



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

“Síntesis de nanopartículas para liberación de analgésicos y antimicrobianos, para aplicaciones médico - quirúrgicas”

TESIS

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Por

HATZIRI ITZAYANA PEÑA PEÑA

Director de tesis

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla

Co-Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Tijuana, B.C. a 9 de diciembre de 2022

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.336
Tijuana, B.C., a 15 de noviembre del 2022

C. Hatziri Itzayana Peña Peña
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

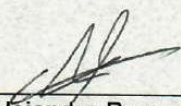
Es propuesto, por los C. Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla y
Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema "Síntesis de nanopartículas para liberación de analgésicos y
antimicrobianos, para aplicaciones médico - quirúrgicas"

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. EXPERIMENTAL
- III. RESULTADOS Y DISCUSIONES
- IV. CONCLUSIONES
- V. ANEXOS
- VI. REFERENCIAS

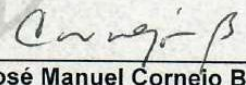

Dra. Ana Alejandra Ramirez Rodríguez
Sub-Directora


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co - Director de Tesis


Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla
Director de Tesis

Índice

Lista de figuras.....	6
Lista de tablas.....	8
Agradecimientos.....	9
Agradecimientos institucionales	9
Agradecimientos personales.....	9
Agradecimientos a CONACyT	10
Resumen.....	11
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	12
I.1 Antecedentes	12
I.2 Hipótesis	16
I.3 Justificación	16
I.4 Objetivo general	20
I.5 Objetivos específicos.....	20
I.6 Marco teórico.....	21
I.6.1 Sistemas de liberación modificada de fármacos	21
I.6.2 Nanopartículas	24
I.6.4 Nanogeles poliméricos.....	26
I.6.5 Nanopartículas como terapia contra bacterias	27
I.6.6 Polímeros como agentes antimicrobianos.....	29
I.6.7 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas	30
I.6.8 Técnicas de caracterización actualmente utilizadas en sistemas de liberación de fármacos	34
CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL.....	40
II.1 Síntesis de monómero de ácido metacriloiloxi- <i>o</i> -benzoico (MAOB)	40
II.2 Caracterización de monómero de MAOB	41
II.2.1 Cromatografía de Capa Fina (CCF)	41
II.2.2 Espectrofotometría de Infrarrojo con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	42
II.2.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN- H^1).....	42
II.3 Generación de sal de MAOB.....	42
II.4 Caracterización de sal de MAOB	43
II.5 Síntesis de nanopartículas poliméricas de MAOB	43
II.6 Caracterización de nanopartículas de MAOB	44

II.6.1 Dispersión de Luz Dinámica	44
II.6.2 Espectrofotometría Infrarrojo con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	45
II.7 Síntesis de nanopartículas de MAOB cargadas con clorhexidina	45
II.8 Caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas.....	47
II.8.1 Dispersión de Luz Dinámica	47
II.8.2 Espectrofotometría Infrarrojo con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	48
II.8.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	48
II.9 Incorporación de nanopartículas cargadas en suturas.....	50
II.10 Caracterización de suturas con nanopartículas poliméricas cargadas	51
II.11 Estudios de hidrólisis – liberación de nanopartículas a partir de suturas y cinética de liberación	52
II.12 Análisis y caracterización del medio de liberación para estudios de hidrólisis – liberación y estudio de la cinética de liberación de fármacos, por CLAR	53
II.12.1 Preparación de soluciones	53
II.12.2 Preparación de muestras	54
II.12.3 Condiciones cromatográficas	54
II.13 Evaluación de fuerza tensil y elasticidad de suturas cargadas	56
II.14 Evaluación antimicrobiana a partir de suturas cargadas	57
II.14.1 Preparación de medios	58
II.14.2 Sembrado de bacterias para obtención de cultivo de 24 horas	58
II.14.3 Preparación del inóculo	59
II.14.4 Inóculo en placa para la realización de antibiograma	59
II.14.5 Antibiograma con suturas cargadas.....	60
II.15 Evaluación de viabilidad celular.....	62
II.15.1 Evaluación de viabilidad celular por método indirecto.....	62
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	64
III.1 Síntesis de monómero de ácido metacrililoiloxi-o-benzoico (MAOB).....	64
III.2 Caracterización de monómero de MAOB.....	64
III.2.1 Cromatografía de capa fina (CCF)	64
III.2.2 Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)	65
III.2.3 Resonancia magnética nuclear (RMN-H ¹)	67
III.3 Caracterización de sal de MAOB.....	68
III.3.1 Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier, con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR).....	68

III.4 Caracterización del polímero de MAOB.....	70
III.4.1 Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier, con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR).....	70
III.4.1 Obtención de tamaño de partícula por medio de DLS.....	72
III.5 Cargado-incorporación de clorhexidina a nanopartículas.....	72
III.5.1 Obtención de liofilizado de nanopartículas poliméricas de MAOB cargadas con clorhexidina.....	72
III.6 Caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con clorhexidina.....	73
III.6.1 Caracterización de liofilizado de nanopartículas.....	73
III.7 Incorporación de nanopartículas cargadas en suturas.....	79
III.5.1 Obtención de suturas impregnadas con nanopartículas poliméricas de MAOB cargadas con clorhexidina.....	79
III.8 Caracterización de la incorporación de nanopartículas cargadas en suturas quirúrgicas....	80
III.8.1 Análisis por espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier, con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR).....	80
III.9 Análisis y caracterización del medio de liberación para estudios de hidrólisis – liberación y estudio de la cinética de liberación de fármacos, por CLAR.....	81
III.9.1 Estudios de hidrólisis-liberación.....	81
III.9.2 Cinética de liberación.....	84
III.10 Evaluación de fuerza tensil y elasticidad de suturas cargadas.....	84
III.11 Evaluación antimicrobiana a partir de suturas cargadas.....	86
III.11.1 Evaluación con <i>Escherichia coli</i>	86
III.11.2 Evaluación con <i>Enterococcus faecalis</i>	89
III.11.3 Evaluación con <i>Staphylococcus aureus</i>	91
III.11.4 Evaluación con <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina.....	94
III.11.5 Comparativo entre suturas.....	97
II.12 Evaluación de viabilidad celular.....	99
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES.....	102
CAPÍTULO V. ANEXOS.....	104
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS.....	106

Lista de figuras

Figura 1. Infecciones nosocomiales en los Estados Unidos.	13
Figura 2. Sutura poliglactina 910 vista en microscopio electrónico (60x).	14
Figura 3. Representación de monómeros (a) y polímero (b)..	15
Figura 4. Estructura química de un poliéster	16
Figura 5. Sutura quirúrgica tradicional vs recubierta con antimicrobiano	18
Figura 6. Estructura química de clorhexidina.	19
Figura 7. Estructura química del monómero metacriloiloxi- <i>o</i> -benzoico (MAOB)	20
Figura 8. Representación esquemática de una matriz hidrofílica después de determinado tiempo.	22
Figura 9. Representación esquemática de una matriz lipofílica.	23
Figura 10. Sistemas osmóticos monolíticos.....	24
Figura 11. Nanopartículas dirigidas específicamente hacia células tumorales para administración de fármacos.	25
Figura 12. Estructura química del ácido poli(d, l-láctico-co-glicólico).....	26
Figura 13. Nanogeles biocompatibles sensibles a estímulos	27
Figura 14. Liposomas como estructuras para cargado y liberación de fármacos	29
Figura 15. Polímeros antimicrobianos (AMP).....	30
Figura 16. Método de evaporación de solvente para formación de nanoesferas.	31
Figura 17. Método de emulsión / evaporación	32
Figura 18. Emulsión por precipitación	33
Figura 19. Nanoprecipitación	34
Figura 20. Representación esquemática de la técnica de DLS	35
Figura 21. Representación esquemática de la técnica de espectrofotometría infrarrojo	36
Figura 22. Representación esquemática de la técnica de resonancia magnética nuclear	37
Figura 23. Diagrama básico de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	38
Figura 24. Representación esquemática de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	39
Figura 25. Ruta de síntesis de ácido metacriloiloxi- <i>o</i> -benzoico.....	40
Figura 26. Cromatografía de capa fina	41
Figura 27. Ruta de síntesis de sal de MAOB.....	43
Figura 28. Reacción de polimerización	44
Figura 29. Lectura de poli(MAOB) en espectrofotómetro infrarrojo.....	45
Figura 30. Reacción de polimerización de nanopartículas cargadas con clorhexidina	47
Figura 31. Incorporación de nanopartículas poliméricas de clorhexidina en suturas quirúrgicas.	51
Figura 32. Hidrólisis-liberación de nanopartículas poliméricas cargadas con clorhexidina.	53
Figura 33. Sutura en analizador de textura Brookfield CT3.....	57
Figura 34. Sembrado por agotamiento.....	59
Figura 35. Sembrado con hisopo por estría cerrada.....	59
Figura 36. Procedimiento general del cargado de suturas quirúrgicas por el método de inmersión	61
Figura 37. Colocación de suturas en caja Petri.....	62

Figura 38. Placa de 96 pocillos con DMEM.....	62
Figura 39. Lector de placas Multiskan FC Thermo Scientific.....	63
Figura 40. Cromatografía de capa fina. (A, representa al estándar de referencia de ácido salicílico; B, representa la muestra de MAOB)	65
Figura 41. Espectro de infrarrojo del monómero de MAOB.....	66
Figura 42. Espectro de RMN- H^1 del monómero de MAOB.....	68
Figura 43. Espectro IR comparativo de MAOB y su forma en sal.....	69
Figura 44. Espectro de infrarrojo comparativo de la sal de MAOB y el polímero de MAOB....	71
Figura 45. Representación gráfica del tamaño de partícula obtenido al polimerizar el monómero de MAOB.....	72
Figura 46. Liofilizado de nanopartículas poliméricas de MAOB cargadas con clorhexidina	73
Figura 47. Representación gráfica del tamaño de partícula obtenido previo (a) y después (b) de la reacción de polimerización de partículas de MAOB cargadas con clorhexidina, así como después de liofilizadas (c)	74
Figura 48. Espectro IR comparativo entre el liofilizado de nanopartículas poliméricas cargadas con clorhexidina, sal de MAOB y clorhexidina diacetato	76
Figura 49. Cromatograma del estándar dual con ácido salicílico (pico 1) y clorhexidina diacetato (pico 2).....	78
Figura 50. Cromatograma de la solución con liofilizado de nanopartículas poliméricas de MAOB cargadas con clorhexidina.....	79
Figura 51. Suturas cargadas con nanopartículas poliméricas de 15 cm, 3 cm y 1 cm de longitud, respectivamente.....	79
Figura 52. Espectro comparativo entre una sutura blanco, sutura cargada y el liofilizado de nanopartículas poliméricas cargadas.....	80
Figura 53. Cromatograma del estándar dual de ácido salicílico y clorhexidina diacetato.....	81
Figura 54. Cromatograma de la muestra del medio de liberación con los fármacos ácido salicílico y clorhexidina diacetato.....	82
Figura 55. Acercamiento del cromatograma de la muestra del medio de liberación con los fármacos ácido salicílico y clorhexidina diacetato	83
Figura 56. Cinética de liberación de fármacos	84
Figura 57. Gráfico de fuerza tensil ejercida para la ruptura de sutura blanco y sutura cargada..	85
Figura 58. Halo de inhibición de la sutura blanco y sutura patrón, a los días 1 y 5 en <i>E. coli</i>	86
Figura 59. Halo de inhibición de las suturas cargadas, a los días 1, 3 y 5, en <i>E. coli</i>	87
Figura 60. Halo de inhibición de sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y sutura con clorhexidina diacetato, en <i>E. coli</i> , días 1 y 5	88
Figura 61. Halo de inhibición de la sutura blanco y sutura patrón, a los días 1 y 5 en <i>E. faecalis</i>	89
Figura 62. Halo de inhibición de las suturas cargadas, a los días 1, 3 y 5, en <i>E. faecalis</i>	90
Figura 63. Halo de inhibición de sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y sutura con clorhexidina diacetato, en <i>E. faecalis</i> , días 1 y 5.	91
Figura 64. Halo de inhibición de la sutura blanco y sutura patrón, a los días 1 y 5 en <i>S. aureus</i>	92
Figura 65. Halo de inhibición de las suturas cargadas, a los días 1, 3 y 5, en <i>S. aureus</i>	92

Figura 66. Halo de inhibición de sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y sutura con clorhexidina diacetato, en <i>S. aureus</i> , días 1 y 5.	94
Figura 67. Halo de inhibición de la sutura blanco y sutura patrón, a los días 1 y 5 en SARM. ..	95
Figura 68. Halo de inhibición de las suturas cargadas, a los días 1, 3 y 5, en SARM.....	95
Figura 69. Halo de inhibición de sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y sutura con clorhexidina diacetato, en SARM, días 1 y 5.....	97
Figura 70. Gráfico comparativo de halos de inhibición entre suturas estudiadas, al día 1.....	98
Figura 71. Gráfico comparativo de halos de inhibición entre suturas estudiadas, al día 5.....	99
Figura 72. Placa de 96 pocillos con cultivo de células y elución de suturas.	100
Figura 73. Gráfico comparativo del porcentaje de viabilidad celular.....	101

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para el análisis por CLAR.	50
Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el análisis por CLAR	55
Tabla 3. Secuencia de inyecciones para análisis de por CLAR. Estudio de hidrólisis – liberación de fármacos	55
Tabla 4. Secuencia de inyecciones para análisis de por CLAR. Estudio de cinética de liberación de fármacos	56
Tabla 5. Condiciones de análisis para resistencia a la tracción	57
Tabla 6. Orden de colocación de suturas	61
Tabla 7. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro infrarrojo de MAOB.....	67
Tabla 8. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro infrarrojo de la sal de MAOB.....	69
Tabla 9. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro IR del polímero de MAOB	71
Tabla 10. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro infrarrojo de clorhexidina diacetato	75
Tabla 11. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro infrarrojo del liofilizado de nanopartículas cargadas de clorhexidina	77
Tabla 12. Concentración de ácido salicílico y clorhexidina en el medio de liberación	83
Tabla 13. Diámetro de los halos de inhibición de suturas en cultivo con <i>Escherichia coli</i>	88
Tabla 14. Diámetro de los halos de inhibición de suturas en cultivo con <i>Enterococcus faecalis</i>	90
Tabla 15. Diámetro de los halos de inhibición de las suturas en cultivo con <i>S. aureus</i>	93
Tabla 16. Diámetro de los halos de inhibición de suturas en cultivo con SARM.	96

Agradecimientos

Agradecimientos institucionales

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías, por ser mi casa de estudios durante dos años más, pues después de recibirme durante la carrera universitaria por cuatro años, ahora también me permitió ser parte de la comunidad de posgrado. Gracias por seguir formando estudiantes que desean superarse y crecer profesionalmente.

Gracias a los doctores, profesores e investigadores que apoyaron este proyecto, pues debido a sus conocimientos y aportaciones, se logró ampliar mi panorama y ver con mayor claridad al momento de realizar experimentos y buscar alternativas cuando hubo dificultades. Gracias por todo su apoyo Dr. Héctor Magaña, por apoyarme, por darme su confianza y guiarme durante este camino. Fue bueno ver como poco a poco creció y sigue creciendo el laboratorio y se ha buscado la mejora de las instalaciones y equipos, para un desarrollo óptimo en la investigación. De igual manera, agradezco a la Dra. Kenia Palomino por sus aportaciones y por ayudarme a resolver dudas que iban surgiendo día con día. Gracias por compartir su conocimiento y dar consejos que ayudaron a mejorar y optimizar los procesos, recursos y el tiempo. Gracias, también al Dr. José Cornejo por sus contribuciones y aportaciones únicas e importantes, por apoyarme cuando se requirió. Gracias a la Dra. Lilia Hurtado por permitirme hacer uso de su laboratorio y apoyarme durante la realización de una parte fundamental de este proyecto, gracias por su empatía y paciencia en cada momento.

Muchas gracias también a la maestra Brisa Hernández por el material proporcionado para la realización de este proyecto y por todas las aportaciones que realizó cada vez que lo necesité, por todo el conocimiento heredado y por su tiempo. Gracias al maestro Hebrón Vázquez, también por sus aportaciones, por siempre apoyar y ser un gran colega.

Agradecimientos personales

Agradezco enormemente a todas las personas que estuvieron presentes durante este proceso, gracias por el apoyo moral, por la comprensión y por el soporte emocional.

Gracias, Angel Medina, por ser un gran compañero dentro y fuera del laboratorio, por ayudarme en muchas ocasiones con tus conocimientos, tu comprensión y tu cariño. Gracias por el tiempo que invertiste apoyándome siempre. Eres sin duda una gran persona.

Gracias a mi familia, a mis padres y hermanos que me apoyaron de la manera que estaba en sus posibilidades. Gracias por sus palabras de ánimo y apoyo extra escolar.

Gracias, también, a mis compañeros de laboratorio, por su compañía, aportaciones y apoyo de manera genuina. Me ayudaron a mejorar y ampliar mis conocimientos. Gracias Angel Medina, Teresa Rodríguez, Vanessa González, Daniel Sosa y Gabriela Valenzuela. Hicieron que mis días dentro y fuera del laboratorio fueran más amenos y que los momentos difíciles no lo parecieran, sobre todo al final de cada semestre.

Gracias a mis amigas incondicionales. Gracias Laura por todo tu apoyo, pues a pesar de la distancia, siempre mostraste ese apoyo y cariño. Gracias por esas palabras de ánimo y por siempre confiar en mí y mi capacidad, soy afortunada de contar con tu amistad en mi vida. Gracias Cristal, por siempre estar para mí en los momentos difíciles, por escucharme y aconsejarme cuando más lo necesitaba. Siempre estaré agradecida por tu compañía y comprensión, por ser una gran amiga con la que puedo contar en las buenas y en las malas.

Agradecimientos a CONACyT

Agradezco enormemente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU 1064227), durante mis estudios de posgrado y la realización de este proyecto, pues gracias a ello, se logró su conclusión de manera satisfactoria. Gracias también, a la convocatoria de investigación de ciencia básica CONACYT 2017-2018 del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación CB2017-2018 (proyecto A1-S-29789).

Resumen

En la actualidad, existe un problema de salud que afecta a gran parte de la población, esto es la infección en heridas, específicamente las heridas causadas después de un procedimiento quirúrgico, estas infecciones son mejor conocidas como infecciones de sitio quirúrgico y vienen ligadas a una problemática altamente preocupante, pues para tratarlas, es necesario hacer uso de antimicrobianos, como los contenidos en suturas quirúrgicas. Sin embargo, los medicamentos utilizados actualmente, han mostrado un aumento inminente de la resistencia bacteriana, es por ello que se siguen buscando alternativas a este problema, pues, aunque no es conveniente el dejar de utilizarlos, es importante hacer un buen manejo de ellos.

Es por ello que, en esta investigación, se buscó sintetizar un sistema nanométrico y polimérico de liberación del fármaco ácido salicílico y clorhexidina, además de su cargado en dispositivos médicos, como lo son los hilos de sutura. Esto con el fin de ser de utilidad en la terapia del paciente afectado por alguna herida causada en operaciones o intervenciones quirúrgicas, esto gracias a que la clorhexidina funciona como un antimicrobiano y el ácido salicílico es conocido por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas.

El sistema desarrollado, se caracterizó por medio de técnicas analíticas como: dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H). A partir de las suturas cargadas se realizaron estudios de liberación de los fármacos, evaluándolos por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC), así como también se valoró su viabilidad celular con dos diferentes líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas. Finalmente, se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana para confirmar la capacidad de inhibición en bacterias comunes en heridas por parte de los hilos de sutura, utilizando las bacterias: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

Los resultados obtenidos nos mostraron un panorama positivo, pues se logró la obtención de un sistema nanométrico y polimérico, así como también, se logró caracterizar de manera individual y cargado en suturas quirúrgicas. Se comprobó la liberación de ambos fármacos al medio de disolución, por medio de CLAR. Se confirmó que las suturas son capaces de inhibir bacterias durante 5 días sin generar tolerancia. Además, se comprobó que las suturas no generan muerte celular significativa, pues se cumple con un porcentaje $\geq 80\%$ de viabilidad celular.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

I.1.1 Heridas e infecciones de la piel

La piel es el órgano más extenso del organismo y constituye la primera línea de defensa. Aun cuando esta se encuentra limpia, la superficie de la piel no es estéril, pues está poblada de una mezcla de microorganismos que forman parte de su biota. Esta biota es una barrera dinámica que ayuda a mantener a los microorganismos patógenos alejados. Aunque, también, existen algunos microorganismos patógenos que pueden estar presentes en la piel y que no suelen causar ninguna enfermedad ni activar el sistema inmune. Sin embargo, cuando se produce alguna herida en la piel o si el individuo se encuentra inmunocomprometido, entonces cualquiera de estos microorganismos puede provocar una infección en la piel. Estas infecciones desencadenan una reacción por parte del sistema inmunológico, provocando la inflamación y daño tisular y retardando el proceso de curación. La mayoría de las infecciones suelen localizarse en un área pequeña y curarse por sí solas. Otras pueden persistir y, de no tratarse, pueden aumentar en severidad y propagarse por el organismo. Algunas infecciones se diseminan hacia otros órganos y / o hacia la sangre, provocando una infección sistémica (septicemia) ¹.

Las heridas son rupturas de la integridad de la piel y los tejidos, estas pueden tratarse de cortes superficiales como rasguños, pero también pueden ser perforaciones, quemaduras o el resultado de algún procedimiento quirúrgico o dental. Los microorganismos susceptibles de infectar estas heridas dependen de la extensión y la profundidad de esta, del ambiente en el que se produjo dicha herida y de los microorganismos presentes en la piel del individuo ¹.

I.1.2 Infecciones nosocomiales e infecciones de sitio quirúrgico

La Secretaría de Salud, por medio de un informe, define las infecciones nosocomiales (IN) como aquellas infecciones asociadas a cuidados de la salud. Estas se consideran un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social y constituyen un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable de su atención. Un tipo de IN, son las infecciones de sitio quirúrgico (ISQ), y en este informe se determinó que estas ocupan el tercer lugar de infecciones mayormente presentada en el paciente después o durante su estancia hospitalaria ².

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ISQ son la complicación más común después de cualquier cirugía. En países de bajos y medianos ingresos, afecta a una tercera parte de los pacientes que se sometieron a algún procedimiento quirúrgico. Y aunque las ISQ tienen menor incidencia en países de altos ingresos, estas son el segundo tipo más frecuente de infección nosocomial en Europa y en los Estados Unidos de América ³. Un estudio realizado en 2014 por la doctora Magill, en este último país mostró que, de 504 pacientes, 452 presentaban una IN, de los cuales el 22% eran a causa de una ISQ, como se muestra en la **figura 1** ⁴.

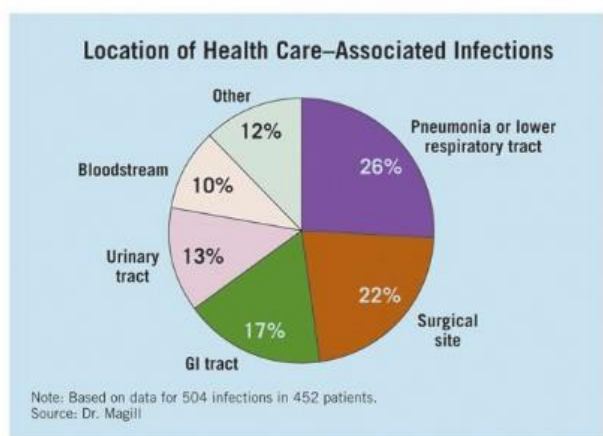


Figura 1. Infecciones nosocomiales en los Estados Unidos. (S. Magill, 2018).

La OMS ha presentado 29 recomendaciones para prevenir las ISQ, una de ellas es la utilización de suturas recubiertas de antimicrobianos, como las suturas recubiertas con triclosán, independientemente del tipo de cirugía, las cuales no se han asociado a eventos adversos. Aunque, aun cuando se utilicen este tipo de sutura, se deben, también, llevar a cabo otras medidas de higiene y prevención como el baño preoperatorio y el lavado de manos con jabón antimicrobiano antes de utilizar guantes estériles ^{3,4}.

I.1.3 Sutures recubiertas con antimicrobianos

Las suturas han sido necesarias desde antes del inicio de la medicina y los materiales con las que estas se hacen han evolucionado desde cabezas de hormigas, lino y crin hasta los productos que existen en la actualidad. Si bien los materiales han ido cambiando, la finalidad de una sutura sigue siendo la misma, facilitar y acelerar la cicatrización de una herida mediante la aproximación de los bordes, permitiendo que el proceso de cicatrización natural se lleve a cabo después de una lesión o cirugía ⁵. Sin embargo, los materiales de sutura tienen un papel relevante en el desarrollo de las

ISQ, dado que proporcionan una superficie local para la adherencia de microorganismos, formando una biopelícula que promueve la resistencia bacteriana y el tratamiento antimicrobiano, predisponiendo a la herida para desarrollar una infección, además de ocasionar en algunos pacientes respuestas inflamatorias excesivas ⁶.

Por lo tanto, en la década de 1950 se dio a conocer el uso de suturas con recubrimiento antimicrobiano para reducir el riesgo relacionado con las suturas o ISQ, previniendo la colonización y reduciendo la adhesión bacteriana. Los antisépticos tienen poco riesgo de resistencia en comparación con los antibióticos, debido a su acción rápida y directa en múltiples sitios específicos. Así mismo, las suturas antimicrobianas deben cumplir con un acto de equilibrio entre la inhibición de bacterias y el mantenimiento de la biocompatibilidad de las células eucariotas de los tejidos que rodean ⁶.

Los dispositivos médicos recubiertos con agentes antibacterianos, como clorhexidina y triclosán, se han convertido en una parte significativa del esfuerzo por disminuir el riesgo selectivo a infección asociada. En 2002 la Food and Drugs Administration (FDA) aprobó la primera sutura recubierta con antimicrobiano, la poliglactina 910 (**figura 2**) y la recubierta con triclosán (policlorofenoxifenol) que tiene actividad de amplio espectro contra Gram positivos y Gram negativos ⁷.



Figura 2. Sutura poliglactina 910 vista en microscopio electrónico (60x). (S. Hernández, 2020).

Sin embargo, se ha encontrado una gran desventaja en el triclosán, pues este es utilizado no solo en el ámbito médico, si no también, en cosméticos, higiene y productos del hogar, lo cual ha ocasionado un aumento de la resistencia de bacterias contra este fármaco. Por eso, se han buscado alternativas como la utilización de clorhexidina como recubrimiento, debido a que es un

antiséptico eficaz contra un amplio espectro relevante de patógenos incluyendo bacterias como *Staphylococcus aureus* ⁷.

I.1.4 Polímeros biodegradables en suturas

La palabra polímero deriva del griego *poli* y *meros*, que significan *mucho* y *partes*, respectivamente. Los polímeros (**figura 3, b**) son moléculas de gran tamaño (macromolécula), constituidas por “eslabones” orgánicos denominados monómeros (**figura 3, a**), unidos mediante enlaces covalentes. Los eslabones están formados, fundamentalmente, por átomos de carbono y pueden poseer grupos laterales o radicales con uno o más átomos. Un ejemplo de ello, es la molécula de polietileno (PE) que está formada por monómeros de etileno, cada monómero está formado por dos átomos de carbono y 4 de hidrógeno ^{8,9}.

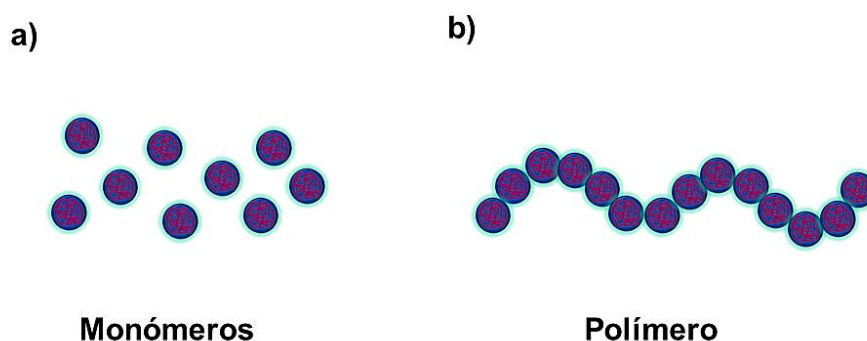


Figura 3. Representación de monómeros (a) y polímero (b). (Diseño propio).

Los polímeros sintéticos se producen mediante un proceso denominado polimerización, en el cual se produce una reacción de miles de monómeros que pasan a formar parte de una larga cadena macromolecular ¹⁰.

Los poliésteres, como su nombre lo dice, contienen enlaces éster que son degradables hidrolíticamente. Se encuentran dentro de este grupo los polihidroxialcanoatos, la policaprolactona y los ácidos poliglicólico y poliláctico. Los poliésteres biodegradables (**figura 4**) tienen aplicación en el campo de la medicina en suturas quirúrgicas, estos polímeros deben ser biocompatibles para poder ser utilizados con este fin ¹⁰.

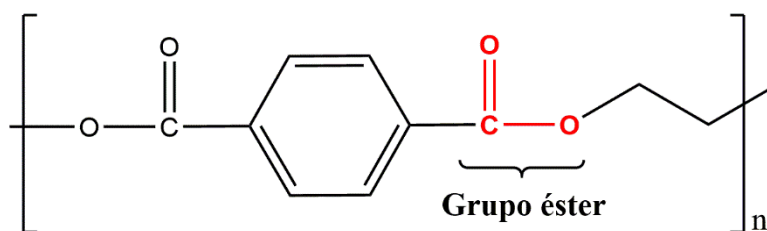


Figura 4. Estructura química de un poliéster. (Diseño propio).

I.2 Hipótesis

Las nanopartículas poliméricas cargadas de fármacos con propiedades analgésicas y antimicrobianas, podrían tener actividad eficaz al aplicarse vía tópica y, posteriormente, podrían ser utilizadas en dispositivos médicos para evitar procesos infecciosos en heridas o procedimientos médico – quirúrgicos.

