/18/025 sci-hub.tw/10.1088/0957-4484/17/18/025
- Sanford, A., Herndon, D. (2001). Current Therapy of burns. En NCBI. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6954/>
- Sengupta, S., Pramanik, A., Ghosh, A., & Bhattacharyya, M. (2015). Antimicrobial activities

- of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiology*, 15(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0495-4>.
- Shobha, K. S., & Onkarappa, R. (2011). In Vitro Susceptibility of *C. albicans* and *C. neoformans* to Potential Metabolites from Streptomyces. *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), 445–449. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0097-2>
- Sripreechusak, P., & Athipornchai, A. (2019). Potential antimicrobial properties of streptomyces isolated from Samruk Mountain soil, Chonburi Province, Thailand. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 10(4), 195–199. [https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR\\_55\\_19](https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_55_19).
- Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167(10), 571–580. doi:10.1016/j.micres.2012.06.005
- Talukdar, M., Bora, T. C., & Jha, D. K. (2016). Micromonospora: A Potential Source of Antibiotic. *Bioprospecting of Indigenous Bioresources of North-East India*, 195–213. doi:10.1007/978-981-10-0620-3\_12
- Velasco-Barraza, R. D., Álvarez-Suarez, A. S., Villarreal-Gómez, L. J., Paz-González, J. A., & Vera-Graziano, R. (2016). Designing a Low-Cost Electrospinning Device for Practical Learning in a Bioengineering Biomaterials Course, 37(1), 27–36.
- Villarreal-Gómez, L. J., Cornejo-Bravo, J. M., Vera-Graziano, R., & Grande, D. (2016). Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: a critically selected survey. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(2), 157–176.
- Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagström, B., Westbroek, P., & De Clerck, K. (2008). The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science*, 44(5), 1357–1362. doi:10.1007/s10853-008-3010-6.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. et al. *Arch Microbiol* (2001) 176: 386. <https://doi.org/10.1007/s002030100345>