I.3 Justificación

En la actualidad existe un aumento de la prevalencia de infección en heridas, debido a: consecuencias clínicas y epidemiológicas, a la amenaza creciente de los microorganismos resistentes, y a la falta de interés por el uso racional de los antibióticos, así como por un mal diagnóstico médico ¹¹. Por lo cual es muy importante la realización de un correcto diagnóstico y tratamiento para evitar consecuencias graves e incluso mortales en el paciente.

Existen infecciones las cuales son contraídas en el hospital, también denominadas infecciones nosocomiales (IN), estas son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social y constituyen un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable de su atención ².

En México se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía de 2.1 % hasta 15.8 %. En las unidades de cuidados intensivos (UCI), la situación es más preocupante, pues un estudio realizado en 895 pacientes de 254 UCI en México se encontró que 23.2 % de éstos tenía una infección nosocomial. ISQ fueron la tercera infección más común con un 13.3 %, estando por debajo de la neumonía y la infección urinaria. La letalidad asociada a estas IN fue de 25.5 % ².

Las ISQ son la complicación más común después de cualquier cirugía; comprometen la incisión, tejidos y órganos o cavidades manipuladas, y pueden ser detectadas hasta 30 días después de realizada la cirugía. Según la Asociación Mexicana de Cirugía General A.C., los pacientes que la presentan tienen 5 veces más probabilidad de ser readmitidos en el hospital y entre 2 y 11 veces más probabilidades de morir que los pacientes que no la padecen ¹.

Las ISQ aumentan los costos de la atención de la salud, ya que implican estancias prolongadas en el hospital, un mayor consumo de recursos hospitalarios y un incremento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Además, existen costos indirectos asociados a las ISQ que incrementan la carga económica asociada; entre ellos están la pérdida de productividad, el ausentismo laboral y las incapacidades de los pacientes que las desarrollan ¹.

Según fuentes públicas, se estima que en México una ISQ le cuesta aproximadamente \$74,500 MXN a un hospital público de tercer nivel en 2017, pudiendo este número aumentar si el paciente desarrolla otras complicaciones ¹. Además, las tasas notificadas de ISQ suelen oscilar entre el 2 y el 5 %, pero pueden incluso aumentar hasta un 25% para cirugía colorrectal ⁷. Todo esto aunado a que las ISQ aumentan la estancia y los costos hospitalarios ¹. En los Estados Unidos de América contribuyen a que los pacientes pasen 400,000 días más en el hospital, con un costo adicional de \$900 millones de dólares al año ¹².

Por su importancia y como causa de muerte y enfermedad, el sector salud ha buscado reducir la prevalencia de estas infecciones a lo largo de los últimos años, sin embargo, no se han tenido resultados satisfactorios hasta ahora.

Con base en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de las Directrices Mundiales para la Prevención de la Infección del Sitio Quirúrgico, se sugiere el uso de suturas recubiertas con antimicrobianos, como una forma de reducir el riesgo de infecciones postoperatorias ¹². Pues las suturas con recubrimiento antimicrobiano previenen la colonización y reducen la adhesión bacteriana ⁴.

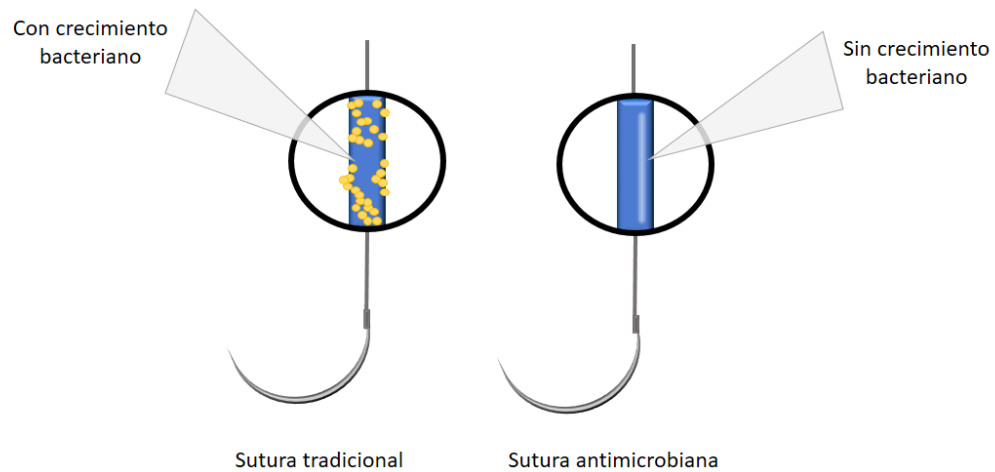


Figura 5. Sutura quirúrgica tradicional vs recubierta con antimicrobiano. (Modificado de Ethicon, Johnson&Johnson).

Los dispositivos médicos recubiertos con agentes antimicrobianos, como clorhexidina y triclosán, se han convertido en una parte significativa del esfuerzo por disminuir el riesgo selectivo a infección asociada. Sin embargo, este tiene una gran desventaja en el triclosán, pues se ha encontrado que ha ocasionado un aumento de la resistencia de bacterias debido a su amplio uso. Por eso, se han buscado alternativas como la utilización de clorhexidina como recubrimiento, debido a que es un antiséptico eficaz contra un amplio espectro relevante de patógenos ⁶.

La clorhexidina (**figura 6**) es un fármaco que funciona como antiinflamatorio y que además presenta actividad antibacteriana de amplio espectro, siendo activa frente a microorganismos (gram + y gram -), hongos, dermatofitos y algunos virus. Es bactericida a concentraciones altas y bacteriostática a bajas concentraciones. No produce cambios en las resistencias bacterianas ni sobrecrecimiento de microorganismos oportunistas. Dadas estas características, se cree que este fármaco podría ser de gran utilidad al implementarse en el hilo de sutura. ¹³.

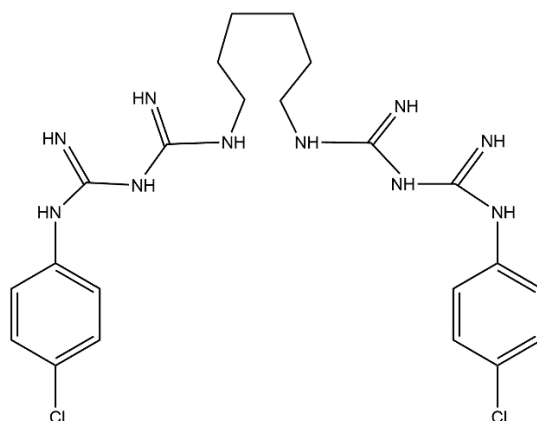


Figura 6. Estructura química de clorhexidina. (Diseño propio).

Por otro lado, los sistemas poliméricos y nanométricos han llamado la atención en los últimos años, pues estos presentan grandes ventajas al ser utilizados como sistemas de liberación de fármacos. Entre sus ventajas se encuentra que son biocompatibles, son capaces de mantener el nivel terapéutico apropiado por periodos de tiempo prolongados, pueden dirigir el fármaco al tejido o al sitio deseado y, hablando específicamente de los polímeros de tamaño nanométrico, estos son capaces de atravesar barreras celulares y tisulares, gracias precisamente a su tamaño ^{8, 9, 14}.

La base estructural de los sistemas poliméricos son los monómeros, en la actualidad se ha reportado la utilización de muchos de ellos, un ejemplo es el monómero metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB) (**figura 7**). Este monómero ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, esto debido a una característica peculiar que es funcionar como un profármaco polimérico, pues al someterse a ciertas condiciones de pH y temperatura, puede ser hidrolizado el éster presente en su estructura y así liberar su forma activa, el ácido salicílico, para con ello ejercer la acción terapéutica deseada ^{15, 16}. El ácido salicílico es un fármaco conocido por sus propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, pues se ha propuesto que sus mecanismos de acción consisten en la inhibición de la ciclooxigenasa, la actividad de IKK- β , la topoisomerasa II así como del factor nuclear kB (NF-kB) ¹⁷.

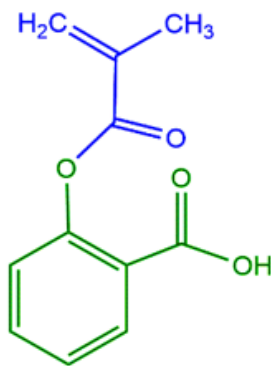


Figura 7. Estructura química del monómero metacrililoiloxi-*o*-benzoico (MAOB). (Diseño propio).

Por lo cual, se propone un sistema de liberación de fármaco, constituido por un sistema polimérico y nanométrico a base de MAOB, cargado con clorhexidina, siendo este biocompatible y presentando mejor biodisponibilidad al ser aplicado directamente en el sitio afectado. Al implementarlo en suturas para el tratamiento de heridas causadas en un procedimiento quirúrgico, podría ser una prometedora opción para lograr la reducción de la prevalencia de infecciones postoperatorias, lo cual disminuiría, a su vez, los costos de la atención de la salud y el consumo de recursos hospitalarios, pero lo más importante: se disminuiría la morbilidad y mortalidad de los pacientes.

I.4 Objetivo general

Desarrollar un sistema polimérico y nanométrico para cargado de fármacos analgésico y antimicrobiano, capaz de ser implementado en hilos de sutura biodegradables, así como su caracterización y evaluación.

I.5 Objetivos específicos

I.5.1 Sintetizar nanopartículas por medio de polimerización vía radicales libres basado en monómero de MAOB (ácido metacrililoiloxi-*o*-benzoico), y su caracterización por dispersión de luz dinámica (DLS), espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR) y resonancia magnética nuclear (RMN ^1H).

I.5.2 Realizar cargado - incorporación de clorhexidina a nanopartículas de MAOB y a su vez incorporarlas a suturas quirúrgicas para su posterior caracterización por FTIR-ATR, CLAR y determinación de fuerza tensil.

I.5.3 Estudiar proceso de hidrólisis - liberación de fármacos y cuantificar, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

I.5.4 Evaluar actividad antimicrobiana de suturas cargadas con nanopartículas sintetizadas por medio de la técnica de Kirby-Bauer.

I.5.5 Evaluar viabilidad celular de nanopartículas en línea celular de fibroblastos BALB-3t3, células de HeLa y células de melanoma.

I.6 Marco teórico

I.6.1 Sistemas de liberación modificada de fármacos

Según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), describe a las formas farmacéuticas de liberación modificada de fármacos (FLM) como aquellas en las cuales se eligen las características de la liberación en el curso del tiempo y/o en la localización para lograr objetivos terapéuticos o de conveniencia que no ofrecen las formas farmacéuticas convencionales ^{18, 19}.

Existen diferentes criterios para clasificar las FLM según la vía de suministro, el mecanismo de liberación o de acuerdo con el sistema tecnológico utilizado. Según este último criterio, los principales sistemas pueden dividirse en: monolíticos o matriciales, sistemas reservorio o controlados por membranas, de bomba osmótica y de intercambio iónico ²⁰.

I.6.1.1 Sistemas monolíticos o matriciales

En los sistemas matriciales el fármaco se encuentra disperso homogéneamente en una matriz polimérica (Sáez et al., 2004, Varma et al., 2004) ²¹. Pueden dividirse en dos grupos según la naturaleza del polímero que forma parte de la matriz: matrices coloidales hidrofílicas y matrices lipídicas/poliméricas insolubles ²².

I.6.1.1.1 Matrices coloidales hidrofílicas

Son aquellas en las que el fármaco se encuentra disperso en una matriz polimérica soluble. En contacto con el agua los componentes hidrofílicos (derivados de celulosa, alcohol polivinílico, gelatina, goma xantana, carbomero, entre otros) se hinchan y forman una capa hidratada (hidrogel).

A partir de su formación, la capa hidrogel controla la difusión de agua hacia el interior y la difusión del fármaco, que previamente debe mojarse y disolverse, hacia el exterior de la matriz. Paralelamente, la zona más externa de la capa hidrogel puede erosionarse y la velocidad de erosión depende de la naturaleza del polímero (**figura 8**).

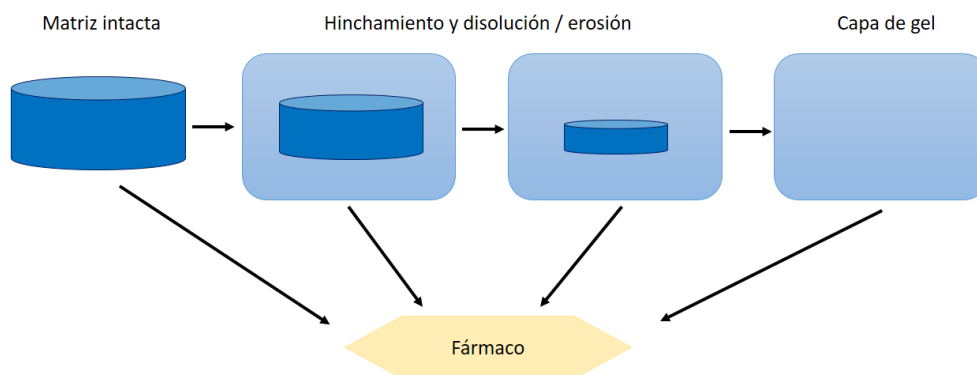


Figura 8. Representación esquemática de una matriz hidrofílica después de determinado tiempo.
(Modificado de R. Sánchez, 2010).

Por lo tanto, la velocidad de liberación del fármaco desde estos sistemas es controlada por los procesos de difusión y erosión y puede modularse, por ejemplo, mediante una selección adecuada de mezcla de polímeros ¹⁸.

I.6.1.1.2 Matrices lipídicas y matrices poliméricas insolubles

Éstas se caracterizan por estar constituidas por un esqueleto poroso inerte e insoluble (grasas, ceras, polímeros insolubles) que lleva incorporado el principio activo y, si es necesario, sustancias solubles en agua que, al disolverse, forman canales dentro de la matriz.

El principio activo se libera por difusión a través de la malla de capilares formados entre las partículas del polímero. La liberación del fármaco puede ser modificada por cambios en la porosidad y tortuosidad de la matriz (**figura 9**). Se puede mencionar como ejemplos de materiales que se utilizan para el desarrollo de estos sistemas acetil metacrilato, cloruro de polivinilo, polietileno, triestearato de glicerilo ²³.

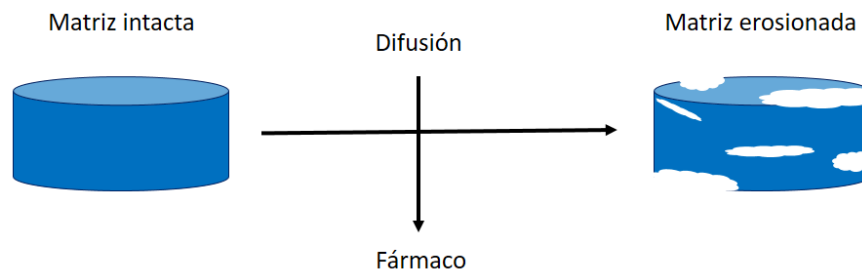


Figura 9. Representación esquemática de una matriz lipofílica. (Modificado de R. Sánchez, 2010).

I.6.1.2 Sistemas de liberación controlada por una membrana

A la parte del sistema que modifica la velocidad de liberación, se le denomina membrana, a través de la cual el fármaco puede difundir. Esta membrana debe volverse permeable para permitir la salida del fármaco, por ejemplo, por hidratación con fluidos del tracto gastrointestinal ^{24, 25}.

El espesor y el tipo de material que constituye la membrana afecta la velocidad a la cual los fluidos biológicos son capaces de penetrar en el sistema. Los materiales que suelen utilizarse para la elaboración de la cubierta son, principalmente, polímeros como la etilcelulosa, metilcelulosa, polivinilacetato, polimetilmetacrilatos, carboximetilcelulosa sódica, polietileno y diferentes tipos de ceras ²⁶.

I.6.1.2.1 Sistemas de bomba osmótica

El sistema de bomba osmótica (**figura 10**) está compuesto por un núcleo rodeado de una membrana semipermeable que tiene un orificio de 0,4 mm de diámetro. Su núcleo consta de dos capas, una conteniendo el fármaco y otra conteniendo el agente polimérico osmótico ²⁷.

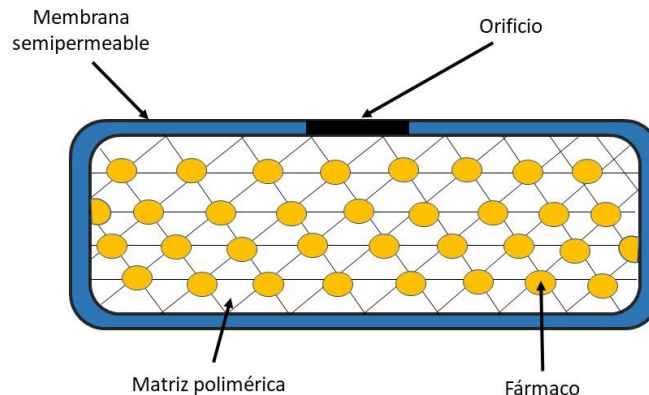


Figura 10. Sistemas osmóticos monolíticos. (Modificado de J. Hernández, 2014).

El sistema opera bajo el principio de presión osmótica. Cuando se suministra, la membrana semipermeable permite la entrada de agua, disolviendo o suspendiendo el fármaco que está en el interior. A medida que ingresa mayor cantidad de agua, la presión en la capa osmótica aumenta y ésta fuerza bombea la solución (suspensión) del principio activo hacia el exterior del sistema a través del orificio. En resumen, se requiere sólo un proceso, el de entrada de agua. La velocidad de liberación del fármaco puede alterarse por cambio del área superficial, ancho o composición de la membrana y/o cambio del diámetro del orificio. Generalmente se utilizan como materiales de membrana: alcohol polivinílico, poliuretano, acetato de celulosa, etilcelulosa, cloruro de polivinilo ²¹.

1.6.1.3 Sistemas de intercambio iónico

Los resinatos obtenidos por intercambio contraíón-fármaco a partir de resinas de intercambio iónico aniónicas o catiónicas pueden ser comprimidos, recubiertos, encapsulados, combinados con otros polímeros o suspendidos en un vehículo acuoso ²⁸. La liberación de los fármacos a partir de estos sistemas requiere la presencia de iones en solución. Por esta razón, no se pueden utilizar para administraciones transdérmica, ótica u oftálmica debido a la escasa cantidad de iones presentes en estas vías de suministro. Las vías subcutánea, intramuscular y oral, en cambio, son las más apropiadas para el suministro de fármacos mediante este tipo de sistemas.

1.6.2 Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son partículas coloidales, las cuales se definen como la distribución de partículas o partículas sólidas. La palabra “nano” deriva de “nanos”, es una palabra griega que significa “extremadamente pequeño” ²⁹.

The Royal Society and Royal Academy of Engineering propuso en 2004 una definición de nanopartícula según la cual su tamaño oscila entre 1 y 100 nm. Sin embargo, no todas las NPs usadas con fines médicos cumplen esta definición ³⁰. En realidad, no hay una razón específica por la que establecer el límite superior en 100 nm. El principio fundamental que diferencia a las NPs del resto no es el tamaño, sino que tienen nuevas características que no presentan los mismos materiales en mayores dimensiones como, por ejemplo, que su superficie en proporción a su masa es mucho mayor que en otras partículas ³¹. Por eso, en nanomedicina los sistemas considerados NPs para la liberación de fármacos oscilan entre 10 y 1000 nm. Al ser de tamaño pequeño, estas nanoestructuras presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas como: un área reactiva aumentada con la capacidad de atravesar barreras celulares y tisulares; son capaces de proteger a los fármacos de la degradación y transportarlos sin modificar sus propiedades intrínsecas; son biodegradables y biocompatibles, no presentan inmunogenicidad, tienen estabilidad metabólica y alta selectividad para interactuar con receptores específicos ^{14, 32}.

I.6.3 Nanopartículas poliméricas

Existen diferentes tipos de nanopartículas dependiendo de su morfología y propiedades físicas o químicas, como lo son: las nanopartículas a base de carbono, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas metálicas, las nanopartículas cerámicas, las nanopartículas semiconductoras y las nanopartículas a base de lípidos, por mencionar algunas. De estas, las nanopartículas poliméricas son las más investigadas debido a sus ventajas sobre las otras pues son de fácil preparación, y en nanomedicina se utilizan por tener buena retención y protección de medicamento ³⁰.

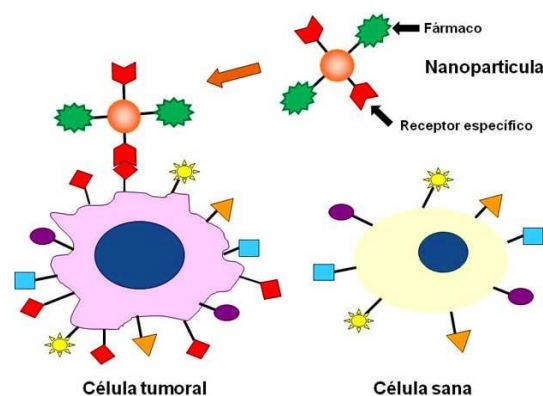


Figura 11. Nanopartículas dirigidas específicamente hacia células tumorales para administración de fármacos. (J. Martínez, 2011).

Las nanopartículas poliméricas (PNP) son partículas coloidales compuestas por varios tipos de polímeros, que se utilizan para la producción de nanocápsulas o nanoesferas. Cuando los polímeros que componen la estructura de las NPs son biodegradables o no tóxicos, surgen muchas oportunidades para emplear estos sistemas, principalmente en aplicaciones biomédicas, como sistemas potenciales para la liberación controlada de fármacos, portadores en terapia génica o entrega guiada de fármacos a tejidos u órganos ³³. Esto es gracias a que permiten lograr un suministro mejorado de fármacos (poco solubles en agua y de tamaño de partícula pequeño) a sitios de difícil acceso, después de un proceso de administración, favoreciendo así una disolución más rápida en el torrente sanguíneo, lo que lleva al suministro dirigido de forma específica a células o tejidos, aumentando la eficacia terapéutica del fármaco y reduciendo los efectos secundarios, así como el uso de diversas vías de administración (parenteral, intraocular, oral, nasal, entre otras) ^{31, 14}.

Las PNP son un candidato ideal para la administración tópica, y con frecuencia se utilizan polímeros naturales como el quitosano, la gelatina, el alginato y la albúmina. Se han utilizado con éxito para administrar tópicamente los siguientes compuestos: aciclovir (antiviral), retinol (vitamina A), quercetina (antioxidante), oligonucleótidos antisentido y ADN plasmídico. Las nanopartículas poliméricas también se pueden fabricar a partir de polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos pueden ser de dos tipos: biodegradables y no biodegradables. El ácido poli (d, l-láctico-co-glicólico) (PLGA) (**figura 12**) es un polímero biodegradable, así como también poliestésteres como la policaprolactona (PCL) ³⁴.

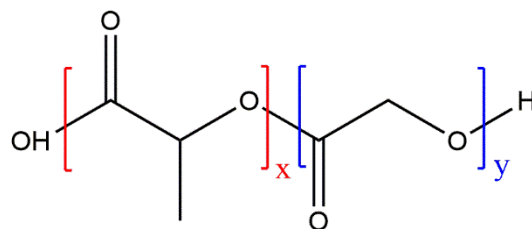


Figura 12. Estructura química del ácido poli(d, l-láctico-co-glicólico). (Diseño propio).

I.6.4 Nanogeles poliméricos

Los nanogeles de polímero (NG) son estructuras de red tridimensionales reticuladas e hinchables en agua con un tamaño que suele oscilar entre 1 y 1000 nm. En general, los NG se fabrican mediante la polimerización de monómeros funcionales seguida de reticulación física o química en entornos coloidales heterogéneos como microemulsiones inversas de agua en aceite ³⁵.

Especialmente, los NG biocompatibles e "inteligentes" diseñados a partir de polímeros que responden a estímulos son atractivos debido a su capacidad para responder a los desencadenantes biológicos endógenos del pH, la bio-reducción, el reconocimiento de biomoléculas, así como a los desencadenantes de estímulos exógenos como la temperatura y la luz. Al exponerse a estas señales físicas o bioquímicas, los NG sensibles se pueden utilizar para aplicaciones de administración terapéutica y diagnósticas (**figura 13**). En la última década, se han logrado avances sustanciales en el desarrollo de NG "inteligentes" para aplicaciones teranósticas y de diagnóstico, tales como administración intracelular de fármacos y ácidos nucleicos, terapia fotodinámica / fototermal, bioimagen y detección ³⁵.

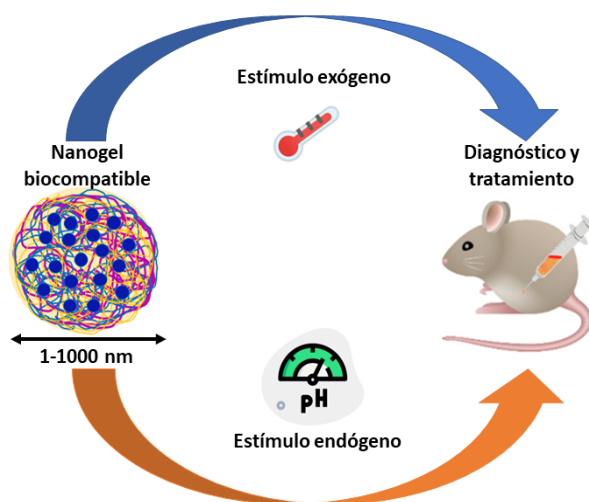


Figura 13. Nanogeles biocompatibles sensibles a estímulos. (Diseño propio).

Esta nanoestructura ofrece muchas características avanzadas como sistema de administración de fármacos (SAF), incluyendo simplicidad de formulación, estabilidad excepcional de la dispersión y almacenamiento en forma liofilizada para su posterior dispersión en medios acuosos, entre otras. Además, tienen propiedades únicas como su alto contenido de agua, estructura tridimensional, biocompatibilidad y, la más importante, su grado de hinchamiento que permite la liberación de fármacos mediante las condiciones ambientales externas al nanogel como, por ejemplo: la temperatura y el pH ³⁶.

I.6.5 Nanopartículas como terapia contra bacterias

Durante las últimas décadas, ha habido un uso indiscriminado de antimicrobianos, lo que ha provocado alta resistencia antibiótica por parte de muchas especies bacterianas, lo que implica un

gran riesgo de salud pública. Se estima que entre 33,000 y 35,000 personas mueren anualmente en Europa y Estados Unidos, respectivamente, como resultado directo de la resistencia a los antimicrobianos ³⁷.

Debido a lo antes mencionado, se ha buscado mejorar las propiedades biofarmacéuticas de los compuestos existentes y a su vez, encontrar agentes antibacterianos nuevos y más eficaces. Los recientes avances en nanotecnología, en particular el diseño de nuevas nanopartículas como sistemas de administración de fármacos controlados con un diámetro de 1 a 1000 nm y con núcleo polimérico, pueden ofrecer mejoras notables en las propiedades biofarmacéuticas de los agentes antibacterianos. Particularmente, pueden mejorar la solubilidad del fármaco, la evasión del sistema inmune, la orientación de moléculas antibacterianas a los órganos y tejidos deseados y aumentar el tiempo de retención *in situ*, así como la administración simultánea de múltiples fármacos. Estas ventajas únicas permiten que estos sistemas mejoren el índice terapéutico de la carga útil del fármaco, que realicen una terapia enfocada eficiente en el sitio de la infección, lo cual aumenta la penetración de moléculas cargadas a través de la pared celular de las bacterias, abriendo así una ventana contra la resistencia bacteriana ³⁷.

I.6.5.1. Estrategias comúnmente utilizadas para mejorar la eficacia antibacteriana, utilizando NPs.

I.6.5.1.1 Localización del antibiótico en la célula patógena. Esta es la estrategia más importante, pues esta permite reducir las dosis terapéuticas del fármaco, manteniendo su eficacia y reduciendo efectos adversos ³⁸.

I.6.5.1.2 Modulación de la interacción fármaco-patógeno. Un ejemplo de esta estrategia sería el uso de liposomas, los cuales tienen la capacidad de fusionarse directamente con las membranas bacterianas. Esto conduce a una liberación repentina de altas dosis de antibióticos cargados en las bacterias, abrumando las bombas de eflujo y superando este mecanismo de resistencia bacteriana ³⁸.

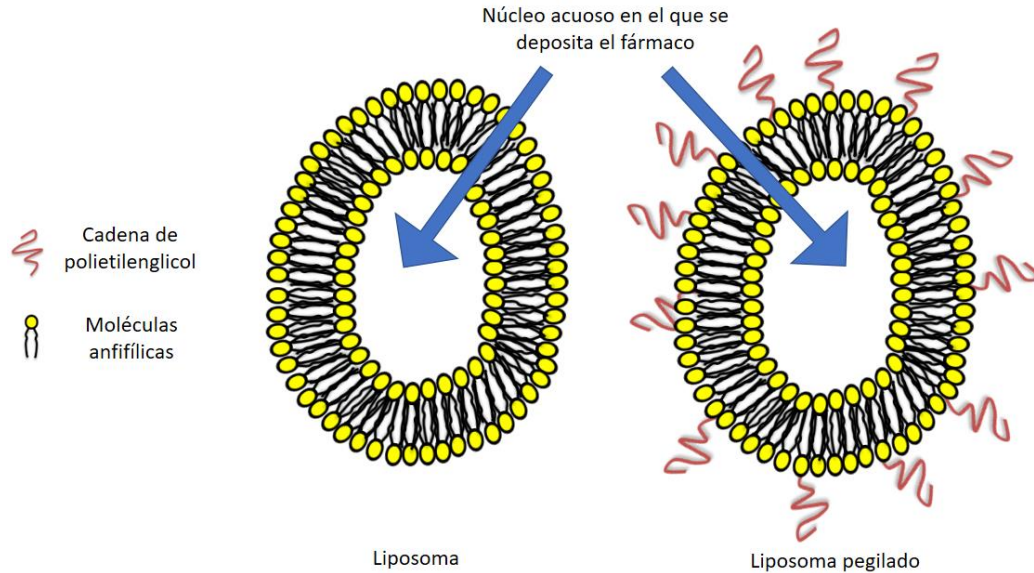


Figura 14. Liposomas como estructuras para cargado y liberación de fármacos. (Modificado de L. González, 2017).

En comparación con los antibióticos tradicionales, es menos probable que las nanopartículas desarrollen resistencia a los medicamentos, ya que no tienen un efecto bactericida, sino que promueven la alteración física y estructural inespecífica de las membranas bacterianas, que finalmente conducen a una mayor permeación y muerte celular bacteriana ³⁷.

I.6.6 Polímeros como agentes antimicrobianos

En los últimos años, debido al aumento de resistencia bacteriana, se ha implementado el uso de polímeros antimicrobianos (AMP), pues se presentan como una alternativa prometedora en este campo. Estos materiales han sido diseñados para imitar la estructura química de los péptidos antimicrobianos, que son parte del sistema inmunológico humano y son responsables de la protección del hospedero contra agentes patógenos ³⁹. Una de las propiedades más importantes que presentan los AMP, son su hidrofobicidad y carga catiónica. Estas características conducen a una acumulación de estos polímeros en las membranas celulares, creando poros en la estructura bacteriana y finalmente logra matarlas ³⁷.

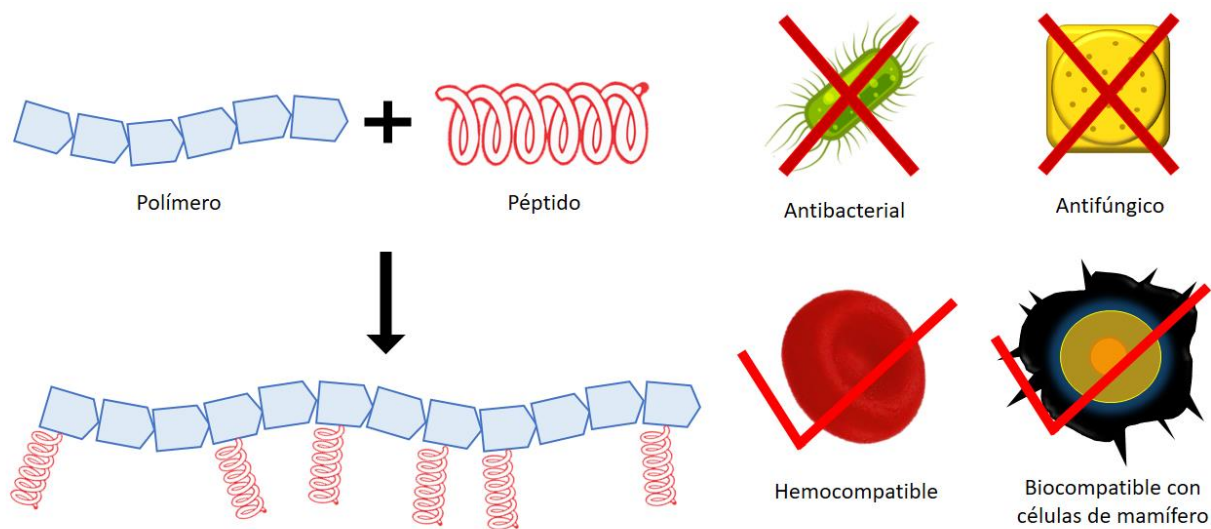


Figura 15. Polímeros antimicrobianos (AMP). (Modificado de F. Hatton, 2017).

También se ha descrito que la composición y distribución de los monómeros en la cadena del polímero poseen un impacto significativo en la actividad antibacteriana. Algunos estudios han señalado que la incorporación de grupos hidrófobos y amina en las posiciones terminales de la cadena del polímero permite variar su hidrofobicidad y llevar a ajustar el grado de disrupción de la membrana bacteriana, que a su vez gobierna la actividad antimicrobiana ⁴⁰. Asimismo, la arquitectura del polímero también influye en su efecto bactericida. Se ha descrito que las cadenas poliméricas más largas presentan mayor actividad bacteriostática frente a bacterias Gram negativas, mientras que las cadenas poliméricas más cortas tienen menos hemocompatibilidad. Además, las estructuras poliméricas hiperramificadas poseen una actividad antimicrobiana similar en comparación con los copolímeros aleatorios lineales cortos sin hemaglutinación ³⁷.

Los polímeros sintéticos complejos tienen un mayor potencial para la fabricación a gran escala mediante procesos automatizados y son menos susceptibles a la proteólisis. Los avances en las técnicas de polimerización han permitido la producción de estructuras poliméricas más complejas, algunas de las cuales se han investigado como polímeros sintéticos antimicrobianos ⁴⁰.

I.6.7 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas

I.6.7.1 Evaporación de solvente.

Este fue el primer método desarrollado para preparar NP's poliméricas a partir de un polímero preformado. En este método, inicialmente se requiere la preparación de una emulsión de aceite en

agua (o/w), lo que lleva a la producción de nanoesfereas. De manera general, en este método se prepara una fase orgánica, que consiste en un disolvente orgánico polar en el que se disuelve el polímero, y el fármaco se incorpora mediante disolución o dispersión. También se ha preparado con frecuencia una fase acuosa que contiene un tensoactivo, como el acetato de polivinilo (PVA). La solución orgánica se emulsiona en la fase acuosa con un tensoactivo y luego se procesa usando homogeneización de alta velocidad o ultrasonido, produciendo una dispersión de nanogotas. Se forma una suspensión de NPs mediante la evaporación del disolvente polimérico, que se deja difundir a través de la fase continua de la emulsión. El disolvente se evapora mediante agitación magnética continua a temperatura ambiente o en un proceso lento de presión reducida. Una vez evaporado el disolvente, las NPs poliméricas solidificadas pueden lavarse y recuperarse mediante centrifugación, seguido de liofilización para su almacenamiento a largo plazo. Este método permite obtener nanoesferas ⁴¹.

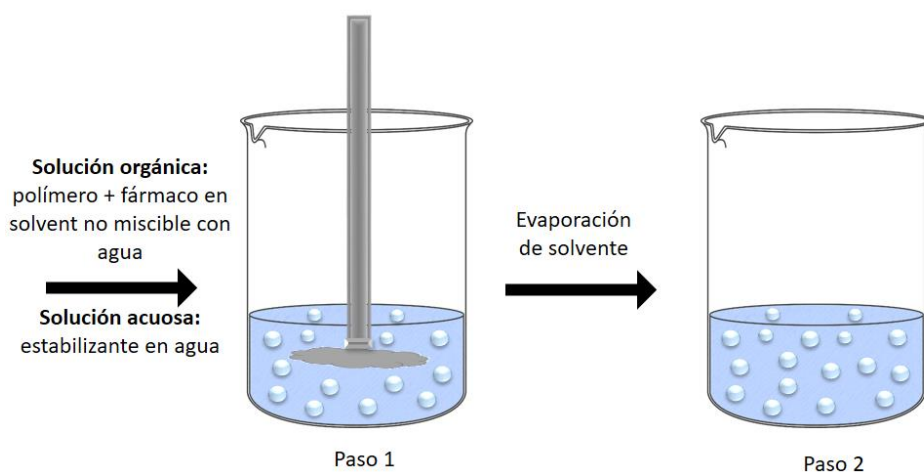


Figura 16. Método de evaporación de solvente para formación de nanoesferas. (Modificado de P. Pourhakkak, 2021).

I.6.7.2 Emulsificación / difusión de disolventes.

Este método consiste en la formación de una emulsión o/w entre un polímero y un fármaco que contiene un disolvente parcialmente miscible en agua y una solución acuosa con un tensioactivo. La fase interna de esta emulsión está constituida por un disolvente orgánico parcialmente hidromiscible, como alcohol bencílico o acetato de etilo, que se satura previamente con agua para asegurar un equilibrio termodinámico inicial de ambas fases a temperatura ambiente. La posterior dilución con una gran cantidad de agua induce la difusión del solvente desde las gotas dispersas

hacia la fase externa, dando como resultado la formación de partículas coloidales. Generalmente, este es el método utilizado para producir nanoesferas, pero también se pueden obtener nanocápsulas si se agrega una pequeña cantidad de aceite (como triglicéridos: C6, C8, C10, C12) a la fase orgánica. Finalmente, dependiendo del punto de ebullición del solvente orgánico, esta última etapa puede eliminarse por evaporación o por filtración. Al final, es posible obtener NPs con dimensiones que van desde 80 a 900 nm ⁴¹.

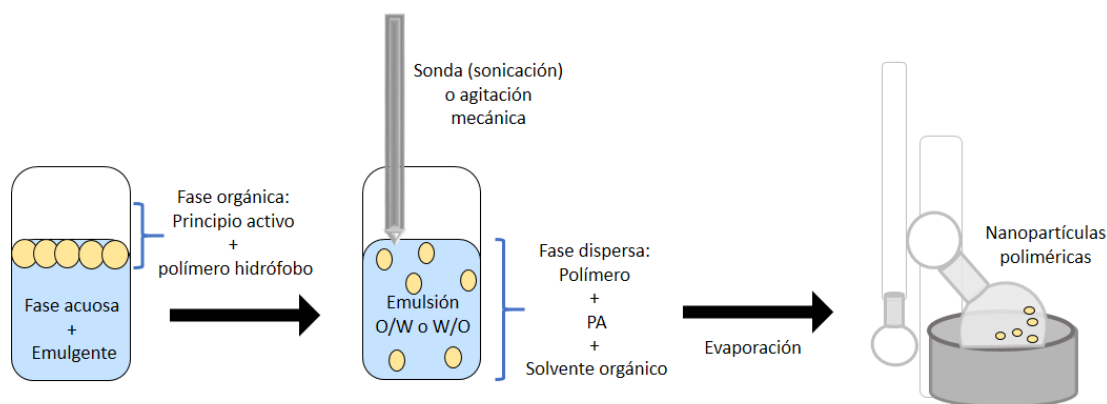


Figura 17. Método de emulsión / evaporación. (Modificado de M. Urrejola et. al, 2018).

I.6.7.3 Emulsificación / Cristalización por precipitación (Salting-Out).

Este método se basa en la separación de un disolvente hidromiscible de una solución acuosa, mediante un efecto de “salting-Out” que puede dar lugar a la formación de nanoesferas. La composición de la emulsión o/w, se formula a partir de un polímero disolvente miscible en agua, como acetona o etanol, y la fase acuosa contiene un gel, el agente precipitante y un estabilizador coloidal.

Ejemplos de agentes de precipitación adecuados incluyen electrolitos, como cloruro de magnesio (MgCl_2), cloruro de calcio (CaCl_2) o acetato de magnesio [$\text{Mg} (\text{CH}_3\text{COO})_2$], así como no electrolitos, por ejemplo, la sacarosa. La miscibilidad de la acetona y el agua se reduce saturando la fase acuosa, lo que permite la formación de una emulsión o/w a partir de las otras fases miscibles. La emulsión o/w se prepara, bajo intensa agitación, a temperatura ambiente. Luego, la emulsión se diluye utilizando un volumen adecuado de agua desionizada o de una solución acuosa para permitir la difusión del disolvente orgánico a la fase externa, la precipitación del polímero y, en consecuencia, la formación de nanoesferas. El disolvente restante y el agente precipitante se eliminan mediante filtración de flujo cruzado. Las dimensiones de las nanoesferas obtenidas por

este método varían entre 170 y 900 nm. El tamaño medio se puede ajustar a valores entre 200 y 500 nm, variando la concentración de polímero de la fase interna / volumen de la fase externa ⁴¹.

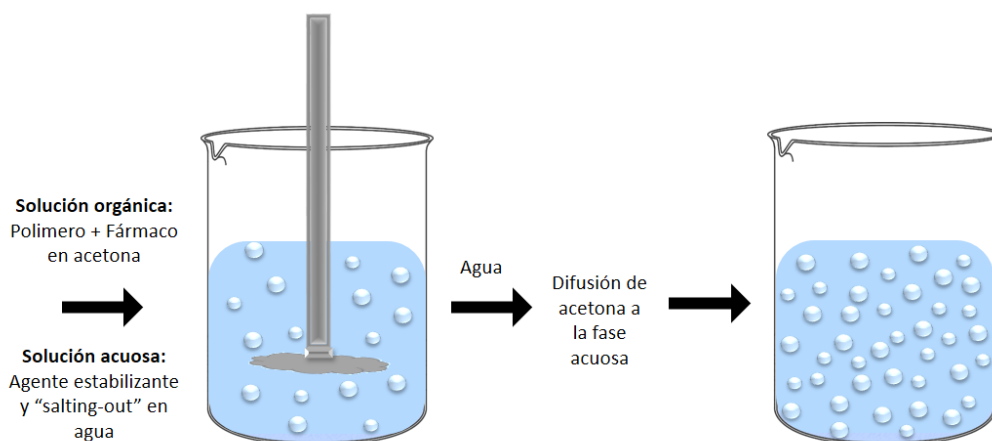


Figura 18. Emulsión por precipitación. (Modificado de P. Pourhakkak, 2021).

I.6.7.4 Nanoprecipitación.

Método también conocido como método de desplazamiento de solvente, requiere dos solventes miscibles. La fase interna consta de un polímero disuelto en un disolvente orgánico miscible, como acetona o acetonitrilo. Debido a su inmiscibilidad en agua, se pueden eliminar fácilmente por evaporación. El polímero se disuelve en un disolvente miscible en agua de polaridad intermedia y esta solución se añade paso a paso a una solución acuosa con agitación (gota a gota) o mediante una velocidad de adición controlada. Debido a la rápida difusión espontánea de la solución de polímero en la fase acuosa, las nanopartículas se forman instantáneamente en un intento de evitar las moléculas de agua. A medida que el disolvente se difunde desde las nanogotas, el polímero precipita en forma de nanocápsulas o nanoesferas. Por lo general, se pueden incluir tensioactivos en el proceso para garantizar la estabilidad de la suspensión coloidal, aunque no se requiere su presencia para asegurar la formación de nanopartículas. La nanoprecipitación, es un método de uso frecuente para la preparación de NPs poliméricas con dimensiones de alrededor de 170 nm, también permite la adquisición de nanoesferas o nanocápsulas ⁴¹.

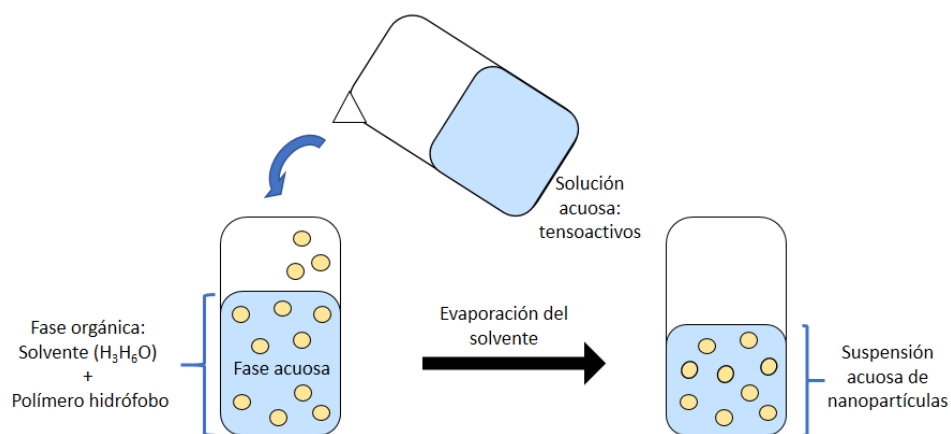


Figura 19. Nanoprecipitación. (Modificado de M. Urrejola et. al, 2018).

I.6.8 Técnicas de caracterización actualmente utilizadas en sistemas de liberación de fármacos

I.6.8.1 Dispersión de luz dinámica

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés de “Dynamic light Scattering”), es una técnica fisicoquímica empleada para la determinación de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas y polímeros. Esta técnica es una herramienta útil, también, para la observación de las interacciones de los polímeros a través del incremento del tamaño de los polímeros formados. Esta técnica, a diferencia de la dispersión de luz estática, no tiene en cuenta la dependencia del ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo ⁴².

Bajo equilibrio termodinámico macroscópico, existen fluctuaciones estadísticas de temperatura y concentración en la mayor parte de la mezcla binaria que pueden causar una modulación de la luz inducida. La hipótesis de Onsager plantea que la relajación de los dos modos hidrodinámicos sigue las mismas leyes que son válidas para el sistema macroscópico. En consecuencia, las disminuciones de las fluctuaciones de temperatura y concentración se rigen por la difusividad térmica y la difusividad mutua, respectivamente. La técnica de DLS sondea la luz dispersa en el dominio del tiempo y, por lo general, analiza la función de autocorrelación (ACF) con la espectroscopia de correlación de fotones. Bajo un esquema heterodino donde la intensidad de la luz de referencia es mucho más fuerte que la de la luz dispersa ⁴³.

I.6.8.1.1 Potencial Z.

Este refleja la carga superficial de las partículas, la cual está influenciada por cambios en la interfaz con el medio dispersante, debido a la disociación de grupos funcionales en la superficie de la partícula o debido a la adsorción de especies iónicas presentes en el acuoso medio de dispersión, así como el efecto de solvatación. Este parámetro se determina mediante técnicas Doppler para medir la velocidad de las partículas en función del voltaje, por lo que el potencial zeta se calcula a partir de la movilidad electroforética de las partículas en un disolvente respectivo. Un valor de potencial zeta relativamente alto, considerado como $|\pm 30 \text{ mV}|$, es importante para una buena estabilidad fisicoquímica de la suspensión coloidal, ya que grandes fuerzas repulsivas tienden a prevenir la agregación debido a colisiones ocasionales con nanopartículas adyacentes. La determinación del potencial zeta es útil para dilucidar el mecanismo de asociación de fármacos con nanopartículas ⁴¹.

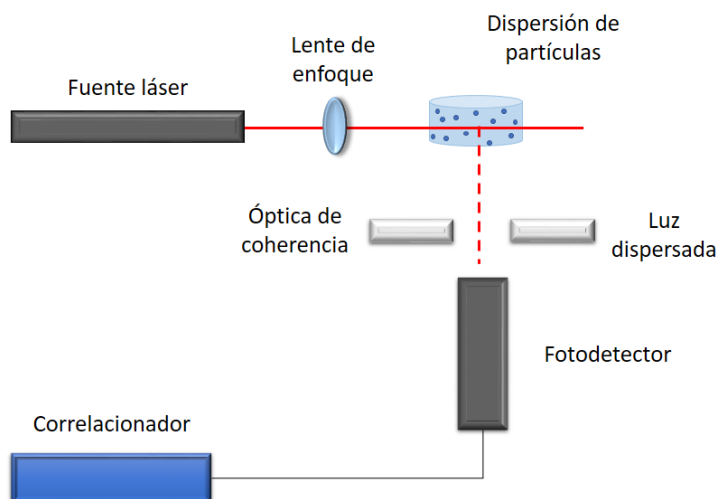


Figura 20. Representación esquemática de la técnica de DLS. (Modificado de M. Fanani, 2016).

I.6.8.1.2 Índice de polidispersidad (PDI).

Este parámetro es obtenido de manera simultánea con el tamaño de partículas. Este índice nos da información acerca de la muestra. Los valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños

I.6.8.2 Espectrofotometría infrarrojo por transformada de Fourier

El principio de la espectroscopía de infrarrojo es la medición de la cantidad de radiación IR, que es absorbida o emitida por una muestra en función de la longitud de onda. La medición de IR se puede realizar en la modalidad de transmisión o reflectancia, siendo la primera la más conocida.

Esta técnica tiene un alto potencial para ayudar a identificar estructuras moleculares. El espectro IR de una molécula poliatómica se basa en vibraciones moleculares, cada una de las cuales depende específicamente de las masas atómicas, la fuerza de los enlaces y las interacciones intra o intermoleculares. Como consecuencia, todo el espectro de IR de un compuesto orgánico proporciona una huella digital única, que se puede distinguir fácilmente del patrón de absorción de IR de otros compuestos, incluidos los isómeros. Es decir, cuando se cuenta con espectros de referencia, es posible identificar la mayoría de los compuestos del espectro IR dado.

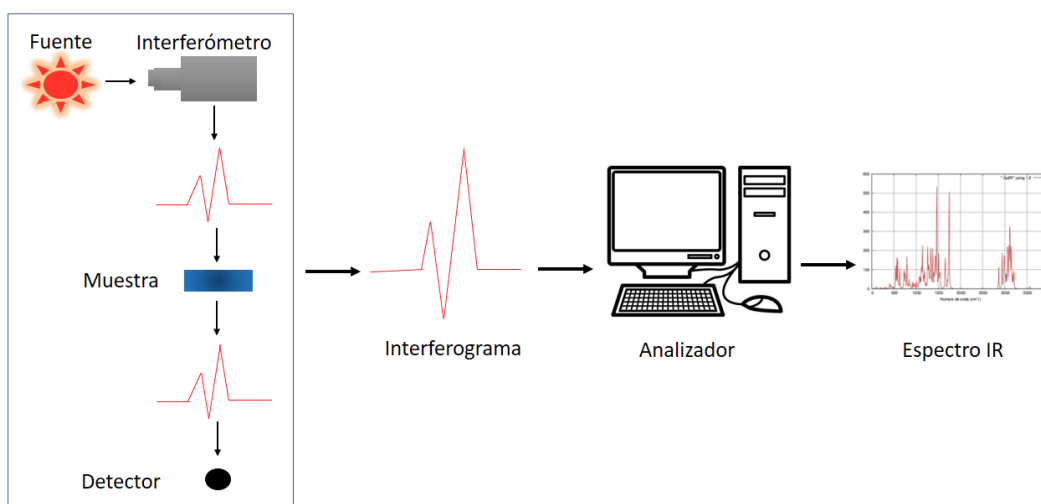


Figura 21. Representación esquemática de la técnica de espectrofotometría infrarrojo.
(Modificado de J. Velandia, 2017).

La técnica espectrofotometría infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), es muy útil para lograr identificar los principales componentes químicos en materiales medicinales y sus diferentes extractos, así como también para comparar los diferentes componentes entre muestras similares. Es por ello, que este método analítico se considera como rápido, eficaz, visual y preciso para la investigación farmacéutica ⁴⁵.

1.6.8.3 Resonancia magnética nuclear de protón

La resonancia magnética nuclear (RMN- H^1) constituye una técnica con un amplio y reconocido espectro de aplicaciones en el campo del análisis estructural. Tuvo sus inicios a principios de la década de 1950, cuando se comercializaron los primeros espectrómetros para la obtención de espectros de protones, tras el descubrimiento en 1945 de la resonancia. Este fenómeno plantea que los núclidos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en el orden de las radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno químico de los núclidos, el espectro de señales de absorción de los mismos revela valiosa información sobre la estructura de la molécula ⁴⁶.

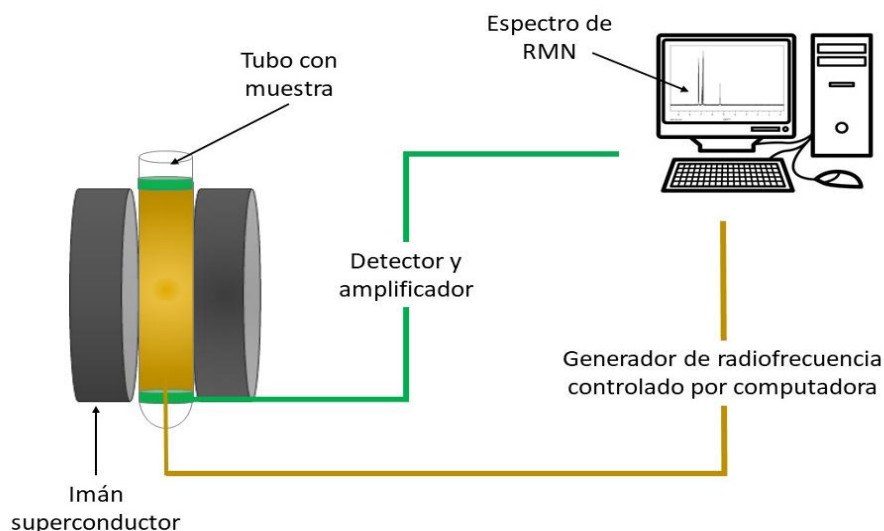


Figura 22. Representación esquemática de la técnica de resonancia magnética nuclear.
(Modificado de J. Castell, 2003).

1.6.8.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Básicamente, en este método participan la fase móvil y la fase estacionaria (inmiscibles entre sí). Así como la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a

analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Fallon, Booth y Bell, 1987). Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes ⁴⁷.

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución opera generalmente con cinco instrumentos: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador (**figura 23**).

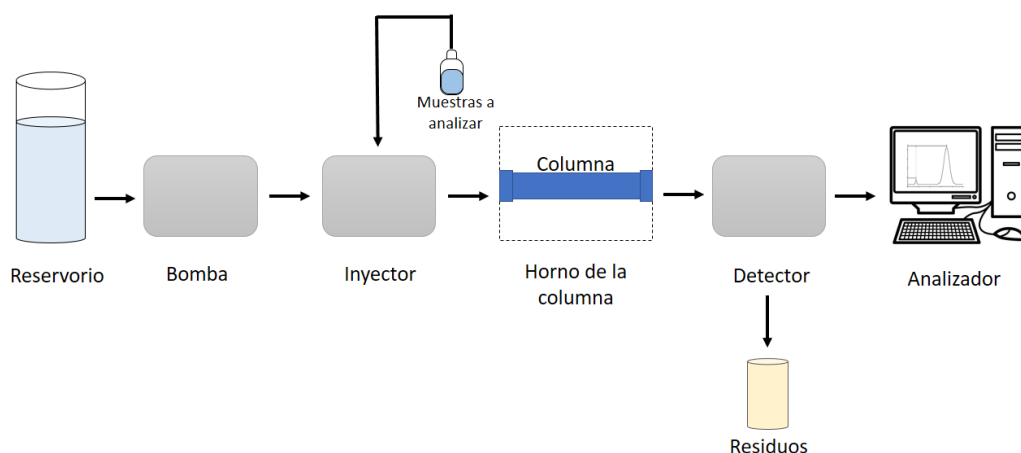


Figura 23. Diagrama básico de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. (Modificado de D. Suarez, 2018).

I.6.8.5 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro

obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

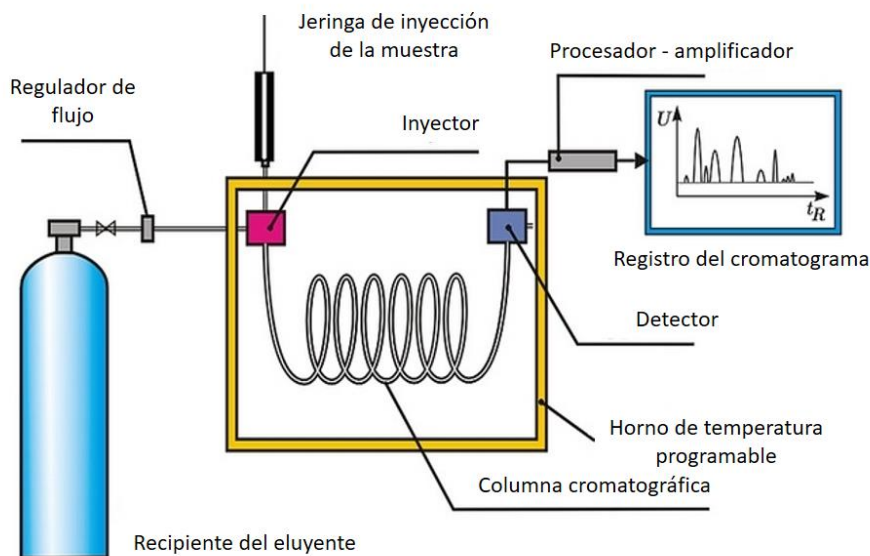


Figura 24. Representación esquemática de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. (M. Osorio, 2018).

Una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado ⁴⁸.

CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL

II.1 Síntesis de monómero de ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico (MAOB)

El método de síntesis de monómero se realizó por medio del previamente reportado por Licea-Claveríe, Rogel-Hernández y López en 2003. La reacción de síntesis se muestra en la **figura 25**.

En un matraz bola de 100 mL, se hicieron reaccionar 13.8 g de ácido salicílico y 0.9 g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), en 16.8 mL de trietilamina y 40 mL de diclorometano. La solución obtenida se colocó en baño de hielo a 0 °C y se mantuvo en agitación hasta disuelto. Posteriormente, se colocó gota a gota 15 g de anhídrido metacrílico y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, por aproximadamente 3 horas, mediante uso de una bomba de adición. La solución previa, se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Seguido a esto, la solución se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL y se acidificó con ácido clorhídrico, hasta un pH= 3.0, manteniendo la mezcla a 0 °C y con agitación constante. El precipitado obtenido se extrajo por medio de éter etílico y un embudo de separación de 250 mL. La fase orgánica se recuperó y se lavó con 40 mL de una solución de ácido clorhídrico 0.1 M y 40 mL de agua destilada. Una vez lavada, la fase orgánica se secó utilizando sulfato de magnesio anhidro, se filtró a vacío y se colocó en un cristizador de vidrio hasta obtener un sólido seco. Este sólido, a su vez, se lavó con 30 mL de agua destilada a temperatura ambiente y otros 30 mL a 40 °C, repitiendo tres veces de manera intercalada. Posteriormente, el producto se purificó por medio de recrystalización utilizando hexano previamente calentado a 65 °C y, finalmente, se dejó secar a 50 °C en una estufa con vacío.

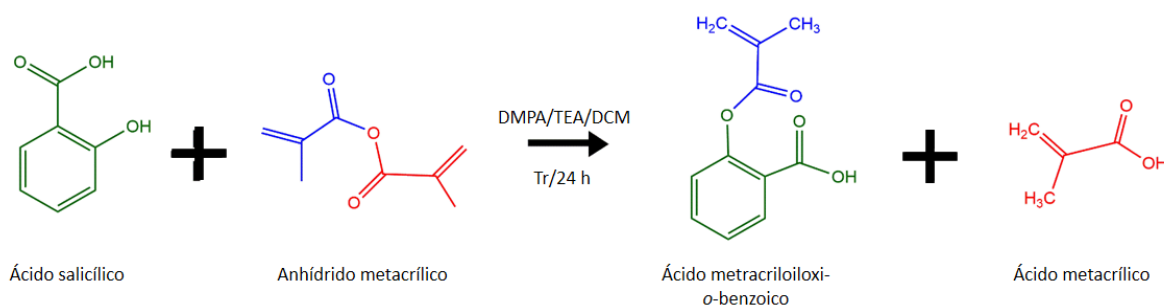


Figura 25. Ruta de síntesis de ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico. (Diseño propio).

II.2 Caracterización de monómero de MAOB

II.2.1 Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Se realizó la evaluación de la pureza del producto por medio de una cromatografía de capa fina, utilizando una mezcla de hexano y acetato de etilo en una proporción 32:68.

II.2.1.1 Preparación de soluciones

II.2.1.1.1 Solución A (solución de referencia): se disolvieron 30 mg de ácido salicílico en 1 mL de metanol.

II.2.1.1.2 Solución B (solución muestra): se disolvieron 30 mg de monómero de MAOB previamente obtenido y se disolvieron en 1 mL de metanol.

II.2.1.2 Placa cromatográfica

II.2.1.2.1 En una placa cromatográfica de 2.5 cm de ancho por 5 cm de largo, se trazó una línea inicial donde se colocaron dos puntos separados, el punto A y el punto B, al primero se le colocaron 10 μ L de la solución A, y al segundo se le colocaron 10 μ L de la solución B.

II.2.1.2.2 En una cámara cromatográfica se colocaron 5 mL de la mezcla de hexano y acetato de etilo (32:67). Posteriormente, se colocó la placa cromatográfica dentro de la cámara y se dejó correr hasta aproximadamente el 85% de la placa. Finalmente, se dejó secar, se observó por medio de luz ultravioleta y se midió el recorrido de cada una de las soluciones (**figura 26**).

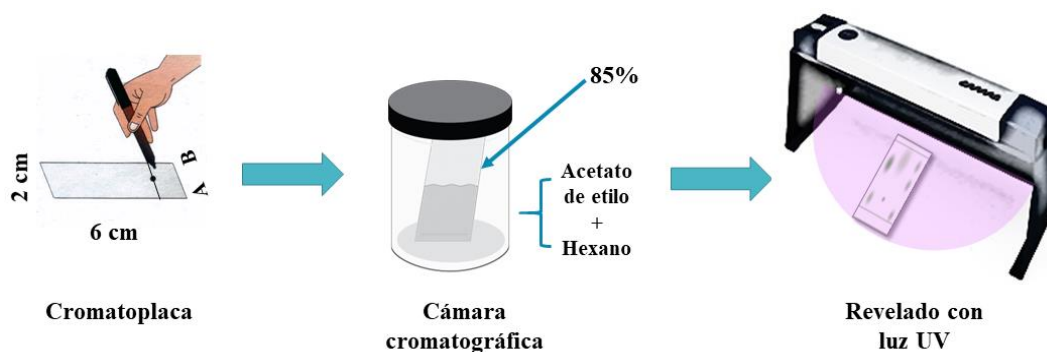


Figura 26. Cromatografía de capa fina. (Diseño propio).

II.2.2 Espectrofotometría de Infrarrojo con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

El análisis de espectroscopia de infrarrojo se realizó con el equipo Fourier Transform Infrared Spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR), marca Thermo, modelo Nicolet IS5. Se limpió con metanol la superficie del diamante y se dejó secar. Posteriormente, se colocó una pequeña cantidad del producto en el diamante, se bajó la punta y, con ayuda del software, se leyó la muestra y se obtuvo el espectro IR.

II.2.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN- H^1)

Se pesaron 25 mg de monómero de MAOB y se transfirieron a un tubo para RMN, posteriormente se agregaron 0.6 mL de cloroformo deuterado ($CDCl_3$) por medio de una pipeta de vidrio, para evitar algún tipo de contaminación. Se tapó el tubo, se agitó ligeramente hasta disuelto y se leyó en el equipo Spinsolve high de 60 MHz para obtener el espectro de RMN y así determinar los diferentes tipos de protones que existían en la molécula.

II.3 Generación de sal de MAOB

Para la generación de la sal del monómero de MAOB, se realizaron dos soluciones. La primera consistió en pesar 0.9 g de monómero de MAOB, transferirlo a un vaso de precipitado que contenía 10 mL de metanol. Para la segunda solución se pesaron 0.2 g de hidróxido de potasio (KOH), esto se transfirió a un vaso de precipitado que contenía 10 mL de metanol. Cada una de las soluciones se colocaron en un baño de hielo a 0 °C y se mantuvieron en agitación constante hasta disolver los reactivos sólidos. Posteriormente, se colocó gota a gota la solución de KOH y metanol al vaso de precipitado que contenía el monómero. A la mezcla obtenida se le eliminó el solvente (metanol) por medio del rotavaporador BUCHI R-100. El producto de reacción obtenido fue secado en una estufa de vacío a 50 °C durante 24 horas, obteniendo finalmente la sal del monómero.

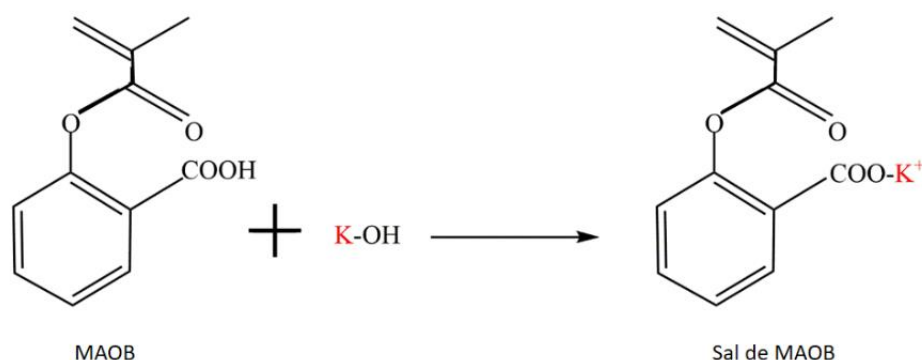


Figura 27. Ruta de síntesis de sal de MAOB. (Diseño propio).

II.4 Caracterización de sal de MAOB

La sal obtenida, al igual que el monómero, se caracterizó por medio del equipo Fourier Transform Infrared spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR), como se menciona en el punto II.2.2. para obtener el espectro IR.

II.5 Síntesis de nanopartículas poliméricas de MAOB

Se sintetizaron nanopartículas poliméricas de MAOB para su incorporación en suturas y su posterior estudio. Se procedió de la siguiente manera:

II.5.1 Reacción de polimerización. En un matraz bola de 50 mL, se agregaron 12.5 mL de agua milliQ y 0.25 g de sal de MAOB, esto se colocó en agitación y se adicionaron 12.5 mL más de agua milliQ. A la solución obtenida se le midió el tamaño de partícula por medio de dispersión de luz dinámica (DLS). Posteriormente, se colocaron 10 μ L del entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) 5 % molar. La solución se colocó en atmósfera inerte por medio de burbujeo de gas nitrógeno, por 30 minutos, colocando un tapón antivuelco con septum al matraz para evitar entrada de oxígeno. Después de los 30 minutos, el matraz se colocó en baño de aceite a 85 °C. Se adicionaron 110 μ L de persulfato de amonio (APS), 2 % w/w, el cual actúa como iniciador de la reacción de polimerización, y nuevamente se dejó en agitación por 40 minutos a 85 °C. La solución se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL que se tapó con papel parafilm y se colocó en un baño de hielo a 0 °C. A la solución obtenida se le midió el tamaño de partícula y se procedió a liofilizar.

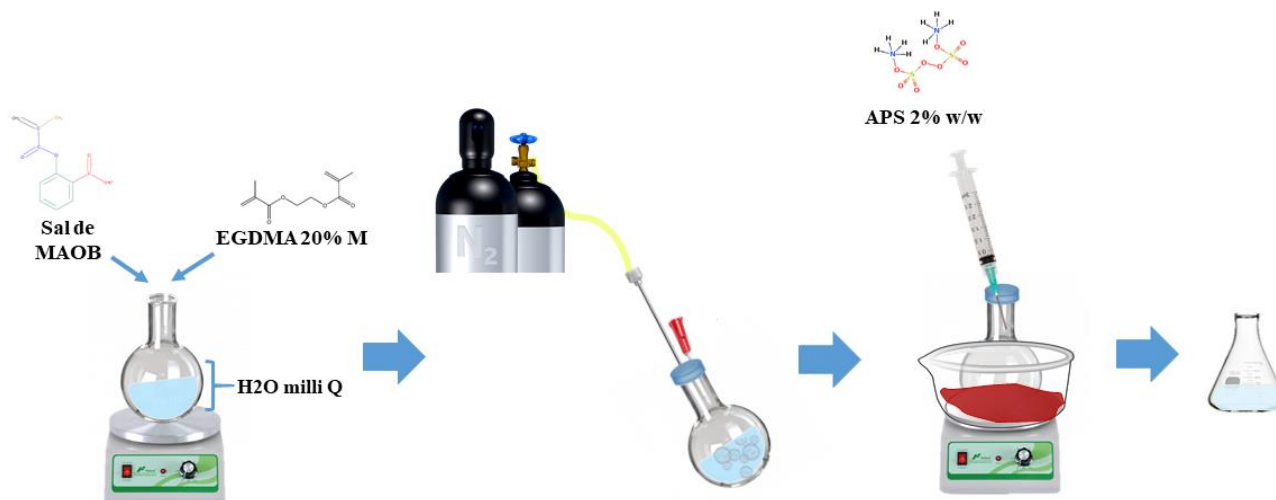


Figura 28. Reacción de polimerización. (Diseño propio).

II.5.2 Liofilizado y obtención de nanopartículas poliméricas. La solución obtenida a partir de la reacción de polimerización en el punto **II.5.1** fue colocada en viales de vidrio con tapa, añadiendo a estos 10 mL de solución en cada uno. Dichos viales fueron envueltos con papel Parafilm y pesados previamente. Posteriormente, se congelaron por medio del ultracongelador BINDER Serie UF-V. Una vez congeladas, las muestras fueron liofilizadas en el equipo Labconco (freezone 2.5 L -50 °C Benchtop freeze Dryers, 230V model), este se colocó a una temperatura de -50 °C por 3 días. El producto obtenido fue finalmente pesado.

II.6 Caracterización de nanopartículas de MAOB

II.6.1 Dispersión de Luz Dinámica

II.6.1 Lectura de solución previa a la reacción de polimerización. Se tomó 1 mL de la solución obtenida previo a la polimerización, obtenida en el punto **II.5.1** y se colocó en una celda para ser leída en el equipo.

II.6.2 Lectura de solución posterior a la reacción de polimerización. Se tomó 1 mL de la solución obtenida de la reacción de polimerización para la síntesis de nanopartículas (**II.5.1**) y se colocó en una celda para ser leída en el equipo.

II.6.3 Lectura de solución de liofilizado. Se pesó 1 mg del liofilizado obtenido en el punto **II.5.2** y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL, posteriormente se le añadió 1 mL de agua grado milliQ.

Esta solución se colocó en agitación constante durante 24 horas, transcurrido este tiempo, se tomó el 1 mL de solución y se colocó en una celda para ser leída en el equipo.

II.6.2 Espectrofotometría Infrarrojo con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

El análisis de espectroscopia de infrarrojo se realizó con el equipo Fourier Transform Infrared Spectrophotometer de iDS, con reflectancia total atenuada (ATR). Se limpió con metanol la superficie del diamante y se dejó secar. Posteriormente, se colocó una pequeña cantidad del liofilizado obtenido en el punto **II.5.2**, sobre el diamante, se bajó la punta y, con ayuda del software, se leyó la muestra y se obtuvo el espectro IR.



Figura 29. Lectura de poli(MAOB) en espectrofotómetro infrarrojo. (Modificado de Thermo Scientific).

II.7 Síntesis de nanopartículas de MAOB cargadas con clorhexidina

Para realizar el cargado e incorporación de clorhexidina en las nanopartículas poliméricas, se procedió a realizarlo de la siguiente manera:

II.7.1 Preparación de soluciones

II.7.1.1 Solución con clorhexidina. Se pesaron aproximadamente 7.5 mg de clorhexidina diacetato y se agregaron en un vaso de precipitado que contenía 10 mL de agua grado milliQ, la solución obtenida se agitó durante 10 minutos. Cumplidos los 10 minutos, se agregaron 10 mL más de agua y se volvió a agitar por otros 10 minutos.

II.7.1.2 Solución con sal de MAOB. Se pesaron aproximadamente 42.5 mg de sal de MAOB y se agregaron a un vaso de precipitado que contenía 10 mL de agua grado milliQ, la solución obtenida se colocó en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 10 mL más de agua y se volvió a agitar por otros 10 minutos. Esta solución se filtro a vacío, utilizando una membrana con tamaño de poro de 0.45 μm , esto con el fin de obtener una solución transparente.

II.7.1.3 Solución con clorhexidina y sal de MAOB. La solución con clorhexidina (**II.7.1.1**) fue mezclada con la solución con sal de MAOB (**II.7.1.2**), y se sometió a agitación constante durante 10 minutos y posteriormente se agregaron 10 mL de agua milliQ, obteniendo un total de 50 mL de solución. Finalmente, se tomó 1 mL de la solución resultante para leer el tamaño de partícula por medio de la técnica de DLS como se indica en el punto **II.8.1** Al término de la lectura se regresó el volumen tomado a la solución.

II.7.2 Síntesis de nanopartículas poliméricas cargadas con clorhexidina

II.7.2.1 Reacción de polimerización para la síntesis de nanopartículas cargadas. La solución previamente obtenida en el punto **II.7.1.3**, se agregó a un matraz bola de 100 mL y se añadieron 7 μL del entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), posteriormente la solución fue colocada en atmósfera inerte por medio de burbujeo de gas nitrógeno, durante 30 minutos y colocando un tapón antivuelco con septum al matraz, esto con el fin de evitar la entrada de oxígeno a la solución. Después de transcurridos los 30 minutos, la solución fue colocada a 85 °C en un baño de aceite con agitación constante. Cumplidos los 30 minutos, se agregaron 100 μL de persulfato de amonio (APS) 2 % w/w, actuando este como iniciador de la reacción de polimerización, y posteriormente esta solución se colocó en agitación por 45 minutos a 85 °C. Finalmente, la solución obtenida, se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL y se enfrió lentamente a temperatura ambiente. Una vez atemperada, a la solución se le midió el tamaño de partícula por medio de la técnica de DLS como se indica en el punto **II.8.1**.

El cargado se realizó por medio de una interacción iónica, mediante el ácido carboxílico del polímero de MAOB en forma ionizada (carga negativa) y la carga positiva de la amina presente en la clorhexidina.

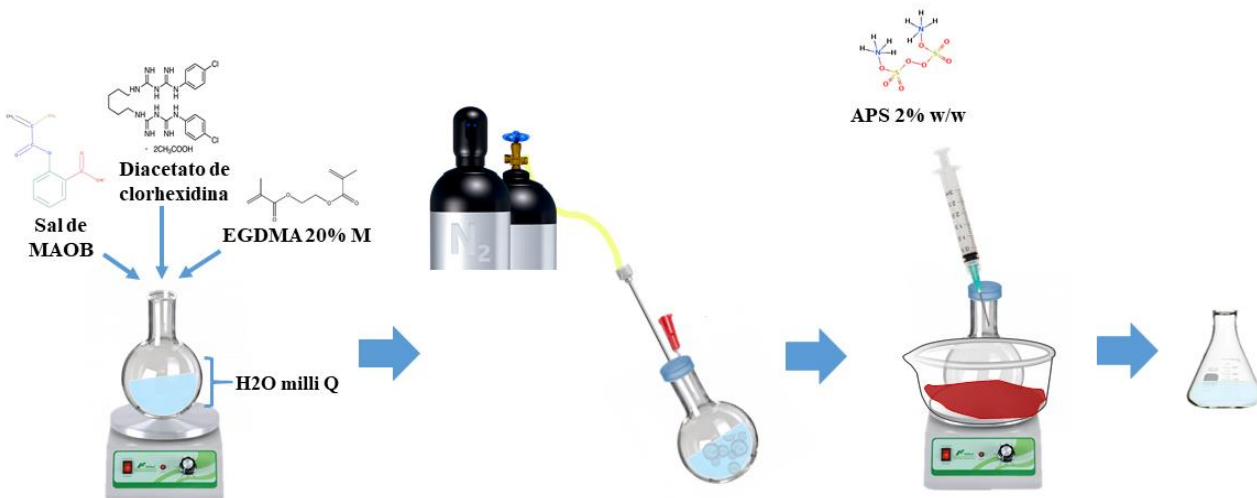


Figura 30. Reacción de polimerización de nanopartículas cargadas con clorhexidina.
(Diseño propio).

II.7.2.2 Liofilizado y obtención de nanopartículas poliméricas. La solución obtenida a partir de la reacción de polimerización en el punto **II.7.2.1** fue colocada en viales de vidrio con tapa, añadiendo a estos 10 mL de solución en cada uno. Dichos viales fueron envueltos con papel Parafilm y pesados previamente. Posteriormente, se congelaron por medio del ultracongelador BINDER Serie UF-V. Una vez congeladas, las muestras fueron liofilizadas en el equipo Labconco (freeze dry systema / freezone 4.5), este se colocó a una temperatura de -50 °C por 3 días. El producto obtenido fue finalmente pesado.

II.8 Caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas

Las nanopartículas obtenidas previamente fueron caracterizadas por medio de la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) con ayuda del equipo Zeta sizer Nano ZS, esto para conocer el tamaño de partícula previo a la reacción de polimerización, posterior a la reacción de polimerización y finalmente al liofilizado resuspendido. Así como también, fueron analizadas por medio de espectrofotometría de infrarrojo, para caracterizarlas cualitativamente.

II.8.1 Dispersión de Luz Dinámica

II.8.1.1 Lectura de solución previa a la reacción de polimerización. Se tomó 1 mL de la solución con clorhexidina y sal de MAOB (**II.7.1.3**) y se colocó en una celda para ser leída en el equipo.

II.8.1.2 Lectura de solución posterior a la reacción de polimerización. Se tomó 1 mL de la solución obtenida de la reacción de polimerización para la síntesis de nanopartículas (**II.7.2.1**) y se colocó en una celda para ser leída en el equipo.

II.8.1.3 Lectura de solución de liofilizado. Se pesó 1 mg del liofilizado obtenido en el punto **II.7.2.2** y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL, posteriormente se le añadió 1 mL de agua grado milliQ. Esta solución se colocó en agitación constante durante 24 horas, transcurrido este tiempo, se tomó el 1 mL de solución y se colocó en una celda para ser leída en el equipo.

II.8.2 Espectrofotometría Infrarrojo con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Para el análisis de espectroscopia de infrarrojo, se limpió con metanol la superficie del diamante y se dejó secar. Posteriormente, se colocó una pequeña cantidad del liofilizado obtenido en el punto **II.7.2.2**, sobre el diamante, se bajó la punta y, con ayuda del software, se leyó la muestra y se obtuvo el espectro IR.

II.8.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

El liofilizado de nanopartículas cargadas (**II.7.2.2**), también fue analizado por medio de CLAR en el cromatógrafo Thermo Scientific UltiMate 3000, para caracterizar de manera cualitativa la presencia de los fármacos: clorhexidina (CLHX) y ácido salicílico (AS). La preparación de soluciones y muestras se describen a continuación:

II.8.3.1 Preparación de soluciones

- a) Solución buffer. Se pesaron 13.3 g de fosfato de sodio monobásico y se transfirieron a un vaso de precipitado de 1 L, el cual contenía 850 mL de agua destilada. Se procedió a colocar la solución en agitación constante hasta disolución completa. Posteriormente, se agregaron 5 mL de trietilamina y se ajustó a pH 3 con ácido fosfórico 2 M. La solución obtenida se filtró y desgasificó utilizando una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm 47 mm de diámetro. Finalmente se colocó en un reservorio de 1 L limpio y seco.
- b) Solución de acetonitrilo. Se filtró y desgasificó 1 L de acetonitrilo grado CLAR, utilizando una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro. La solución fue colocada en un reservorio limpio y seco.

- c) Solución de agua destilada. Se filtró y desgasificó 1 L de agua destilada, utilizando una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro. La solución fue colocada en un reservorio limpio y seco.

II.8.3.2 Preparación de muestras

- a) Estándar dual de referencia de CLHX y AS. Se pesaron 42.5 mg de ácido salicílico grado estándar y 7.5 mg de clorhexidina diacetato grado estándar. Estas cantidades fueron transferidas a un matraz volumétrico de 50 mL el cual contenía 25 mL de etanol y se disolvió con ayuda de sonicación durante 5 minutos. Una vez disueltos los reactivos sólidos, se procedió a llevar a aforo con etanol. Posteriormente, se tomó una pequeña muestra de la solución y se filtró por medio de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm , la porción filtrada se colocó en un vial de CLAR limpio y seco.
- b) Muestra del liofilizado de nanopartículas cargadas. Se pesaron 30 mg del liofilizado de nanopartículas cargadas, previamente obtenido en el punto **II.7.2.2** y se colocaron en un vial de vidrio, el cual contenía 3 mL de etanol. La solución se colocó en agitación durante 10 minutos, esto con el fin de resuspender el liofilizado. Una vez resuspendido, se tomó una pequeña porción de la solución y se filtró por medio de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm , la porción filtrada se colocó en viales de CLAR limpios y secos.

II.8.3.3 Condiciones cromatográficas

En la **tabla 1** se muestran las condiciones cromatográficas con las cuales se realizó el análisis por CLAR. El equipo fue previamente acondicionado durante 30 minutos y las líneas fueron purgadas.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para el análisis por CLAR. (Diseño propio).

Condiciones cromatográficas	
Flujo	2 mL/min
λ	232, 260, 280, 291 nm
Columna	RAININ (SPHERISORB 0DS2 COLUMN, 5 μ m, 4.6 x 250 mm)
Temperatura	40 °C
F.M.	Solución buffer: Acetonitrilo (70:30)
Tiempo de corrida	8 minutos
Volumen de inyección	10 μ L

II.9 Incorporación de nanopartículas cargadas en suturas

El cargado e incorporación de las nanopartículas poliméricas a suturas quirúrgicas fue realizado por medio del método de inmersión que se realizó de la siguiente manera:

II.9.1. Solución con nanopartículas cargadas. Se realizó una solución que contenía nanopartículas liofilizadas obtenidas previamente (II.7.2.2) y alcohol etílico, de tal manera que la concentración correspondiera a 10 mg de liofilizado en 1 mL de etanol.

II.9.2 Obtención de suturas sin cargar. Se utilizaron suturas quirúrgicas reabsorbibles multifilamento de la marca Vicryl (Vicryl poliglactina 910), las cuales fueron cortadas en fragmentos de 15, 3 y 1 cm de longitud.

II.9.3 Obtención de suturas cargadas con nanopartículas. La solución realizada previamente (II.9.1) se colocó en viales de vidrio, limpios y secos. Posteriormente, dentro de su respectivo vial, se colocó una sutura. A continuación, los viales se colocaron en un agitador con temperatura programado a 150 rpm y a 35 °C, durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de cargado, las suturas fueron retiradas de las soluciones de cargado y se secaron a temperatura ambiente durante dos horas, protegidas de la luz y humedad. Una vez secas, las suturas fueron pesadas y resguardadas. Con cada solución de cargado se pueden cargar hasta 3 suturas (una por una). En la **figura 31**, se presenta un esquema general del cargado de las suturas.

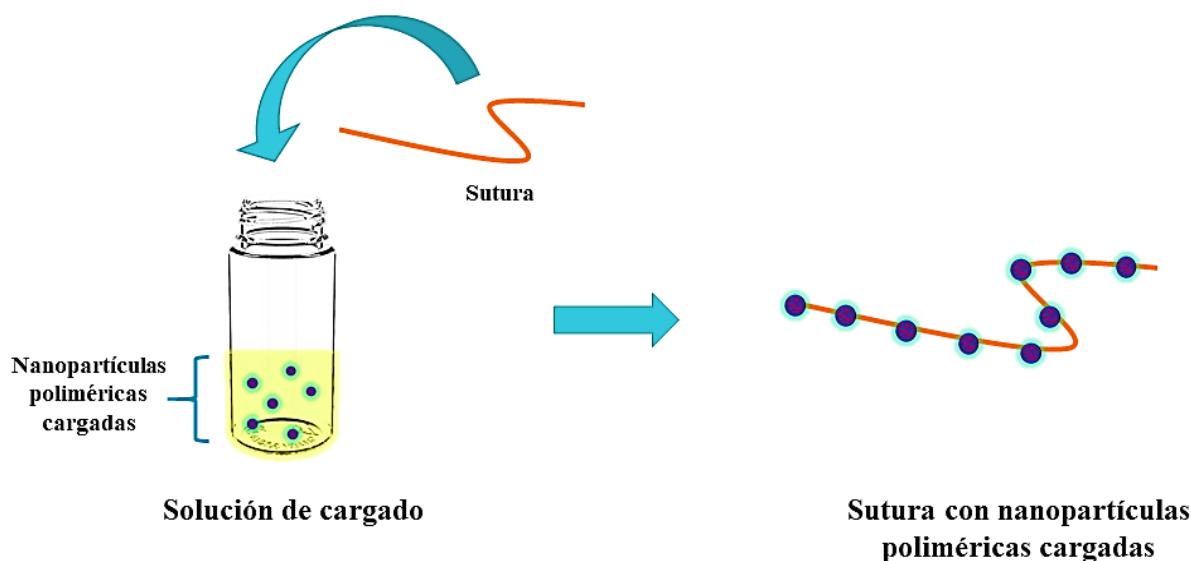


Figura 31. Incorporación de nanopartículas poliméricas de clorhexidina en suturas quirúrgicas.
(Diseño propio).

II.10 Caracterización de suturas con nanopartículas poliméricas cargadas

Las suturas previamente cargadas fueron analizadas por medio de espectrofotometría infrarrojo como se indica a continuación:

II.10.1 Preparación de las muestras

II.10.1.1 Sutura blanco. Una sutura quirúrgica reabsorbible multifilamento de la marca Vicryl (Vicryl poliglactina 910), se midió y cortó para obtener una sutura de 1 cm de longitud.

II.10.1.2 Sutura cargada con nanopartículas. Una sutura previamente cargada con nanopartículas como lo indica el punto **II.9.3** fue medida y cortada para obtener una sutura de 1 cm de longitud.

II.10.2 Análisis en equipo de infrarrojo. El análisis de espectroscopia de infrarrojo se realizó limpiando cuidadosamente, con metanol, la superficie del diamante. Posteriormente, se colocó una a una las suturas obtenidas en los puntos **II.10.1.1** y **II.10.1.2** en el diamante, se bajó la punta y, con ayuda del software, se leyó la muestra y se obtuvo el espectro IR.

II.11 Estudios de hidrólisis – liberación de nanopartículas a partir de suturas y cinética de liberación

Las suturas cargadas con nanopartículas fueron sometidas a estudios de hidrólisis – liberación y se estudió la cinética de liberación de fármacos en el medio de disolución, los cuales consistieron en lo siguiente:

II.11.1 Preparación de buffer de fosfatos pH 7.4

Se pesaron 6.8 g de fosfato monobásico de sodio y agregaron a un vaso de precipitado de 1 L, el cual contenía 800 mL de agua destilada, esta solución se colocó en agitación constante hasta disuelto el soluto. La solución obtenida fue ajustada a pH 7.4 por medio de una solución de hidróxido de sodio 2 N. Una vez ajustado el pH, la solución fue transferida a un matraz volumétrico de 1 L y se llevó a aforo. Finalmente, la solución se filtró a vacío, utilizando una membrana con tamaño de poro de 0.45 μm .

II.11.2 Estudio de liberación de fármacos

Se colocaron 2 suturas previamente cargadas con nanopartículas (**II.9.3**) en viales de vidrio que contenían un volumen de 2 mL de buffer de fosfatos a pH 7.4, posteriormente fueron colocados en un oscilador con temperatura a 37 °C y a 250 rpm por 96 horas, al término de este tiempo, se tomó una muestra para su posterior análisis en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) como lo indica el punto **II.12**. Este estudio se realizó por triplicado, es decir, se sometieron a estudio 3 viales en total.

II.11.3 Cinética de liberación de fármacos

Se colocaron 3 suturas previamente cargadas con nanopartículas (**II.9.3**) en un vial de vidrio que contenía un volumen de 6 mL de buffer de fosfatos a pH 7.4, posteriormente, este fue colocado en un oscilador con temperatura a 37 °C y a 100 rpm. Se realizaron muestreos a los 15 min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 y 96 horas, tomando 400 μL en cada muestreo y realizando reposición de medio con 400 μL de buffer de fosfatos a pH 7.4 previamente atemperado a 37 °C. Las muestras obtenidas fueron resguardadas en refrigeración hasta ser analizadas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) como lo indica el punto **II.12**.

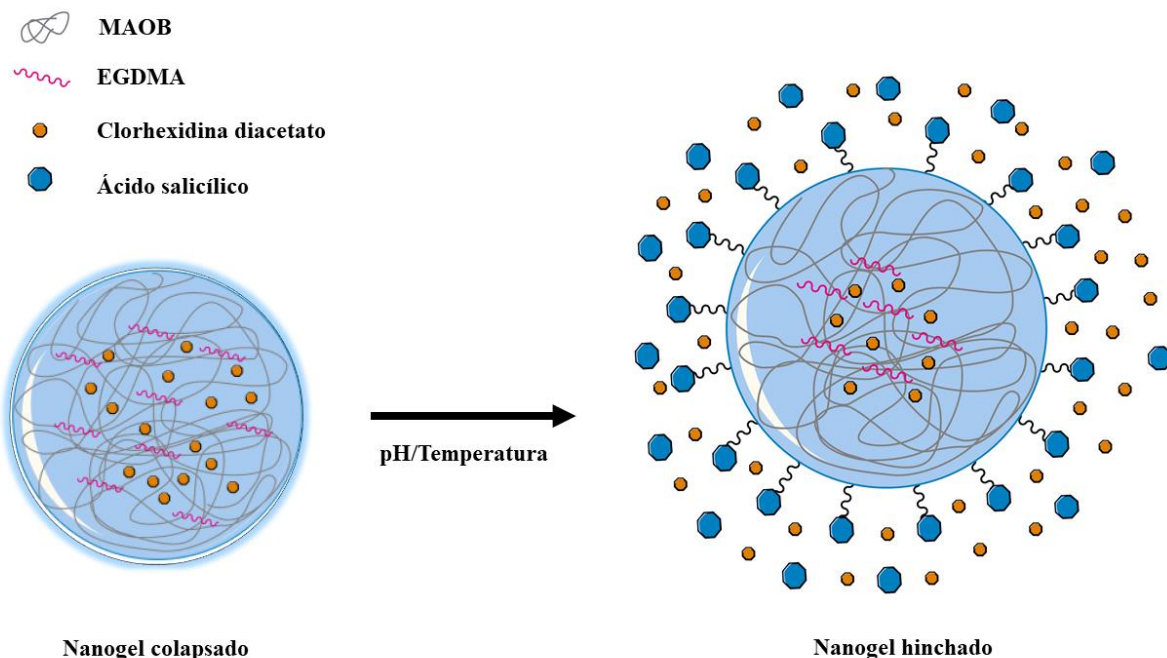


Figura 32. Hidrólisis-liberación de nanopartículas poliméricas cargadas con clorhexidina.
(Diseño propio).

II.12 Análisis y caracterización del medio de liberación para estudios de hidrólisis – liberación y estudio de la cinética de liberación de fármacos, por CLAR

Se realizó el análisis de muestras obtenidas en los estudios de hidrólisis – liberación (II.11.2) y de las muestras obtenidas a partir de la cinética de liberación (II.11.3), por medio de CLAR, esto con el fin de caracterizar de manera cuantitativa y cualitativa la presencia de fármacos en el medio de liberación. La preparación de soluciones y muestras, así como las condiciones del método se describen a continuación:

II.12.1 Preparación de soluciones

- a) Solución buffer. Se pesaron 13.3 g de fosfato de sodio monobásico y se transfirieron a un vaso de precipitado de 1 L, el cual contenía 850 mL de agua destilada. Se procedió a colocar la solución en agitación constante hasta disolución completa. Posteriormente, se agregaron 5 mL de trietilamina y se ajustó a pH 3 con ácido fosfórico 2 M. La solución obtenida se filtró y desgasificó utilizando una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm 47 mm de diámetro. Finalmente se colocó en un reservorio de 1 L limpio y seco.

- b) Solución de acetonitrilo. Se filtró y desgasificó 1 L de acetonitrilo grado CLAR, utilizando una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro. La solución fue colocada en un reservorio limpio y seco.
- c) Solución de agua destilada. Se filtró y desgasificó 1 L de agua destilada, utilizando una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro. La solución fue colocada en un reservorio limpio y seco.

II.12.2 Preparación de muestras

- a) Estándar dual de referencia de CLHX y AS. Se pesaron 42.5 mg de ácido salicílico grado estándar y 7.5 mg de clorhexidina diacetato grado estándar. Estas cantidades fueron transferidas a un matraz volumétrico de 50 mL el cual contenía 25 mL de etanol y se disolvió con ayuda de sonicación durante 5 minutos. Una vez disueltos los reactivos sólidos, se procedió a llevar a aforo con etanol. Posteriormente, se tomó una pequeña muestra de la solución y se filtró por medio de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm , la porción filtrada se colocó en un vial de CLAR limpio y seco.
- b) Muestra de estudios de hidrólisis - liberación. Se tomó una porción del medio de liberación obtenido al cabo de las 96 h de estudio de hidrólisis – liberación (II.11.2) y se filtró por medio de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm , la porción filtrada se colocó en un vial de CLAR limpio y seco.
- c) Muestras del estudio de cinética de liberación. Las muestras obtenidas en los diferentes tiempos de muestreo (II.11.3) no fueron manipuladas o preparadas, fueron directamente analizadas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución, esto para evitar la pérdida de la muestra.
- d) Blanco de medio. Se tomó una porción de la solución obtenida en el punto II.12.1 inciso a, y fue filtrada por medio de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm , la porción filtrada se colocó en un vial de CLAR limpio y seco.

II.12.3 Condiciones cromatográficas

En la **tabla 2**, se muestran las condiciones cromatográficas con las cuales se realizó el análisis por medio de CLAR. El equipo fue previamente acondicionado durante 30 minutos y las líneas fueron purgadas. Posteriormente se realizó la lectura de cada una de las muestras como se indica en las **tablas 3 y 4**.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el análisis por CLAR. (Diseño propio).

Condiciones cromatográficas	
Flujo	2 mL/min
λ	232 nm
Columna	RAININ (SPHERISORB ODS2 COLUMN, 5 μ m, 4.6 x 250 mm)
Temperatura	40 °C
F.M.	Solución buffer: Acetonitrilo (70:30)
Tiempo de corrida	8 minutos
Volumen de inyección	10 μ L

Tabla 3. Secuencia de inyecciones para análisis de por CLAR. Estudio de hidrólisis – liberación de fármacos. (Diseño propio).

Número de inyecciones	Vial
1	Solución blanco
1	Solución estándar
1	Muestra 96 h (1)
1	Muestra 96 h (2)
1	Muestra 96 h (3)

Tabla 4. Secuencia de inyecciones para análisis de por CLAR. Estudio de cinética de liberación de fármacos. (Diseño propio).

Número de inyecciones	Vial
1	Solución blanco
1	Solución estándar
1	Muestra 15 min
1	Muestra 30 min
1	Muestra 1 h
1	Muestra 2 h
1	Muestra 4 h
1	Muestra 6 h
1	Muestra 8 h
1	Muestra 24 h
1	Muestra 48 h
1	Muestra 72 h
1	Muestra 96 h

II.13 Evaluación de fuerza tensil y elasticidad de suturas cargadas

Para conocer si se habían modificado las propiedades mecánicas de las suturas al ser cargadas con nanopartículas poliméricas, se realizaron estudios de resistencia y a la tracción y elasticidad por medio del analizador de textura Brookfield CT3.

II.13.1 Preparación de la muestra

II.13.1.1 Sutura blanco. Una sutura quirúrgica reabsorbible multifilamento de la marca Vicryl (Vicryl poliglactina 910), se midió y cortó para obtener una sutura de 15 cm de longitud.

II.13.1.2 Sutura cargada con nanopartículas. Una sutura previamente cargada con nanopartículas como lo indica el punto **II.9.3** fue medida y cortada para obtener una sutura de 15 cm de longitud.

II.12.2 Análisis. Cada una de las suturas fue colocada entre las pinzas y ajustada de tal manera que estas quedaran bien sujetas. Previamente, se realizaron nudos en cada extremo, esto para evitar

que las suturas se resbalaran de las pinzas del equipo. Posteriormente, se ajustó, por medio del software, la altura de las pinzas y se programó el análisis (**figura 33**) con las condiciones indicadas en la **tabla 5**.



Figura 33. Sutura en analizador de textura Brookfield CT3. (Diseño propio).

Tabla 5. Condiciones de análisis para resistencia a la tracción. (Diseño propio).

Condición	Valor
Target value	80.0 mm
Trigger Load	30 G
Target Speed	3.0 mm/S
Probe	TA3/100
Fixture	TA-RT-KIT

II.14 Evaluación antimicrobiana a partir de suturas cargadas

Se evaluó el efecto de las suturas cargadas con nanopartículas poliméricas en bacterias identificadas comúnmente en heridas provocadas después de un procedimiento quirúrgico, las bacterias utilizadas fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM). El procedimiento se describe a continuación:

II.14.1 Preparación de medios

II.14.1.1 Medio Mueller-Hinton. Se pesaron 19 g de agar Mueller-Hinton y se colocaron en un matraz Erlenmeyer que contenía 500 mL de agua destilada. Posteriormente se disolvió con ayuda de calor, utilizando un mechero Bunsen, un tripie y tela de asbesto. Después de disuelta la solución, se colocó en un reservorio de vidrio para colocar en autoclave y esterilizar a una presión de 15 libras y temperatura de 121 °C por 15 minutos. Una vez estéril se procedió a hacer el vaciado del medio a cajas Petri estériles de poliestireno de 90 x 14 mm, esto en condiciones de esterilidad. Después del vaciado de medio, se esperó la solidificación de este y se colocaron en refrigeración.

II.14.1.2 Agua peptonada. Se pesaron 1.5 g de agar agua peptonada y se colocaron en un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de agua destilada. Posteriormente se disolvió con ayuda de calor, utilizando un mechero Bunsen, un tripie y tela de asbesto. Una vez disuelta la solución, se procedió a vaciar 3mL de la solución en tubos de ensayo con tapa, esto con ayuda de un vaso de precipitado de 50 mL. Posteriormente, los tubos fueron colocados en autoclave y se esterilizaron a una presión de 15 libras y temperatura de 121 °C por 15 minutos. Los tubos se conservaron en refrigeración.

II.14.2 Sembrado de bacterias para obtención de cultivo de 24 horas

Se realizó el sembrado de las diferentes bacterias en sus respectivas cajas Petri con medio Mueller-Hinton (**II.14.1.1**), utilizando la técnica de sembrado por agotamiento y estría múltiple (**figura 34**). Una vez realizado el sembrado, se procedió a colocar las cajas Petri en incubación a 37 °C por 24 horas.



Figura 34. Sembrado por agotamiento. (Mediateca, 2007).

II.14.3 Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión bacteriana de cada una de las bacterias aisladas y obtenidas a partir del cultivo de 24 horas (II.14.2). Dicha suspensión se realizó tomando solo colonias aisladas, por medio de un asa y, posteriormente, se colocaron en tubos de ensayo previamente obtenidos en el punto II.14.1.2, los cuales contenían agua peptonada. La turbidez o densidad bacteriana fue comparada con un estándar de turbidez 0.5 en la escala de McFarland.

II.14.4 Inóculo en placa para la realización de antibiograma

Se realizó en sembrado del inóculo, previamente obtenido en el punto II.14.3, en cajas Petri que contenían medio Mueller-Hinton, el sembrado se realizó con ayuda de hisopos estériles y por medio de estría cerrada (**imagen 35**), tratando de cubrir la totalidad de la caja sin dejar espacios. Este procedimiento se realizó para cada una de las bacterias, en cajas Petri independientes.

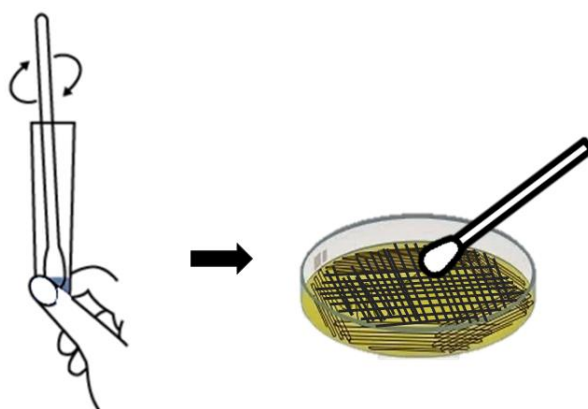


Figura 35. Sembrado con hisopo por estría cerrada. (Modificado de Axmilab, 2017).

II.14.5 Antibiograma con suturas cargadas

II.14.5.1 Preparación de suturas

II.14.5.1.1 Suturas blanco. Suturas quirúrgicas reabsorbibles multifilamento de la marca Ethicon (Vicryl poliglactina 910), se midieron y cortaron para obtener suturas de 3 cm de longitud. Posteriormente se esterilizaron por medio de luz ultravioleta durante 20 minutos.

II.14.5.1.2 Suturas patrón o de referencia. Suturas quirúrgicas de la marca Ethicon (Stratafix Symmetric PDS Plus), se midieron y cortaron para obtener suturas de 3 cm de longitud. Posteriormente se esterilizaron por medio de luz ultravioleta durante 20 minutos.

II.14.5.1.3 Suturas con nanopartículas cargadas de CLHX y AS. Suturas previamente cargadas con nanopartículas como lo indica el punto **II.9.3** fueron medidas y cortadas para obtener suturas de 3 cm de longitud. Posteriormente se esterilizaron por medio de luz ultravioleta durante 20 minutos.

II.14.5.1.4 Suturas con nanopartículas poliméricas de MAOB. Suturas quirúrgicas reabsorbibles multifilamento de la marca Ethicon (Vicryl poliglactina 910), se midieron y cortaron para obtener suturas de 3 cm de longitud. Posteriormente fueron colocadas en una solución que contenía 35 mg de nanopartículas poliméricas de MAOB (**II.5.2**) y 3.5 mL de etanol. Se secaron durante 2 horas y finalmente se esterilizaron por medio de luz ultravioleta durante 20 minutos.

II.14.5.1.5 Suturas con clorhexidina diacetato. Suturas quirúrgicas reabsorbibles multifilamento de la marca Ethicon (Vicryl poliglactina 910), se midieron y cortaron para obtener suturas de 3 cm de longitud. Posteriormente fueron colocadas en una solución que contenía 4 mg de clorhexidina diacetato y 4 mL de etanol. Se secaron durante 2 horas y finalmente se esterilizaron por medio de luz ultravioleta durante 20 minutos.

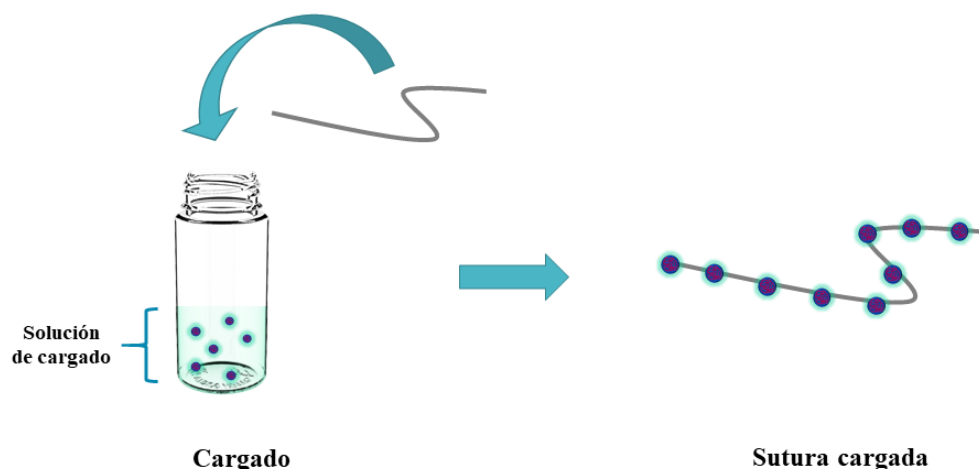


Figura 36. Procedimiento general del cargado de suturas quirúrgicas por el método de inmersión. (Diseño propio).

II.14.5.2 Colocación de suturas en placas Petri inoculadas

Con ayuda de pinzas quirúrgicas previamente sanitizadas con alcohol etílico al 70 %, fueron colocadas las diferentes suturas preparadas (II.14.5.1) en las cajas Petri previamente inoculadas (II.14.4). La **tabla 6** muestra el orden de colocación de suturas para cada una de las bacterias y en la **figura 37** se hace una representación ilustrativa. Se colocaron 2 suturas como máximo en cada caja.

Una vez colocadas las suturas en sus respectivas cajas, estas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se monitorearon y midieron los halos de inhibición cada 24 horas hasta el transcurso de 5 días.

Tabla 6. Orden de colocación de suturas. (Diseño propio).

# Caja	Suturas	Microorganismo
1	1 sutura blanco y 1 sutura de referencia	<i>S. aureus</i>
2	2 suturas cargadas	<i>E. coli</i>
3	2 suturas cargadas	<i>E. faecalis</i>
4	1 sutura con Poli(MAOb) y 1 sutura con clorhexidina	SARM



Figura 37. Colocación de suturas en caja Petri. (Diseño propio).

II.15 Evaluación de viabilidad celular

Para conocer la citotoxicidad provocada por las suturas cargadas, se realizaron estudios de viabilidad celular, evaluando su efecto sobre fibroblastos murinos BalB/3T3, células HeLa de cáncer ovario y células de melanoma.

II.15.1 Evaluación de viabilidad celular por método indirecto

II.15.1.1 Crecimiento de células en placa

Se colocaron 10,000 células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (**figura 38**), que contenía 100 μ L de medio DMEM, posteriormente se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas.

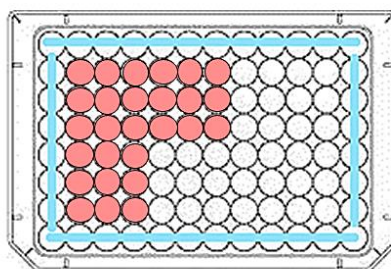


Figura 38. Placa de 96 pocillos con DMEM. (Modificado de Labclinics, 2021).

II.15.1.2 Preparación de medio de liberación

En condiciones de esterilidad, se colocaron suturas de 1 cm de longitud, en tubos eppendorf de 2 mL, los cuales contenían 1.5 mL de medio DMEM. Las suturas fueron esterilizadas previamente,

por medio de luz ultravioleta, durante 20 minutos. Los tubos fueron colocados en oscilación a 250 rpm y con temperatura de 37 °C, durante 4 días. Las suturas utilizadas se enlistan a continuación:

1. Sutura blanco (1 sutura de 1 cm)
2. Sutura patrón (1 sutura de 1 cm)
3. Sutura cargada (3 suturas de 1 cm, una en cada tubo)

II.15.1.3 Colocación de muestra en cajas

Se retiró el medio DMEM de la caja de 96 pocillos obtenida al cabo de las 24 horas (**II.15.1**) y se agregaron 50 µL del medio de liberación obtenido a partir de cada una de las suturas indicadas en el punto **II.15.1.2**. Posteriormente se agregaron 50 µL de medio DMEM nuevo y se procedió a incubar a 37 °C, con 5 % de CO₂ durante 24 horas.

II.15.1.4 Revelado por medio de MTT

Después de incubada, a la caja de 96 pocillos obtenida en el punto **II.15.1.3** se le agregó una mezcla de reactivo MTT y medio DMEM en una proporción 1:10. Posteriormente, se incubó por 4 horas más a 37 °C, con 5 % de CO₂. Una vez cumplido el tiempo, se agregaron 100 µL de solución solubilizante para cristales de formazán y se incubó toda una noche a 37 °C, con 5 % de CO₂. Finalmente, la absorbancia fue leída en el lector de placas Multiskan FC Thermo Scientific (**figura 39**) a 450 nm.



Figura 39. Lector de placas Multiskan FC Thermo Scientific. (CTR Scientific).

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

III.1 Síntesis de monómero de ácido metacriloiloxi-*o*-benzoico (MAOB)

Se obtuvo un polvo fino, color blanco, el cual tenía un olor característico. Su rendimiento fue del 86.95 %. El producto fue almacenado en viales de vidrio limpios y secos, manteniéndose en condiciones de baja humedad y a 25 °C de temperatura.

Rendimiento obtenido:

$$\%R = \left(\frac{\text{Peso MAOB}}{\text{Peso teórico}} \right) * 100$$

$$\%R = \left(\frac{12.0175g}{13.8212g} \right) * 100 = 86.95\%$$

De manera teórica, el monómero obtenido se forma gracias a una reacción de esterificación, la cual resulta de la unión de ácido salicílico con anhídrido metacrílico, dando lugar a una estructura química compuesta por un ácido carboxílico en posición *orto* y un grupo éster en la posición *ipso* del anillo aromático. Esta reacción se da en consecuencia de un ataque nucleofílico al carbonilo del anhídrido metacrílico, por parte del oxígeno del hidroxilo presente en el ácido salicílico, por lo tanto, se produce una sustitución nucleofílica acídica.

III.2 Caracterización de monómero de MAOB

III.2.1 Cromatografía de capa fina (CCF)

A partir de la cromatografía de capa fina realizada con la fase móvil de hexano y acetato de etilo (32:68), se logró observar, por medio de luz ultravioleta, la presencia de ácido salicílico, como se observa en la **figura 40**. Del lado izquierdo se encuentra el estándar de referencia de ácido salicílico (A) y del lado derecho se encuentra la muestra de MAOB (B).

El frente de referencia obtenido fue el siguiente:

$$Rf_A = 2.6 \text{ cm} / 3.8 \text{ cm} = 0.68$$

$$Rf_B = 2.1 \text{ cm} / 3.8 \text{ cm} = 0.55$$



Figura 40. Cromatografía de capa fina. (A, representa al estándar de referencia de ácido salicílico; B, representa la muestra de MAOB). (Diseño propio).

Como podemos observar en la **figura 40**, no se presentan impurezas en nuestro estándar ni en nuestra muestra. Por otro lado, el valor del frente de referencia de la muestra fue un valor cercano a 0.50, por lo cual podemos deducir que nuestro eluyente (hexano:acetato de etilo (32:68)) fue adecuado para la correcta separación o desplazamiento de los compuestos en nuestra muestra. Además, podemos observar que los recorridos y R_f 's obtenidos, son parecidos, esto nos indica que efectivamente se encuentra presente el ácido salicílico en nuestra muestra problema (monómero de MAOB). Las ligeras diferencias observadas, son debidas a que nuestras estructuras son distintas.

III.2.2 Espectrofotometría de infrarrojo con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

En el espectro infrarrojo del monómero encontrado en la **figura 41**, se lograron observar bandas características de la molécula, los enlaces se describen en la **tabla 7**.

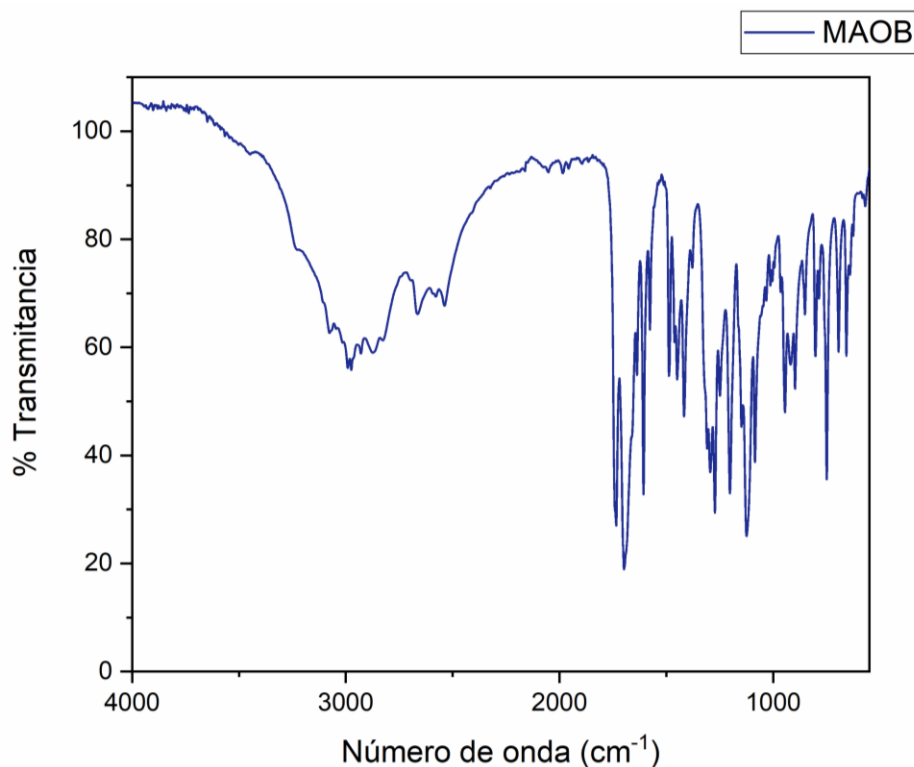
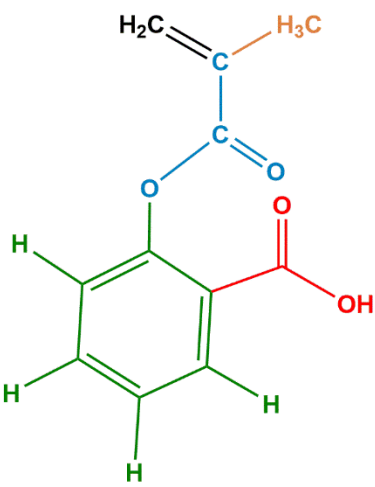


Figura 41. Espectro de infrarrojo del monómero de MAOB. (Diseño propio).

Con base en el espectro de infrarrojo obtenido, se puede observar que el monómero sintetizado presentó bandas características pertenecientes a los grupos funcionales presentes en su estructura química. Esto debido a que la molécula de MAOB cuenta con un anillo aromático, por lo que en el espectro podemos observar un conjunto de bandas entre 1800 cm^{-1} y 2200 cm^{-1} , la flexión C-H *oop*, la encontramos a 749.04 cm^{-1} y la tensión C-H a 2974.12 cm^{-1} ; lo anterior debido a que el anillo se encuentra sustituido en la posición 1 y 2, por lo tanto, corresponde a una orientación *orto*. La molécula, también cuenta con la presencia de una banda intensa correspondiente al ácido carboxílico a 1697.84 cm^{-1} , aparece una banda intensa, correspondiente al enlace carbonilo, y a 2664.14 cm^{-1} , se observa otra banda característica que corresponde al enlace O-H del ácido carboxílico. Por otro lado, la molécula de MAOB se compone por un éster, observando así una banda bien definida a 1733.94 cm^{-1} , correspondiente al enlace C=O. Finalmente, podemos destacar un enlace característico de un monómero: el enlace vinílico, el cual podemos ver relacionado con la banda localizada a 1636.87 cm^{-1} .

Tabla 7. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro infrarrojo de MAOB.
(Diseño propio).

Enlace	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Estructura
C=O	1697.84	Ácido carboxílico	
O-H	2664.14	Ácido carboxílico	
C=O	1733.94	Éster	
C=C	1606.42	Vinílico	
C-H	2974.12	Alifático	
C-O	1294.26 y 1012.58	Éster	
C-H	794.04	Aromático	
Bandas de combinación	1800-2200	Aromático O-sustituido	

III.2.3 Resonancia magnética nuclear (RMN-H¹)

Se obtuvo el espectro de RMN-H¹ (**figura 42**), en el cual podemos observar que existen 8 tipos de protones en nuestra molécula, lo cual, al comparar con nuestra molécula, podemos relacionar con los tipos de protones que están presentes. El protón **a**, a un desplazamiento de 2.15 ppm, se observa un singlete que integra para 3 H, por lo cual pertenece a los hidrógenos del metilo; el protón **b**, a 5.85 ppm que integra para 1 H, correspondiente al hidrógeno vinílico que se encuentra en posición cis con respecto al metilo; El protón **c**, un singlete que integra para 1 H, corresponde a otro de los hidrógenos vinílicos que se encuentra en posición trans con respecto al metilo, a 6.46 ppm.; Entre 7.16 ppm y 8.11 ppm existe una señal múltiple en 4 paquetes que integra para 4 H y pertenecen al anillo aromático (protón **d**, **e**, **f**, y **g**); finalmente, el protón **h**, a 9.34 ppm hay un singlete ancho que integra para 1 H correspondiente al ácido carboxílico.

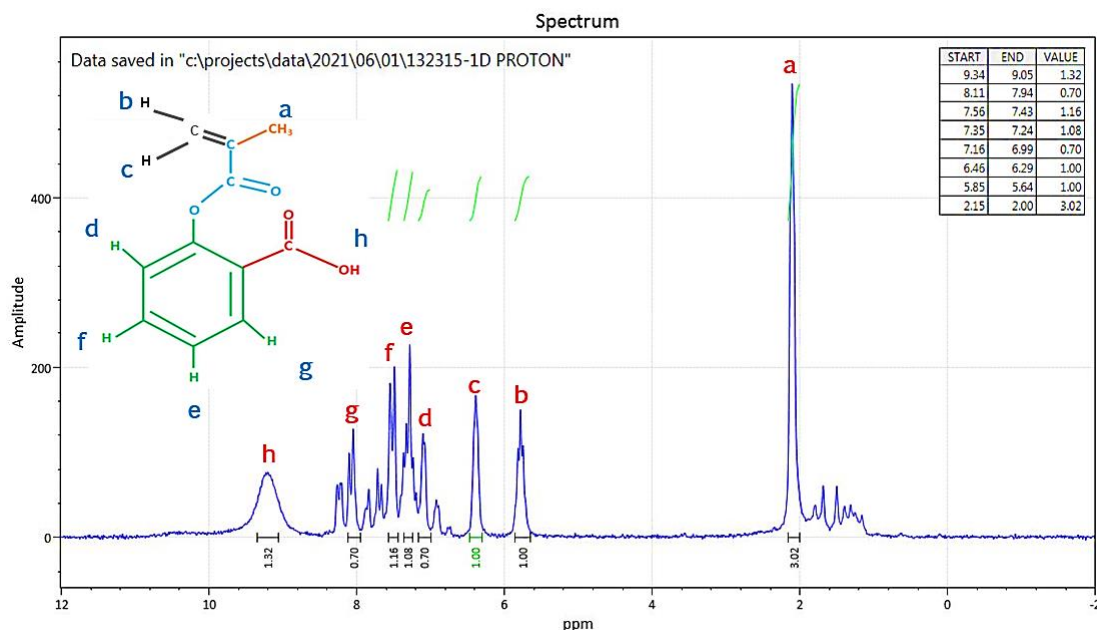


Figura 42. Espectro de RMN- H^1 del monómero de MAOB. (Diseño propio).

III.3 Caracterización de sal de MAOB

III.3.1 Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier, con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Se logró obtener un espectro de infrarrojo similar al obtenido anteriormente en el monómero, solo que ya no fue posible observar el enlace O-H que se encontraba en el ácido carboxílico (**figura 43, flecha naranja**), pues al ser una sal de potasio, el hidrógeno que se perdió en esta molécula fue sustituido por un ión de K^+ , por lo cual no aparece la banda que si veíamos en el monómero a 1697.84 cm^{-1} , ahora podemos observar una banda bien definida a 1592.97 cm^{-1} que corresponde al enlace COO^- del grupo carboxilato (**figura 43, flecha roja**). La molécula y los enlaces químicos y su relación con las bandas obtenidas en el espectro IR, se encuentran en la **tabla 8**. El resto de los enlaces de los diferentes grupos funcionales, permanecieron iguales, por ejemplo, la banda alrededor de 1700 cm^{-1} corresponde al enlace C=O del éster presente tanto en la molécula de MAOB como en la sal de MAOB (**figura 43, flechas verdes**).

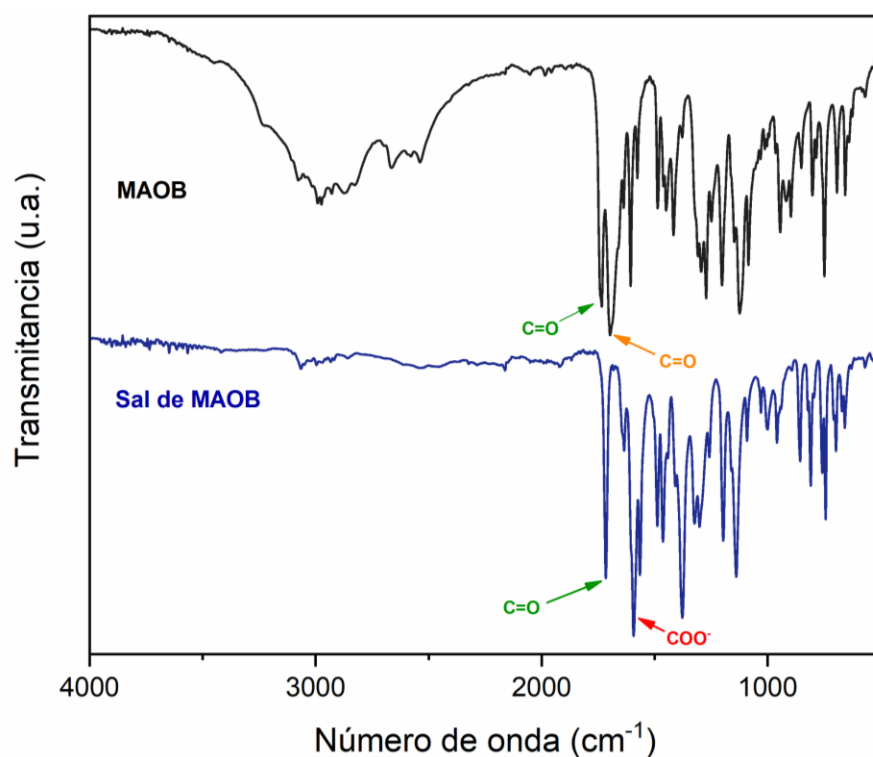


Figura 43. Espectro IR comparativo de MAOB y su forma en sal. (Diseño propio).

Tabla 8. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro infrarrojo de la sal de MAOB. (Diseño propio).

Enlace	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Estructura
COO ⁻	1592.97	Carboxilato	
C=O	1716.01	Éster	
C=C	1634.89	Vinílico	
C-H	3066.88	Aromático	
C-H	1377.26	Alifático	
C-O	1301.62 y 1029.75	Éster	
C-H opp	794.04	Aromático	
Bandas de combinación	1800-2200	Aromático O-sustituido	

III.4 Caracterización del polímero de MAOB

III.4.1 Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier, con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

El espectro infrarrojo del polímero de MAOB mostró las bandas características de dicha molécula, pues se obtuvo a 1586.68 cm^{-1} una banda intensa correspondiente al enlace COO^- del grupo carboxilato; a 1725.76 cm^{-1} se observa una banda que se relaciona con el enlace carbonilo del éster presente, otras de las bandas relacionadas al éster, se encuentran a 1291.05 cm^{-1} y 997.56 cm^{-1} , pues estas son bandas representativas del enlace C-O. En cuanto al grupo alifático, podemos observar que a 1390.40 se hace presente una banda correspondiente al enlace C-H del grupo metilo (CH_3).

Además, en el espectro IR podemos observar un conjunto de bandas entre 1800 cm^{-1} y 2200 cm^{-1} , la flexión C-H *oop*, la encontramos a 742.72 cm^{-1} , dos bandas a 1550.85 cm^{-1} y 1496.48 cm^{-1} que corresponden a la tensión C=C, así como también, la tensión C-H a 3052.17 cm^{-1} , por lo que sabemos que el anillo tiene una orientación *orto*. Al realizar la reacción de polimerización hay un cambio importante en la estructura polimérica con diferencia a la del monómero, ya que el enlace vinílico (C=C) que se encuentra en el éster, desaparece, por lo cual, en el espectrograma no veremos presente la banda característica de este enlace presente en la molécula de MAOB.

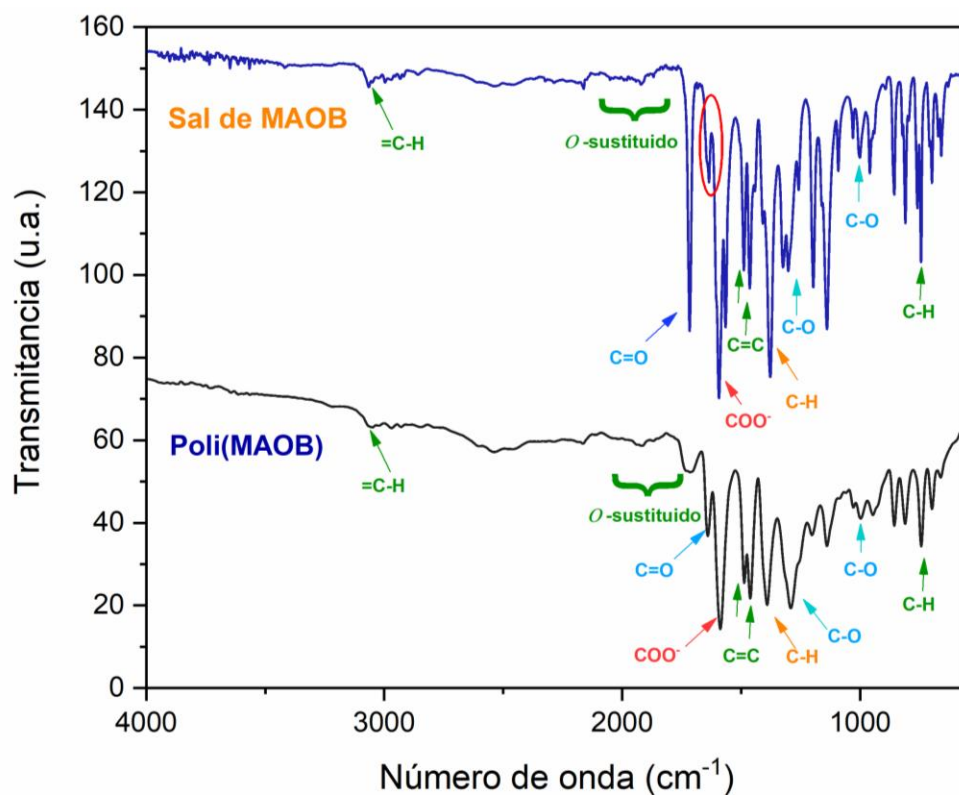


Figura 44. Espectro de infrarrojo comparativo de la sal de MAOB y el polímero de MAOB.
(Diseño propio).

Tabla 9. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro IR del polímero de MAOB.
(Diseño propio).

Enlace	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Estructura
COO ⁻	1587.17	Carboxilato	
C=O	1714.41	Éster	
C-O	1291.05 y 997.56	Éster	
C-H	1390.40	Alifático	
C-H	3052.17	Aromático	
C=C	1550.85 y 1496.48	Aromático	
C-H opp	742.72	Aromático	
Bandas de combinación	1800-2200	Aromático O-sustituido	

III.4.1 Obtención de tamaño de partícula por medio de DLS

Se logró obtener el tamaño de partícula por medio de la técnica de dispersión de luz dinámica. Se obtuvieron resultados satisfactorios, pues el tamaño de partícula obtenido antes de la reacción de polimerización fue de 480 nm y el tamaño medido después de realizar la reacción de polimerización fue de 260 nm, esto nos garantiza el encontrarnos frente a un sistema nanométrico aún después de polimerizar, además de que obtuvimos una sola distribución del tamaño de partícula y un sistema estable.

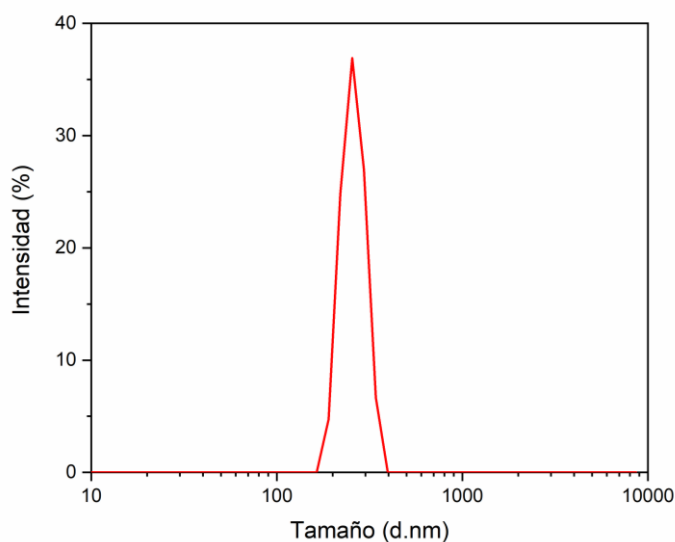


Figura 45. Representación gráfica del tamaño de partícula obtenido al polimerizar el monómero de MAOB. (Diseño propio).

III.5 Cargado-incorporación de clorhexidina a nanopartículas

III.5.1 Obtención de liofilizado de nanopartículas poliméricas de MAOB cargadas con clorhexidina

Se logró obtener un polvo fino, de baja densidad y color crema. El peso en promedio por reacción fue de 30 mg. El liofilizado obtenido fue resguardado en viales de vidrio limpios y secos protegidos de humedad y temperatura hasta su utilización en los análisis posteriores (caracterización de liofilizado y cargado en suturas quirúrgicas).



Figura 46. Liofilizado de nanopartículas poliméricas de MAOB cargadas con clorhexidina.
(Diseño propio).

III.6 Caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con clorhexidina

III.6.1 Caracterización de liofilizado de nanopartículas

III.6.2.1 Obtención de tamaño por dispersión de luz dinámica

La medición realizada antes de la reacción de polimerización dio como resultado un tamaño de partícula de 270 nm y un índice de polidispersión de 0.718 (**figura 47, inciso a**), además, existe más de una distribución de tamaño de partícula. Ya una vez realizada la reacción de polimerización, se logró obtener una sola distribución del tamaño de partícula, a comparación con lo mostrado en la solución inicial, sin embargo, hubo un aumento de tamaño en las partículas ya polimerizadas, pues se aumentó a 788.2 nm (**figura 47, inciso b**), esto se atribuye a la cantidad de entrecruzante agregado, pues este propicia que las nanopartículas se aglomeren, dando como resultado el aumento de su tamaño. En cuanto al índice de polidispersión, se pudo observar que este bajó a 0.179, indicándonos que las partículas obtenidas son estables después de ser polimerizadas. El tamaño de partícula obtenido después de liofilizar las nanopartículas poliméricas obtenidas y resuspendidas en etanol, fue de 787.8 nm (**figura 47, inciso c**), siendo un tamaño casi idéntico al obtenido en las nanopartículas poliméricas sin liofilizar, esto nos indica que el tamaño no varía considerablemente y se conserva su tamaño nanométrico. Aunque hubo un aumento del índice de polidispersión a 0.242, este sigue siendo un valor aceptable al ser un valor menor a 0.5, lo cual nos confirma que nuestras nanopartículas siguen siendo estables. Con esto se puede confirmar la correcta formación de nanopartículas poliméricas y su estabilidad después del proceso de liofilización.

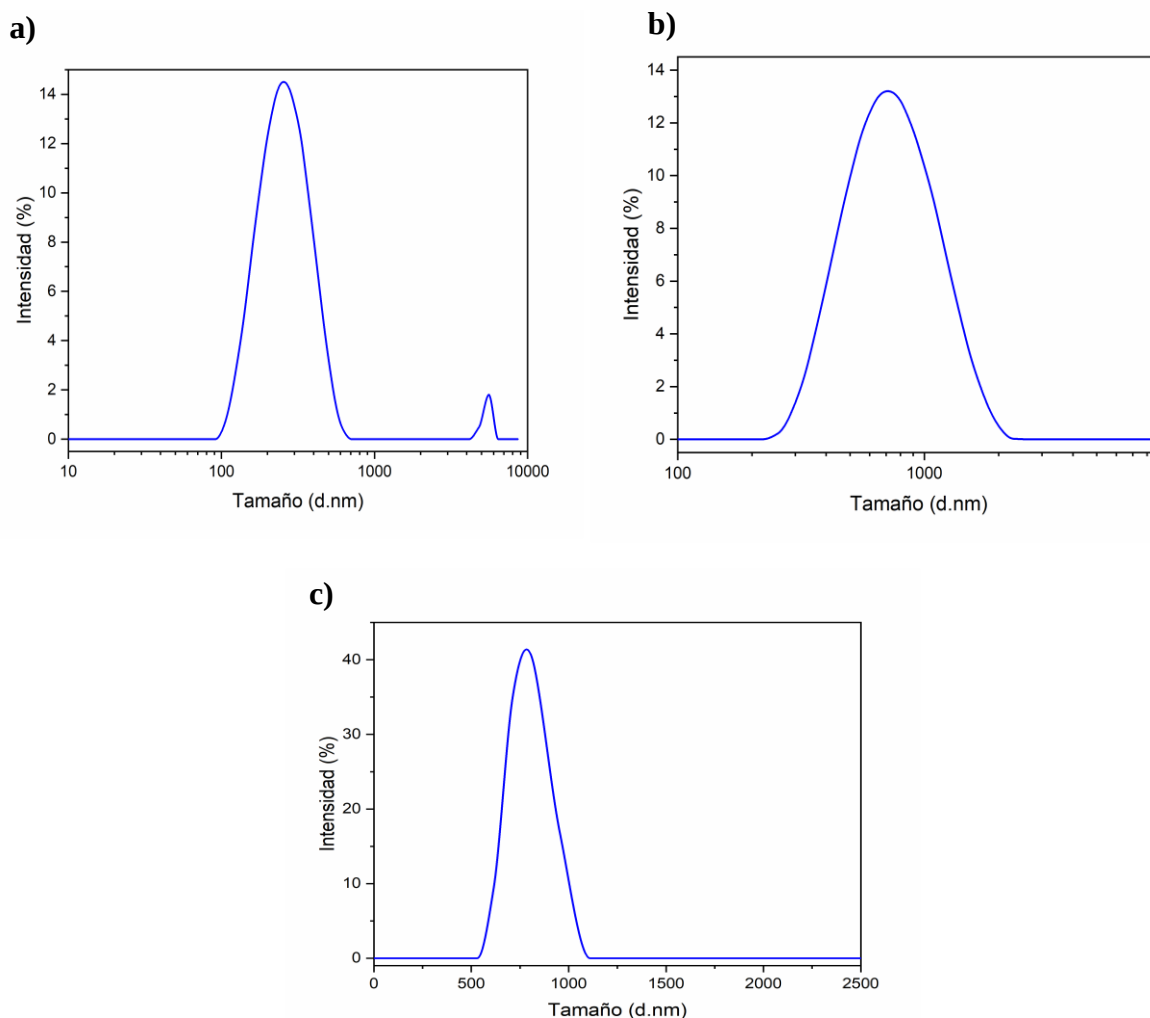


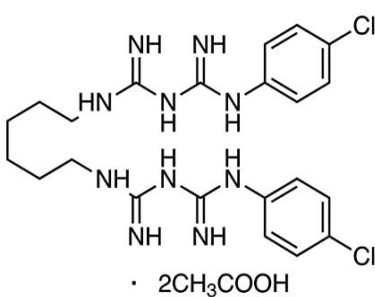
Figura 47. Representación gráfica del tamaño de partícula obtenido previo (a) y después (b) de la reacción de polimerización de partículas de MAOB cargadas con clorhexidina, así como después de liofilizadas (c). (Diseño propio).

III.6.2.2 Caracterización cualitativa por espectrofotometría infrarroja por reflectancia total atenuada con módulo ATR

Se realizó un espectro infrarrojo al liofilizado de nanopartículas poliméricas previamente cargadas con clorhexidina para caracterizarlo de manera cualitativa y a su vez, poder conocer si efectivamente la clorhexidina se encontraba presente en dichas nanopartículas. Por lo tanto, primeramente, se obtuvieron los espectros infrarrojos de la sal de MAOB y el de clorhexidina diacetato, posteriormente se obtuvo el del liofilizado. Como se puede observar en la **figura 48**, en el espectro infrarrojo correspondiente a clorhexidina, se pueden identificar a 1610.88 cm^{-1} una

banda característica perteneciente al enlace C=N de la imina, a 3323.79 cm^{-1} una banda correspondiente a la tensión de N-H de la amina, a 1487.76 cm^{-1} se observa una banda de intensidad media perteneciente al enlace C=O del grupo carbonilo del acetato presente en la molécula. Finalmente, podemos correlacionar la tensión C-H a 3120.25 cm^{-1} con el anillo aromático, la tensión C=C a 1412.29 cm^{-1} y 1501.42 cm^{-1} , la flexión C-H opp a 820.64 cm^{-1} y las bandas de combinación entre 1900-2000 cm^{-1} , que nos indican que el anillo aromático se encuentra *p*-sustituido (**tabla 10**).

Tabla 10. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro infrarrojo de clorhexidina diacetato. (Diseño propio).

Enlace	Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Estructura
C=N	1610.88	Imina	
N-H	3323.79	Amina	
C=O	1487.76	Carboxilato (acetato)	
C-H	3120.25	Aromático	
C=C	1501.42 y 1412.29	Aromático	
C-H opp	820.64	Aromático	
Bandas de combinación	1900-2000	Aromático <i>p</i>-sustituido	

Al realizar el comparativo entre el espectro infrarrojo de clorhexidina diacetato, la sal de MAOB y el liofilizado de nanopartículas (**figura 48**), nos podemos dar cuenta que las bandas de este último no se encuentran bien definidas lo cual dificulta su identificación y correlación, pues solo se pudieron detectar algunas bandas que se pueden relacionar a las presentes en la sal de MAOB, pero no hay bandas que se puedan atribuir a clorhexidina diacetato. Por ejemplo, podemos encontrar que tanto en la sal de MAOB como en el liofilizado se encuentra una banda alrededor de 1680 cm^{-1} que pertenece al enlace C=O del grupo carbonilo presente en el éster de la molécula, también se observa una banda alrededor de 1500 cm^{-1} que pertenece al enlace COO^- del grupo carboxilato (**tabla 11**). Sin embargo, en el liofilizado tampoco se logran observar bandas características que nos puedan confirmar la presencia de un anillo *o*-sustituido, esto sumado a la dificultad de encontrar bandas características de clorhexidina diacetato en nuestro espectro

infrarrojo del liofilizado de nanopartículas, nos lleva a concluir que esta técnica no es la adecuada para la correcta caracterización e identificación de los grupos funcionales de interés. Sería necesario analizar dicha muestra con técnicas más específicas como la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), como se hizo en el punto **III.10**.

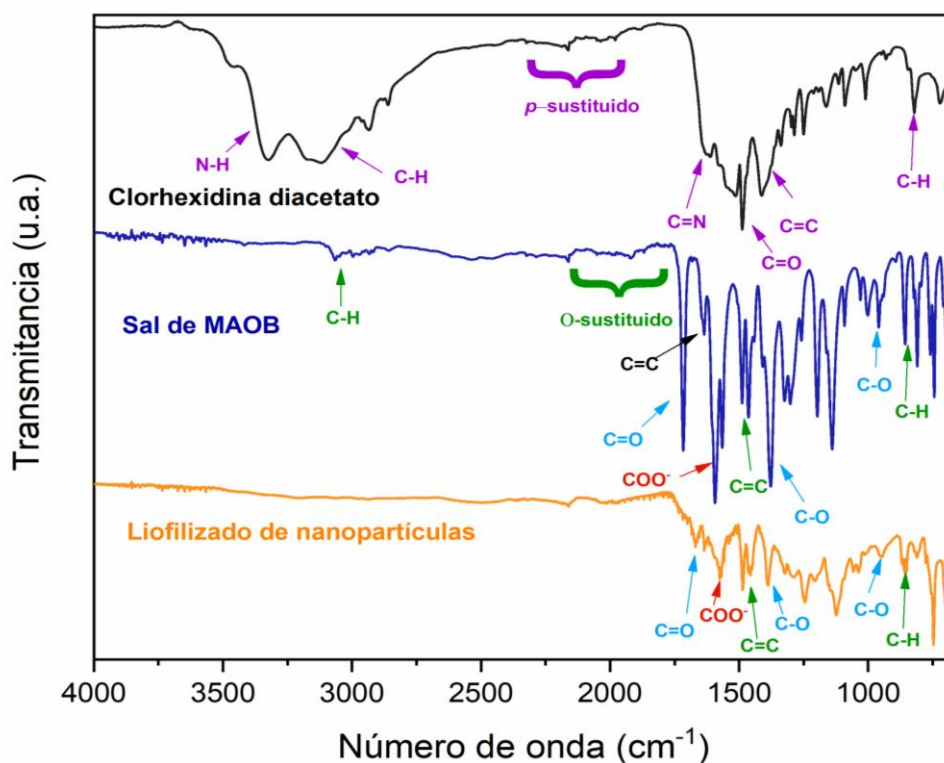


Figura 48. Espectro IR comparativo entre el liofilizado de nanopartículas poliméricas cargadas con clorhexidina, sal de MAOB y clorhexidina diacetato. (Diseño propio).

Tabla 11. Enlaces de los grupos funcionales obtenidos en el espectro infrarrojo del liofilizado de nanopartículas cargadas de clorhexidina. (Diseño propio).

Enlace	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Estructura
COO ⁻	1574.27	Carboxilato	
C=O	1682.20	Éster	
C-O	1386.74 y 946.21	Éster	
C-H	1390.40	Alifático	
C=C	1486.19 y 1455.97	Aromático	
C-H opp	850.94	Aromático	

III.6.2.3 Caracterización cualitativa por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Se resuspendieron las nanopartículas liofilizadas en etanol y posteriormente se analizaron por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Primeramente, se analizó un estándar dual de ácido salicílico y clorhexidina, logrando observar señales analíticas correspondientes a dichos fármacos, pues como muestra la **figura 49**, en el cromatograma están presentes dos picos, el primero a un tiempo de retención de 2.18 min y el segundo a 6.0 min, correspondientes a ácido salicílico y clorhexidina, respectivamente. Podemos ver también, que la altura de cada pico es proporcional a su concentración y además, podemos ver que son picos simétricos y con poco coleo, mostrándonos que el método analítico y las condiciones cromatográficas fueron adecuadas para el análisis de estos fármacos.

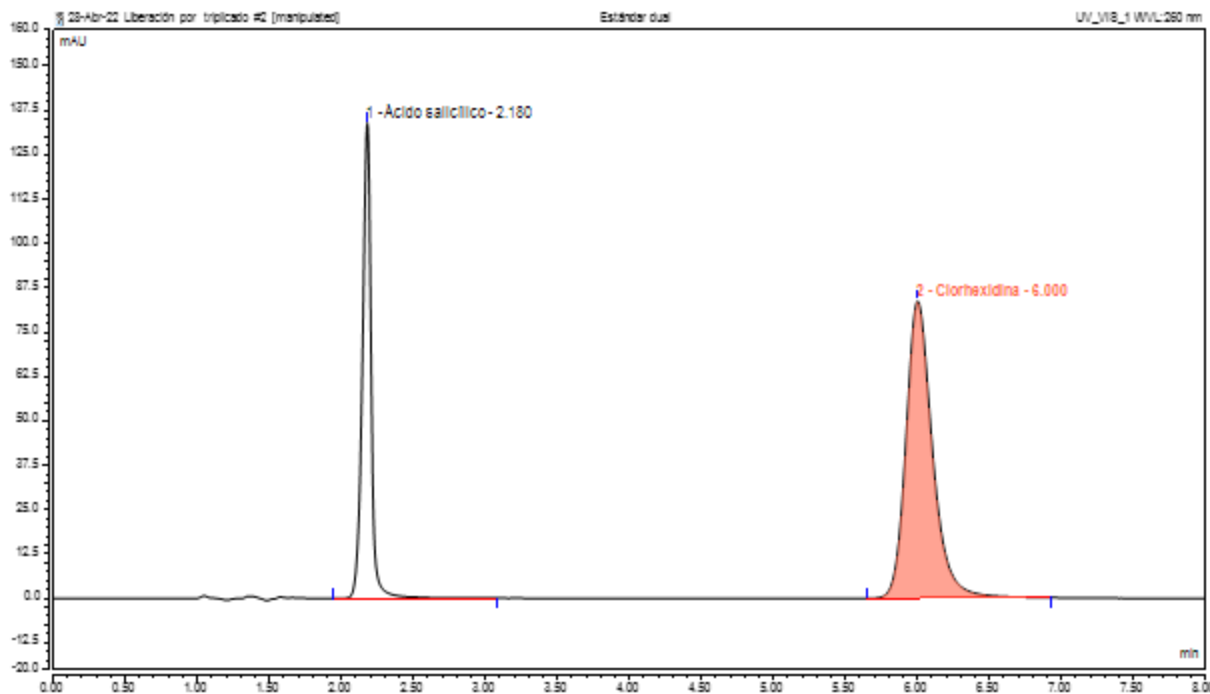


Figura 49. Cromatograma del estándar dual con ácido salicílico (pico 1) y clorhexidina diacetato (pico 2). (Diseño propio).

El cromatograma de la muestra que contenía las nanopartículas, mostró, al igual que el estándar, dos señales analíticas a tiempos similares. En el cromatograma (**figura 50**), podemos observar una señal analítica a los 2.19 min y otra de menor altura a los 5.97 min, las cuales corresponden a ácido salicílico y clorhexidina diacetato, respectivamente. Las pequeñas diferencias en los tiempos de retención, son atribuidos a que tanto el estándar como la muestra, son preparados de manera diferente y a que el estándar dual tiene un grado de pureza mayor al del liofilizado de nanopartículas.

Las señales analíticas obtenidas en el cromatograma del liofilizado de nanopartículas, al ser comparadas con las mostradas en el cromatograma del estándar dual, nos indican que tenemos ambos fármacos en nuestra muestra problema y que, por lo tanto, clorhexidina diacetato y ácido salicílico se encuentran cargados en las nanopartículas poliméricas sintetizadas. Confirmando que este sistema polimérico y nanométrico es capaz de ser cargado con fármacos como clorhexidina.

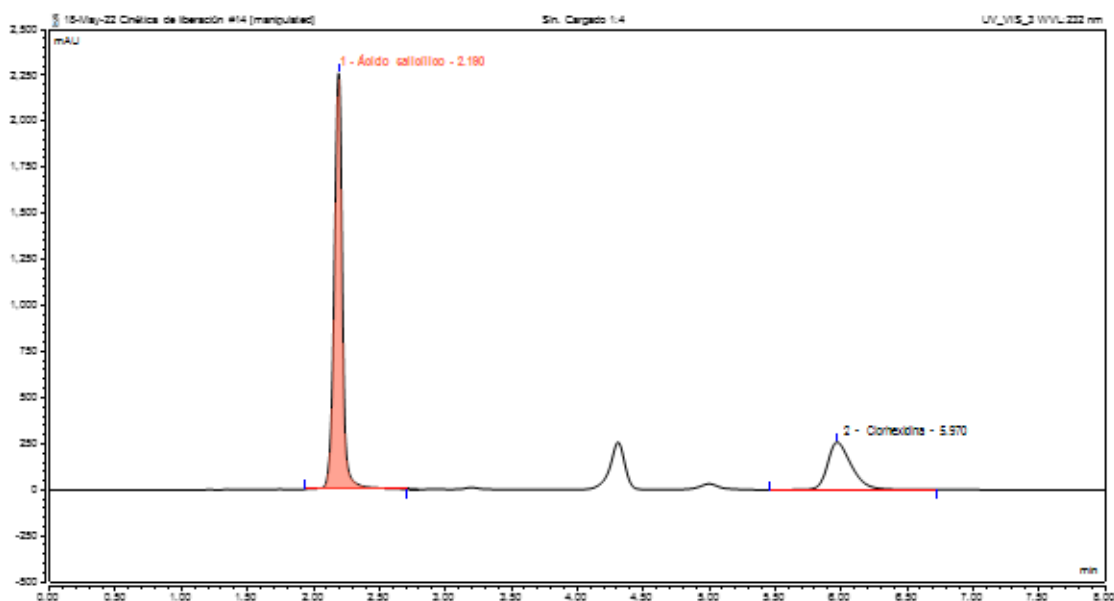


Figura 50. Cromatograma de la solución con liofilizado de nanopartículas poliméricas de MAOB cargadas con clorhexidina. (Diseño propio).

III.7 Incorporación de nanopartículas cargadas en suturas

III.5.1 Obtención de suturas impregnadas con nanopartículas poliméricas de MAOB cargadas con clorhexidina

Se lograron obtener la incorporación de nanopartículas cargadas en las suturas quirúrgicas de 15 cm, 3 cm y 1 cm de longitud como se muestra en la **figura 51**. Las suturas obtenidas se guardaron en viales limpios y protegidos de la luz y humedad, hasta sus análisis posteriores.



Figura 51. Suturas cargadas con nanopartículas poliméricas de 15 cm, 3 cm y 1 cm de longitud, respectivamente. (Diseño propio).

III.8 Caracterización de la incorporación de nanopartículas cargadas en suturas quirúrgicas

III.8.1 Análisis por espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier, con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Se obtuvieron los espectros infrarrojos de la sutura blanco y sutura cargada, para conocer si había incorporación de las nanopartículas cargadas a las suturas. En la **figura 52**, se muestran espectros comparativos entre ambas suturas y, así mismo, entre el liofilizado de nanopartículas. Se puede observar que las bandas presentes en la sutura blanco y en la sutura cargada son prácticamente iguales y que, además, no es posible identificar de manera adecuada las bandas características presentes en el liofilizado de nanopartículas. Es por ello que se descartó la técnica de infrarrojo para la caracterización de fármacos cargados en las suturas y se eligió una técnica adecuada y más específica para ello, la cromatografía de líquidos de alta resolución.

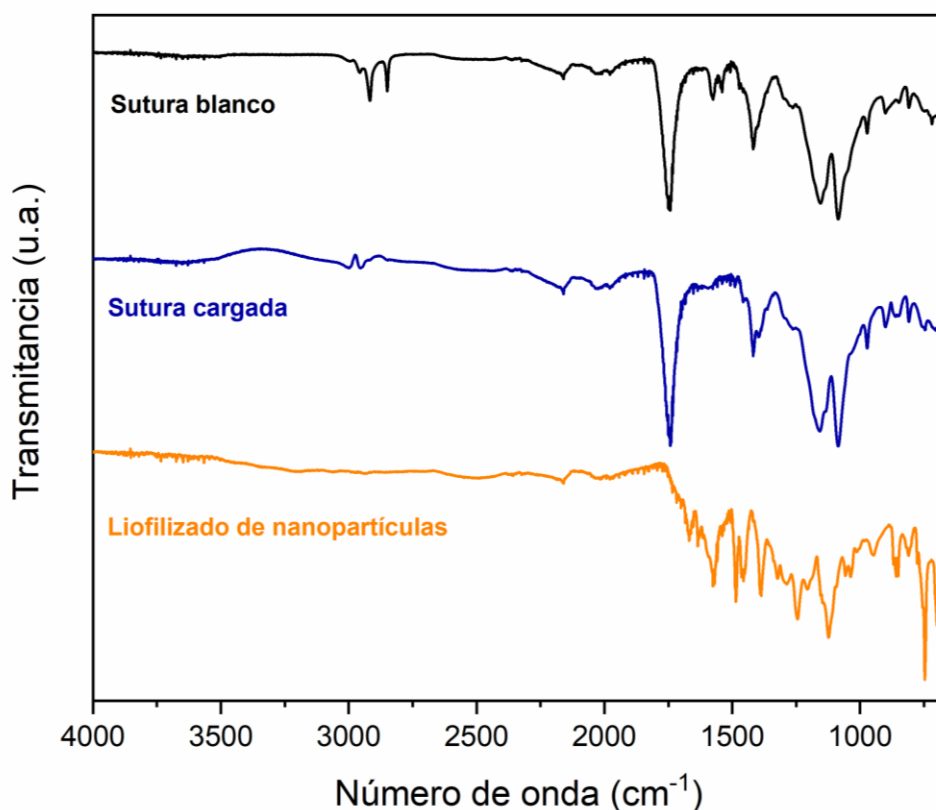


Figura 52. Espectro comparativo entre una sutura blanco, sutura cargada y el liofilizado de nanopartículas poliméricas cargadas. (Diseño propio).

III.9 Análisis y caracterización del medio de liberación para estudios de hidrólisis – liberación y estudio de la cinética de liberación de fármacos, por CLAR

III.9.1 Estudios de hidrólisis-liberación

Se analizaron en un equipo CLAR, las muestras obtenidas a partir de los estudios de hidrólisis-liberación de nanopartículas a partir de las suturas. Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes tanto para la solución muestra y un estándar para corroborar la liberación de fármacos al medio de liberación. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 232 nm, debido a que en esta se mostró una mayor absorción de parte de ambos fármacos, sobre todo en el caso de clorhexidina, pues, aunque se reporta que las longitudes de onda donde presenta una máxima absorción, son a 260 nm y 280 nm, en ellas no se logró detectar de manera adecuada su señal analítica. Esto también podría estar relacionado al grado de sensibilidad del equipo.

Al comparar los cromatogramas de la solución estándar (**figura 53**) y la muestra del medio de liberación (**figura 54**), podemos observar que en ambos aparecen dos señales analíticas a tiempos de retención similares.

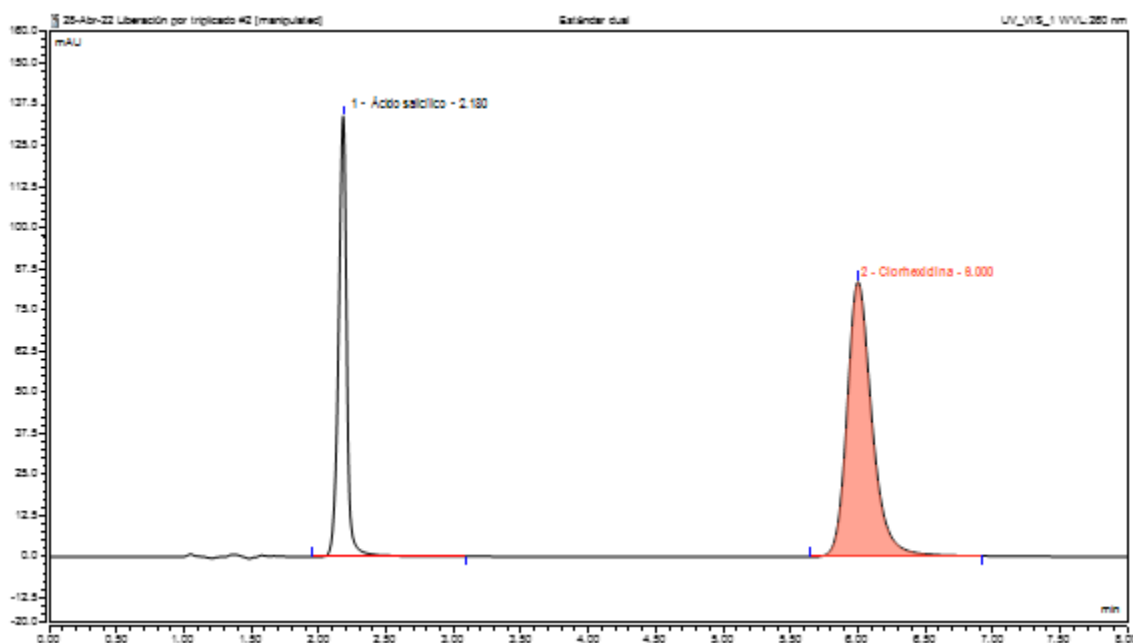


Figura 53. Cromatograma del estándar dual de ácido salicílico y clorhexidina diacetato. (Diseño propio).

En la solución estándar, aparece ácido salicílico a los 2.180 min y clorhexidina a los 6.00 min. En la solución muestra aparece ácido salicílico a los 2.157 min y clorhexidina a los 5.983 min (**figura 55**). Por lo tanto, podemos confirmar que ambos fármacos están siendo cargados y liberados al medio de disolución a pH 7.4, a partir de las suturas impregnadas con nanopartículas poliméricas cargadas. Esto nos podría indicar que las suturas serán capaces de liberar fármaco a un pH normalmente encontrado en heridas, pues se sabe que el pH va de 7.1-8.9.

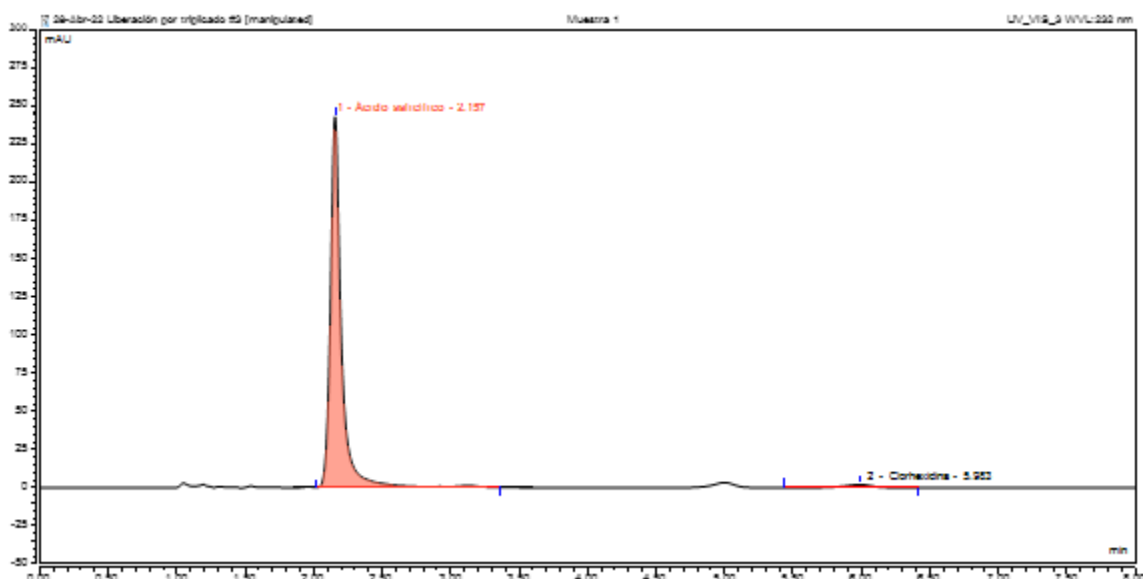


Figura 54. Cromatograma de la muestra del medio de liberación con los fármacos ácido salicílico y clorhexidina diacetato. (Diseño propio).

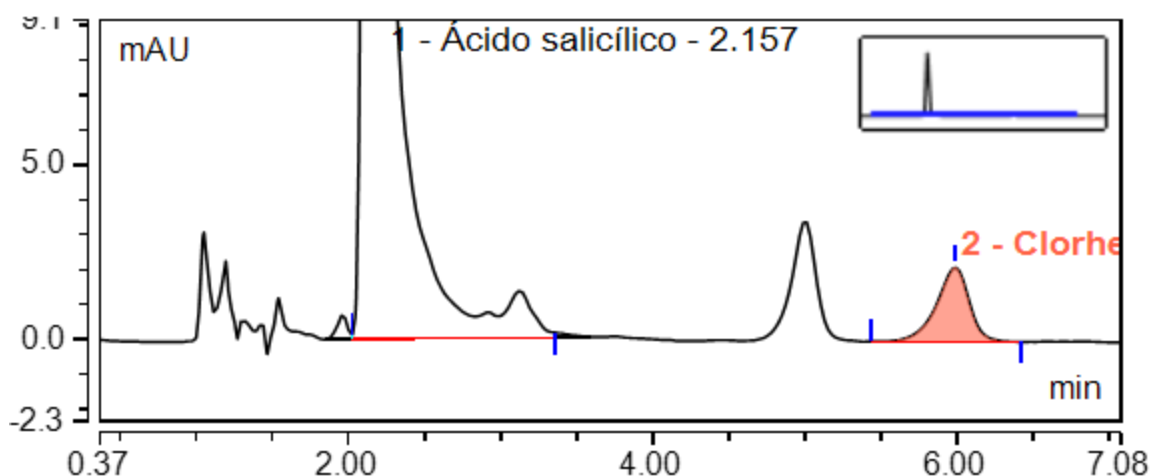


Figura 55. Acercamiento del cromatograma de la muestra del medio de liberación con los fármacos ácido salicílico y clorhexidina diacetato. (Diseño propio).

Las concentraciones del fármaco liberado al medio (**tabla 12**), fueron obtenidas al integrar los picos y obtener sus áreas, en conjunto con las rectas de calibración correspondientes para cada fármaco (**anexos 2 y 3**), obteniendo las ecuaciones de la recta y realizando los cálculos adecuados. En la **tabla 12**, se observan las concentraciones de fármaco liberado para cada una de las suturas, dando como promedio 101.34 µg/mL de ácido salicílico y 2.83 µg/mL de clorhexidina diacetato.

Tabla 12. Concentración de ácido salicílico y clorhexidina en el medio de liberación. (Diseño propio).

Sutura	Concentración de ácido salicílico (µg /mL)	Concentración de clorhexidina (µg/mL)
1	104.82	2.82
2	111.57	2.99
3	87.62	2.69
Promedio	101.34	2.83
Desviación estándar	12.35	0.15

III.9.2 Cinética de liberación

Para conocer el tipo de liberación de fármaco, se realizaron cinéticas de liberación para ambos fármacos a distintos tiempos de muestreo. Como podemos observar, en la **figura 56**, a manera gráfico, el comportamiento de ácido salicílico y clorhexidina, se asemeja a una liberación sostenida, pues el fármaco se libera de manera constante a lo largo del tiempo, sin causar gran fluctuación en las concentraciones de fármaco liberado. Este tipo de liberación permite que el fármaco sea liberado de manera constante, asegurando la eficacia, comodidad y seguridad del tratamiento. Por otro lado, podemos observar que la cantidad liberada máxima de ácido salicílico es de 135 $\mu\text{g/mL}$ y de clorhexidina es de 7.5 $\mu\text{g/mL}$, esto al cabo de 96 h. Para conocer la cinética de liberación de una manera más completa, sería necesario realizar muestreos por mayor tiempo.

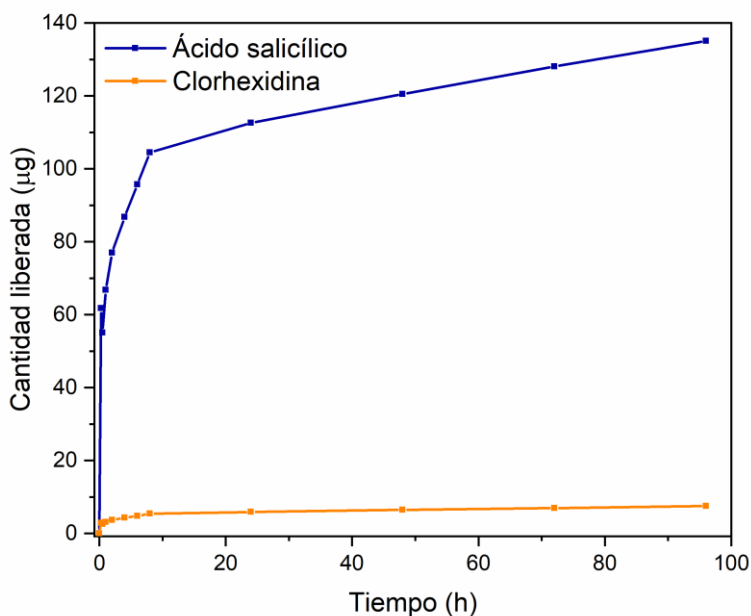


Figura 56. Cinética de liberación de fármacos. (Diseño propio).

III.10 Evaluación de fuerza tensil y elasticidad de suturas cargadas

Se evaluó la fuerza necesaria para romper una sutura y su elasticidad, tanto en una sutura blanco (Vicryl poliglactina 910), como en suturas impregnadas con nanopartículas poliméricas cargadas. Esto para conocer si sus propiedades mecánicas fueron modificadas después de realizar el procedimiento de cargado en suturas.

En la **figura 57**, podemos observar a manera de gráfico, la distancia o estiramiento que sufre conforme se va ejerciendo una fuerza sobre las suturas, por lo cual podemos deducir que para la sutura cargada se requieren 91 N de fuerza para romperla y que es estirada hasta los 28 mm, antes de romperse. En la sutura blanco se puede observar que la fuerza necesaria para romperla es de 89 N y que se estira hasta 36 mm antes de romperse. Por lo tanto, el triplicado de suturas cargadas, en promedio requiere una mayor fuerza para romperse que la sutura blanco, sin embargo, los valores no están muy alejados uno del otro, por lo cual podemos decir que esta propiedad mecánica se conserva después de impregnar una sutura con nanopartículas poliméricas cargadas. La fuerza tensil es necesaria para conocer cuanta fuerza puede soportar una sutura antes de romperse, ya que es necesario que las suturas sean capaces de soportar las fuerzas que se ejercen en el proceso de cicatrización.

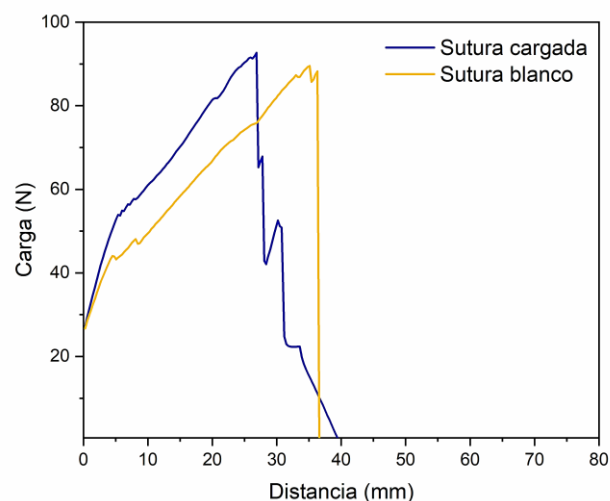


Figura 57. Gráfico de fuerza tensil ejercida para la ruptura de sutura blanco y sutura cargada.
(Diseño propio).

Asimismo, se calculó la elasticidad de la sutura cargada y sutura blanco, para conocer si esta propiedad mecánica se había conservado también, ya que esta propiedad es muy importante a la hora de realizar la suturación de heridas y además permite que la sutura se encoja durante la contracción de la herida. Para conocer este parámetro, se utilizó la fórmula para obtener el módulo de Young el cual se rige según la siguiente fórmula:

$$E = \sigma / \varepsilon$$

El valor obtenido para la sutura blanco fue de 0.253 N/mm^2 y para la sutura cargada fue de 0.407 N/mm^2 . Al comparar dichos valores, podemos observar que el módulo de Young para la sutura cargada es más grande que el módulo de Young de la sutura blanco, esto significa que la elasticidad es menor en la sutura ya cargada que en la sutura blanco y que, por lo tanto, esta propiedad mecánica si se modifica en la sutura después de ser impregnada con nanopartículas poliméricas cargadas.

III.11 Evaluación antimicrobiana a partir de suturas cargadas

Se midieron los halos de inhibición para cada una de las suturas en cajas Petri inoculadas con las bacterias *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* y SARM. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada una de ellas.

III.11.1 Evaluación con *Escherichia coli*

En la **figura 58**, se muestra como la sutura blanco no presentó inhibición de bacterias desde el primer día de monitoreo. Sin embargo, se puede observar que la sutura patrón si presenta inhibición de bacterias desde el primer día, sin embargo, en el día cinco, podemos ver como comienza a haber colonización del halo y eso nos indica que *E. coli* se va haciendo tolerante al pasar el tiempo.

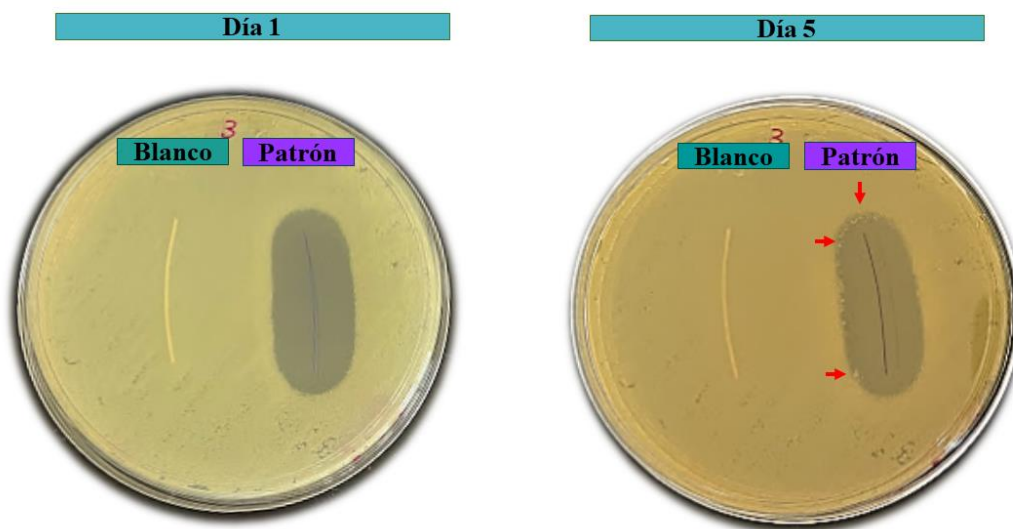


Figura 58. Halo de inhibición de la sutura blanco y sutura patrón, a los días 1 y 5 en *E. coli*.
(Diseño propio).

Por otro lado, las suturas que contienen nanopartículas poliméricas cargadas con fármacos, muestran inhibición de *E. coli* desde el primer día y, además, siguen inhibiendo hasta el día 5 sin presentar tolerancia por parte de la bacteria (**figura 59**).

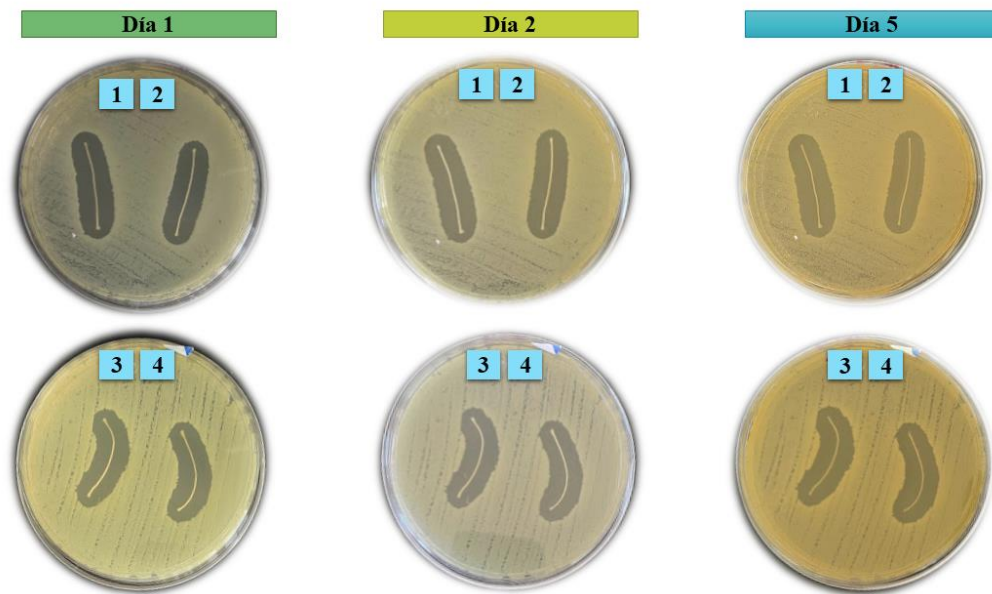


Figura 59. Halo de inhibición de las suturas cargadas, a los días 1, 3 y 5, en *E. coli*. (Diseño propio).

La **tabla 13**, muestra los diámetros obtenidos respecto a los días y el tipo de sutura. El diámetro promedio del halo de inhibición para el cuadruplicado de la sutura cargada, fue de 12 mm, siendo inferior al diámetro de la sutura patrón, sin embargo, como se mencionó anteriormente, las suturas cargadas muestran inhibición constante a lo largo de los 5 días sin presencia de tolerancia por parte de *E. coli*.

Tabla 13. Diámetro de los halos de inhibición de suturas en cultivo con *Escherichia coli*.
(Diseño propio).

Sutura	Día 1	Día 5
Blanco	0	0
Referencia	17	15
Cargada 1	12	12
Cargada 2	12	12
Cargada 3	12	12
Cargada 4	12	12
Poli(MAOB)	0	0
Clorhexidina	12	12

En cuanto a las suturas que solo contenían nanopartículas de poli(MAOB), pudimos ver que no se presentó inhibición alguna desde el primer día. En cambio, la sutura con clorhexidina diacetato, presentó un halo de inhibición de 12 mm desde el día uno y se mantuvo hasta el día cinco. En la **figura 60**, se muestra del lado izquierdo la sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y del lado derecho la sutura con clorhexidina.

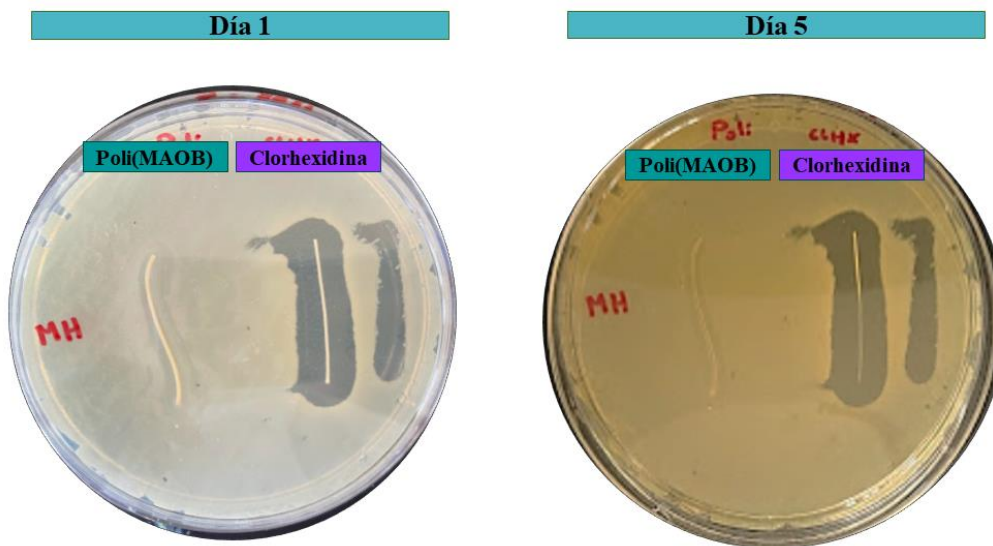


Figura 60. Halo de inhibición de sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y sutura con clorhexidina diacetato, en *E. coli*, días 1 y 5. (Diseño propio).

III.11.2 Evaluación con *Enterococcus faecalis*

En la **figura 61**, se muestra que la sutura blanco no presenta inhibición de bacterias desde el primer día de monitoreo. Sin embargo, se puede observar que la sutura patrón presenta inhibición de bacterias desde el primer día, aunque, al igual que con *E. coli*, en el día cinco, podemos ver como las bacterias colonizan el halo y, por lo tanto, existe tolerancia de parte de *E. faecalis* al triclosán presente en la sutura patrón.

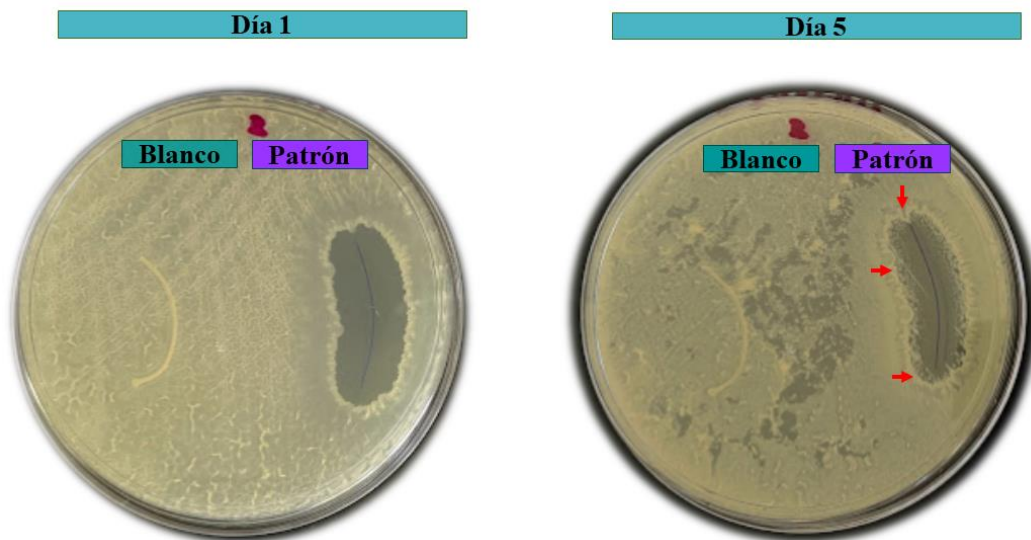


Figura 61. Halo de inhibición de la sutura blanco y sutura patrón, a los días 1 y 5 en *E. faecalis*.
(Diseño propio).

Sin embargo, las suturas cargadas presentan un halo de inhibición bien definido desde el día uno, hasta el día cinco, sin observarse tolerancia por parte de la bacteria (**figura 62**). Esto no indica que la sutura cargada logrará inhibir a *E. faecalis* por varios días sin que haya presencia de bacterias a diferencia de una sutura comercial con triclosán.

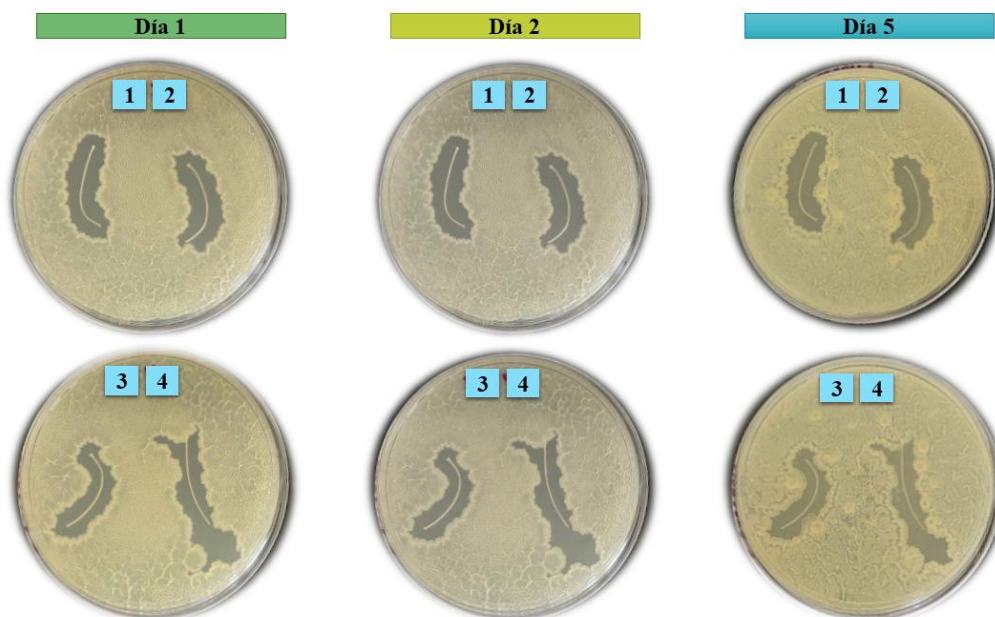


Figura 62. Halo de inhibición de las suturas cargadas, a los días 1, 3 y 5, en *E. faecalis*. (Diseño propio).

En la **tabla 14**, se presentan los diámetros medidos en los halos de inhibición para las diferentes suturas. En promedio, las suturas cargadas presentan un diámetro de inhibición de 10.25 mm, diámetro que es menor al de la sutura patrón, pero que es suficiente para que la sutura no sea colonizada y, por lo tanto, se esperaba que una herida no sea infectada por dicha bacteria.

Tabla 14. Diámetro de los halos de inhibición de suturas en cultivo con *Enterococcus faecalis*. (Diseño propio).

Sutura	Día 1	Día 5
Blanco	0	0
Referencia	13	8
Cargada 1	12	12
Cargada 2	12	12
Cargada 3	10	10
Cargada 4	7	7
Poli(MAOB)	0	0
Clorhexidina	3	3

La sutura con nanopartículas de poli(MAOB), no mostró inhibición en *E. faecalis*, desde el primer día de estudio. Sin embargo, la sutura con clorhexidina, mostró un pequeño halo de inhibición de 3 mm que se mantuvo hasta el día 5. Este comparativo se puede observar en la **figura 63**, del lado derecho se encuentra la sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y del lado izquierdo se encuentra la sutura con clorhexidina diacetato.

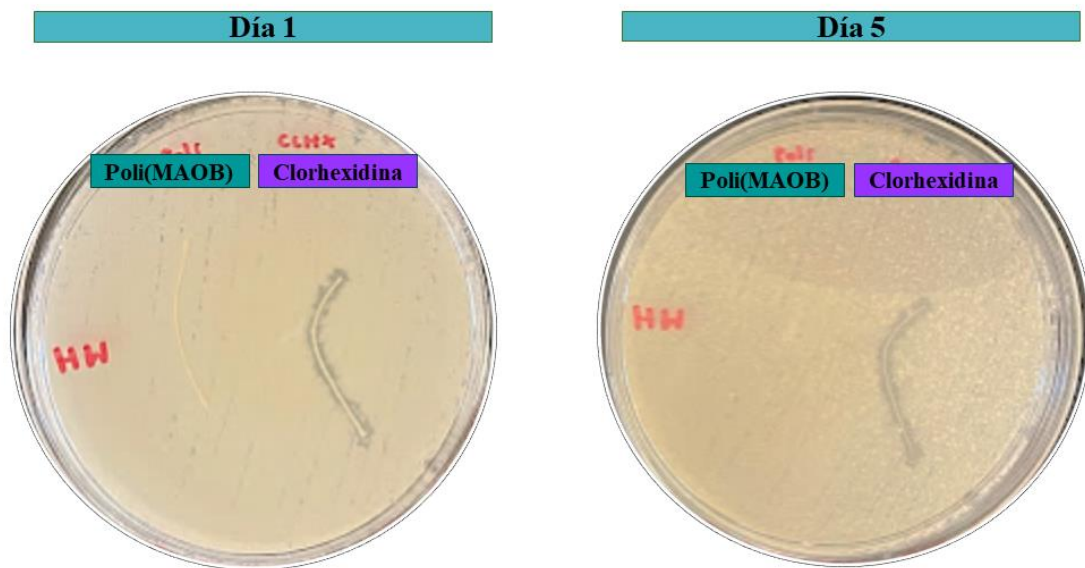


Figura 63. Halo de inhibición de sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y sutura con clorhexidina diacetato, en *E. faecalis*, días 1 y 5. (Diseño propio).

III.11.3 Evaluación con *Staphylococcus aureus*

En la **figura 64**, se muestra una sutura blanco, la cual no presentó inhibición de bacterias desde el primer día de monitoreo. Por otro lado, se puede observar que la sutura patrón presenta un halo de inhibición de 29 mm desde el primer día, aunque, en el día cinco, podemos ver como las bacterias colonizan el halo y el diámetro disminuye a 27 mm, por lo cual, podemos confirmar que existe tolerancia de parte de *S. aureus* al triclosán presente en la sutura patrón, a través del tiempo.

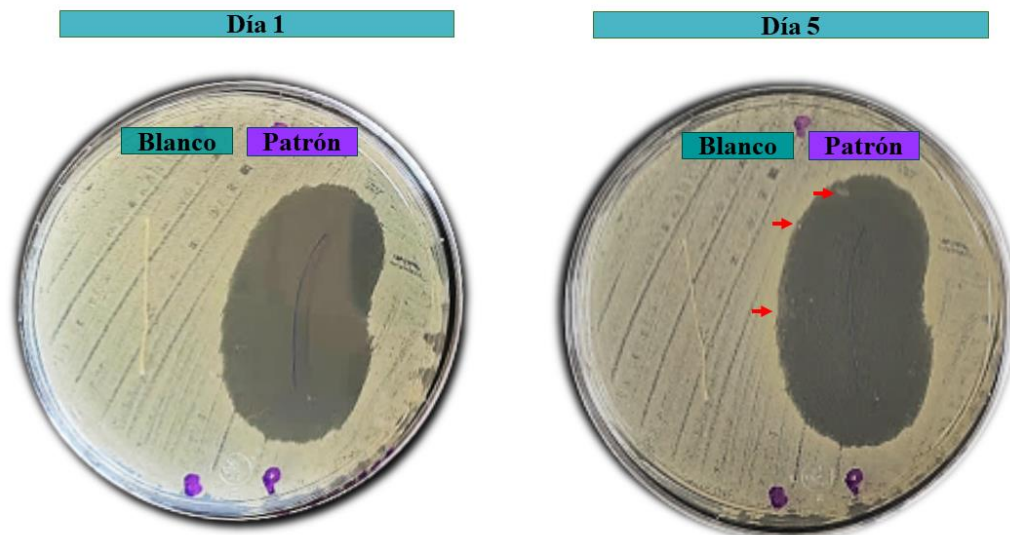


Figura 64. Halo de inhibición de la sutura blanco y sutura patrón, a los días 1 y 5 en *S. aureus*. (Diseño propio).

En cuanto a las suturas cargadas con nanopartículas de clorhexidina, podemos ver en la **figura 65**, como a partir del día uno y hasta el día cinco se presenta inhibición sin crear tolerancia, ya que con cada una de las suturas cargadas se observa un halo definido desde el primer día y hasta el final del estudio.

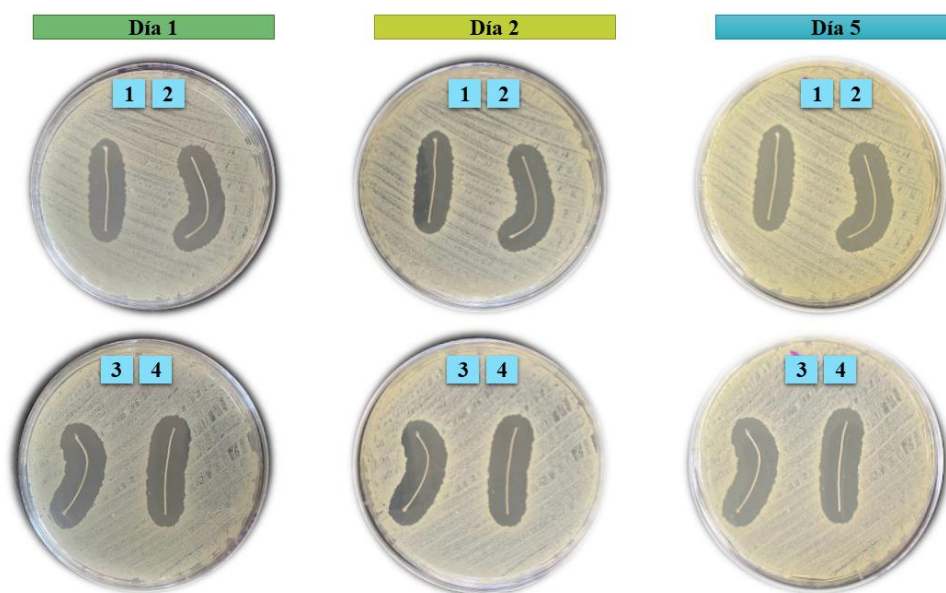


Figura 65. Halo de inhibición de las suturas cargadas, a los días 1, 3 y 5, en *S. aureus*. (Diseño propio).

En la **tabla 15**, se presentan los diámetros medidos en los halos de inhibición para las diferentes suturas. En promedio, las suturas cargadas presentan un diámetro de inhibición de 12.75 mm durante 5 días, diámetro que es menor al de la sutura patrón, pero que se mantiene y que es suficiente para que la sutura no sea colonizada, logrando asegurar la inhibición de *S. aureus* durante varios días.

Tabla 15. Diámetro de los halos de inhibición de las suturas en cultivo con *S. aureus*. (Diseño propio).

Sutura	Día 1	Día 5
Blanco	0	0
Referencia	29	27
Cargada 1	12	12
Cargada 2	13	13
Cargada 3	12	12
Cargada 4	14	14
Poli(MAOB)	4	0
Clorhexidina	18	18

Al analizar la sutura con nanopartículas de poli(MAOB), se pudo observar un pequeño halo de inhibición en *S. aureus*, solo en el primer día de estudio, sin embargo este fue colonizado completamente al cabo de los 5 días. Por otro lado, la sutura con clorhexidina, mostró un halo de inhibición de 18 mm que se mantuvo hasta el día 5. Este comparativo se puede observar en la **figura 66**, del lado derecho se encuentra la sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y del lado izquierdo se encuentra la sutura con clorhexidina diacetato.

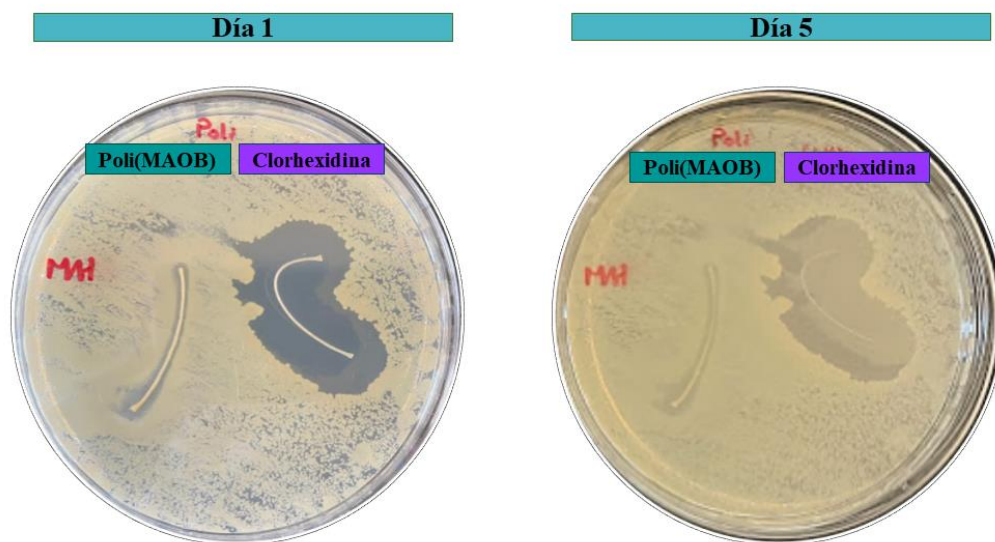


Figura 66. Halo de inhibición de sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y sutura con clorhexidina diacetato, en *S. aureus*, días 1 y 5. (Diseño propio).

III.11.4 Evaluación con *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

Se realizó una prueba de inhibición bacteriana con una bacteria resistente, como lo es el SARM, esto para conocer si las suturas cargadas eran capaces de inhibirlo. Los resultados fueron satisfactorios, ya que se pudo observar un halo de inhibición intacto durante los cinco días de estudio (**figura 67**).

Como se puede observar en la **figura 67**, del lado izquierdo de la caja Petri, se encuentra la sutura blanco completamente colonizada por SARM y del lado derecho se encuentra la sutura patrón con un halo de inhibición de 34 mm de longitud desde el primer día. Sin embargo, para el día cinco, se observa crecimiento de pequeñas colonias dentro del halo de inhibición para la sutura patrón, lo cual nos indica que SARM se ha vuelto tolerante al triclosán presente en la sutura.

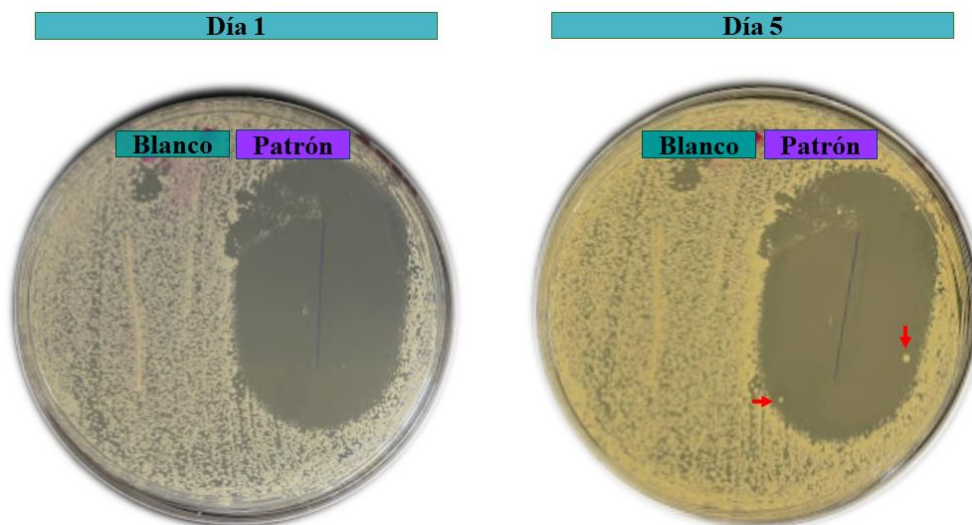


Figura 67. Halo de inhibición de la sutura blanco y sutura patrón, a los días 1 y 5 en SARM.
(Diseño propio).

Por otro lado, las tres de las cuatro suturas cargadas mostraron inhibición, la cuarta sutura se contaminó y fue descartada para este estudio. Como se puede observar en la **figura 68**, las suturas cargadas muestran inhibición desde el primer día, hasta el día cinco sin presentar tolerancia por parte de SARM, pues el halo de inhibición se mantuvo intacto durante todo el análisis.

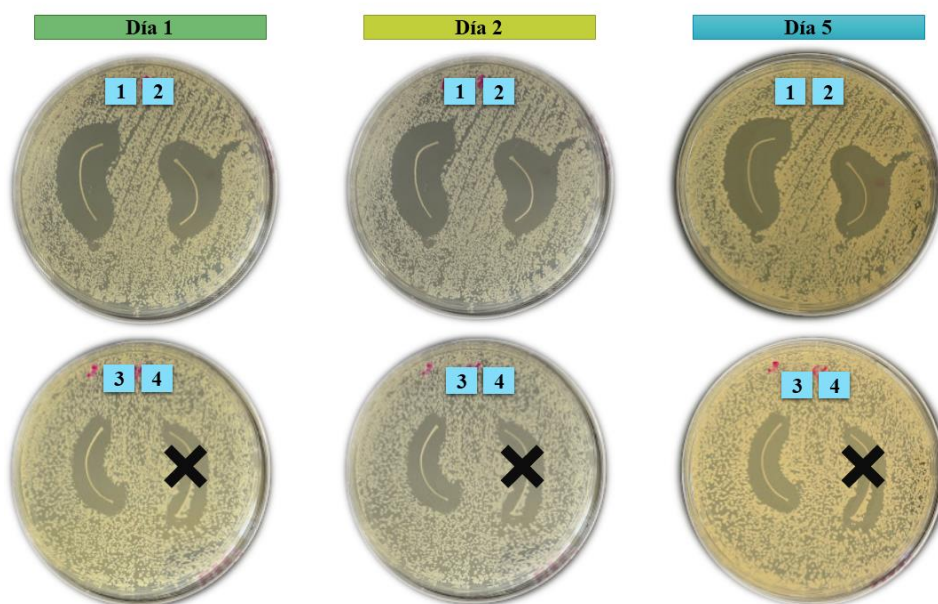


Figura 68. Halo de inhibición de las suturas cargadas, a los días 1, 3 y 5, en SARM. (Diseño propio).

En la **tabla 16**, se muestran los diámetros de cada uno de los halos de inhibición de las suturas sometidas a estudio con SARM. La sutura patrón es la que presenta mayor inhibición desde el primer día, pero como se mencionó anteriormente, se comenzó a observar crecimiento de colonias dentro del halo a través de los días, generando disminución del halo de inhibición e indicándonos que la bacteria se ha vuelto tolerante a triclosán. Por su parte, las suturas cargadas, mostraron en promedio halos de inhibición de 15.33 mm, siendo 17 mm el valor máximo y 12 mm el valor mínimo. Estos valores se mantuvieron desde el día uno hasta el día cinco, lo cual nos indica que, a diferencia de la sutura patrón, las suturas cargadas son capaces de inhibir SARM sin crear tolerancia, durante varios días.

Tabla 16. Diámetro de los halos de inhibición de suturas en cultivo con SARM. (Diseño propio).

Sutura	Día 1	Día 5
Blanco	0	0
Referencia	34	33
Cargada 1	17	17
Cargada 2	17	17
Cargada 3	12	12
Cargada 4	NA	NA
Poli(MAOB)	0	0
Clorhexidina	7	6

Finalmente, al analizar la sutura con nanopartículas de poli(MAOB), esta no mostró inhibición en SARM, desde el primer día de estudio. En cuanto a la sutura con clorhexidina, esta mostró un pequeño halo de inhibición de 7 mm que disminuyó a 6 mm, al cabo de los 5 días. El comparativo entre ambas suturas, se puede observar en la **figura 69**, del lado derecho se encuentra la sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y del lado izquierdo se encuentra la sutura con clorhexidina diacetato.

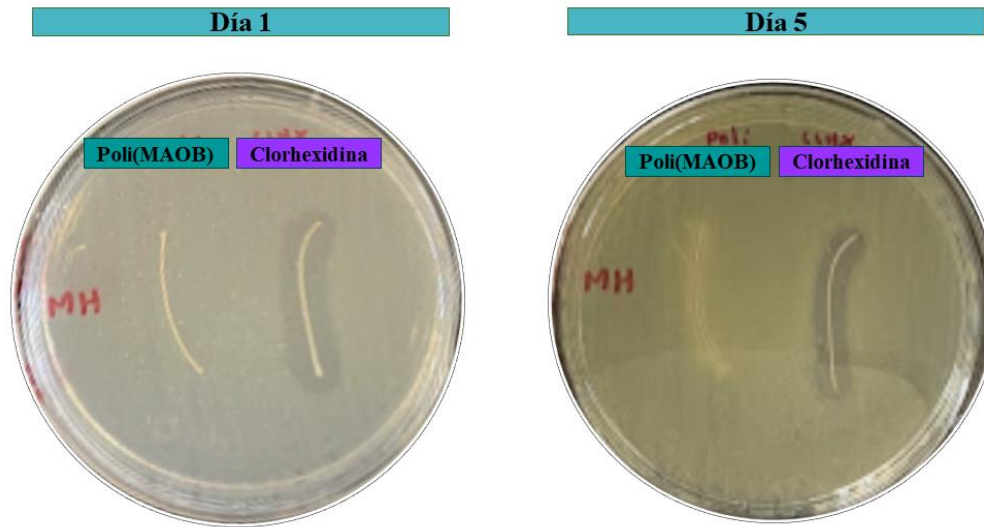


Figura 69. Halo de inhibición de sutura con nanopartículas de poli(MAOB) y sutura con clorhexidina diacetato, en SARM, días 1 y 5. (Diseño propio).

III.11.5 Comparativo entre suturas

Dados los resultados obtenidos a lo largo de los 5 días para cada una de las suturas probadas en las distintas bacterias, se realizaron dos gráficos, mostrados en la **figura 70 y 71**. Como se puede observar, la sutura patrón fue la que presentó los halos de inhibición con mayor diámetro, a diferencia del resto de las suturas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las 4 bacterias analizadas fueron creando tolerancia a dichas suturas conforme pasaban los días. Esto podría ser contraproducente al colocarlas en una herida, pues esta podría ser colonizada e infectada rápidamente.

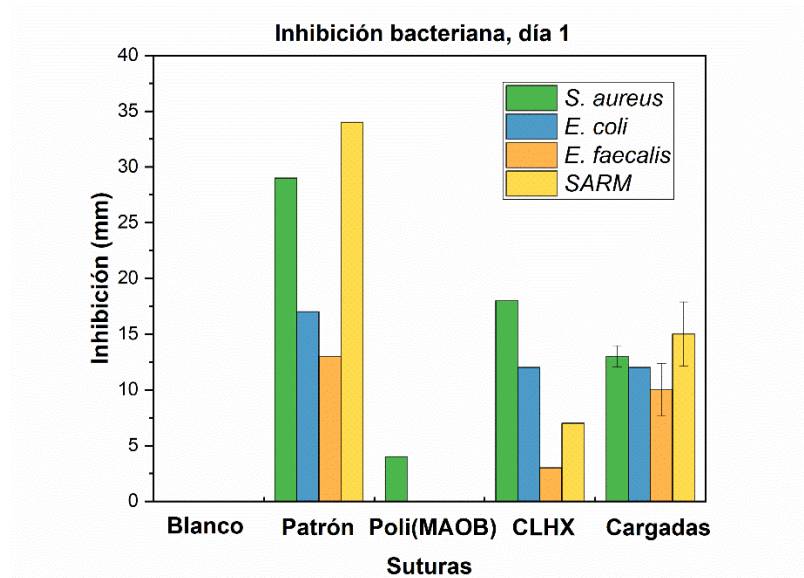


Figura 70. Gráfico comparativo de halos de inhibición entre las suturas estudiadas, al día 1.
(Diseño propio).

Por su parte, la sutura cargada solo con nanopartículas de poli(MAOB), solo mostró inhibición en *S. aureus* y esto fue solo por el primer día, pues poco a poco se colonizó la sutura, hasta quedar completamente cubierta de bacteria a los cinco días. En cuanto a la sutura cargada solo con clorhexidina, se logró observar que inhibió en cada una de las bacterias, desde el primer día. Lo cual nos indica que el poder antimicrobiano proviene del fármaco clorhexidina, en mayor medida y que el poli(MAOB) no presenta esta propiedad, por lo menos no en este sistema, pues se ha reportado con anterioridad que este cuenta con propiedades antimicrobianas gracias al ácido salicílico que se libera a partir de este profármaco polimérico.

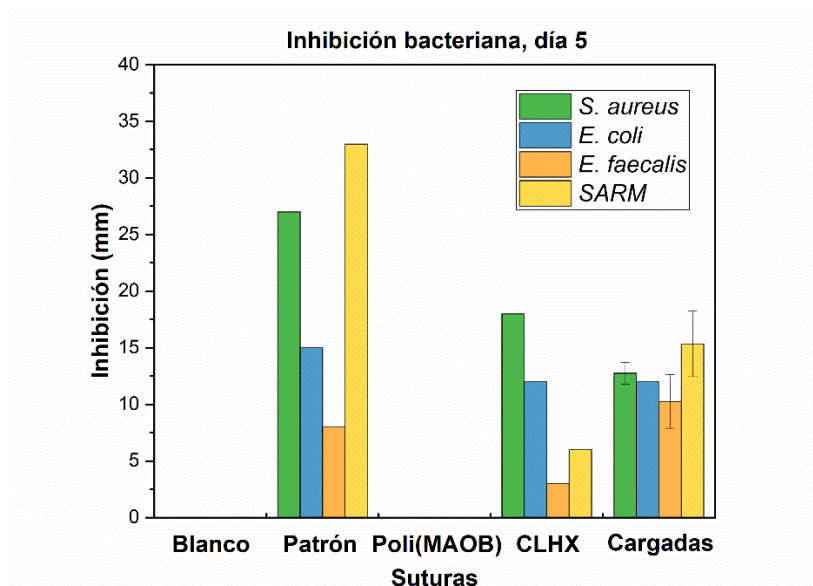


Figura 71. Gráfico comparativo de halos de inhibición entre las suturas estudiadas, al día 5.
(Diseño propio).

Finalmente, podemos constatar que las suturas con nanopartículas poliméricas de MAOB que contienen clorhexidina, son capaces de inhibir las cuatro bacterias analizadas, incluso SARM, (siendo este un microorganismo resistente) durante cinco días, sin crear tolerancia por parte de estas. Por lo tanto, al demostrar que nuestras suturas presentan inhibición bacteriana, podemos considerarla como una propuesta novedosa e interesante en el tratamiento profiláctico de heridas.

II.12 Evaluación de viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad de las líneas celulares de fibroblastos de ratón BALB-3t3, células de HeLa y células de cáncer de piel (melanoma), al ser estar en contacto con suturas cargadas. Esto para conocer si las suturas propuestas causaban toxicidad en dichas líneas.

Se utilizó el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el cual consiste en un cambio colorimétrico de amarillo a azul cuando existe viabilidad celular, pues nos indica si hay presencia de la enzima succinato deshidrogenasa, enzima presente en la mitocondria de las células. Cuando el reactivo MTT es reducido de manera metabólica por la acción de dicha enzima, el color amarillo cambiará a color azul (formazán).

En la **figura 72**, se muestra una caja de 96 pocillos que contiene las distintas células expuestas a las diferentes suturas estudiadas, las cuales ya fueron reveladas con MTT. Podemos observar

pocillos amarillos, indicando presencia de células muertas, y podemos observar pocillos morados, indicando células vivas.

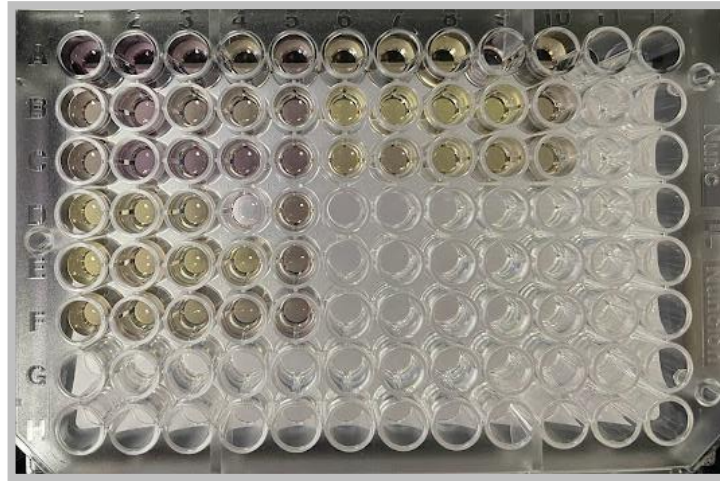


Figura 72. Placa de 96 pocillos con cultivo de células y elución de suturas. (Diseño propio).

Se obtuvo la absorbancia de cada uno de los pocillos de la placa, para posteriormente graficar los porcentajes de viabilidad celular y compararlos. En la **figura 73**, se muestra el gráfico obtenido y podemos observar que la sutura blanco presenta un mayor porcentaje de viabilidad en células de HeLa con un 96 %, seguido del 91 % en fibroblastos y 89 % en melanoma. En cuanto a la sutura comercial (patrón), ocurrió algo similar, pues hubo mayor porcentaje de viabilidad celular para las células de HeLa con un 97 %, seguido del 90 % para fibroblastos y 85 % para melanoma. Finalmente, podemos observar que las suturas cargadas muestran el mayor porcentaje de viabilidad celular para las tres líneas celulares, pues tiene el 99 % de viabilidad celular para células de HeLa, 96 % para fibroblastos y 90 % para células de melanoma.

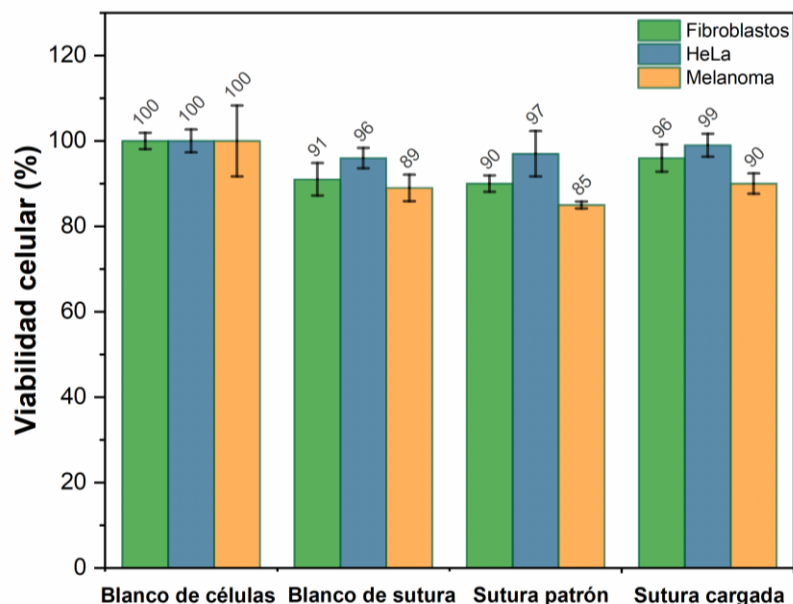


Figura 73. Gráfico comparativo del porcentaje de viabilidad celular. (Diseño propio).

Los resultados obtenidos, muestran que las suturas cargadas tienen un buen porcentaje de viabilidad celular, es decir, no son tóxicas para las células. Además, al comparar la sutura cargada con la sutura blanco, podemos ver que incluso es mayor el porcentaje de viabilidad celular en la sutura cargada propuesta, indicándonos que podría mejorarse el crecimiento de células al utilizarlas. Por ejemplo, en el caso de los fibroblastos, estas células componen el tejido conectivo que se encuentra en la piel y son capaces de secretar colágeno. Si se induce a la prevalencia de estas células, se podría generar un impacto positivo en la piel, sobre todo cuando se está en presencia de heridas, por lo tanto, las suturas propuestas podrían mejorar el proceso de curación y cierre de heridas.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

Como conclusiones a este proyecto, se logró obtener un sistema nanométrico y polimérico capaz de acarrear un fármaco antimicrobiano, como lo es clorhexidina. Este sistema al someterse a estímulos (pH y temperatura), libera el fármaco al medio circundante y produce el efecto deseado.

Se realizó la caracterización de los componentes de este sistema, empezando por el monómero de MAOB, su forma en sal y al ser polimerizado. También se caracterizó el sistema cuando el antimicrobiano fue cargado. Todo esto para asegurar la correcta síntesis y obtención de los productos esperados. Dichos estudios se realizaron por medio de técnicas analíticas como espectrofotometría infrarroja, cromatografía de líquidos de alta resolución y resonancia magnética nuclear.

Se logró corroborar por medio de estudios de hidrólisis-liberación, la liberación tanto de ácido salicílico, como de clorhexidina, a partir del sistema incorporado a suturas quirúrgicas, esto con la ayuda de CLAR, pues se identificaron ambos fármacos en los cromatogramas obtenidos. Además, se pudo obtener un estimado de la cantidad liberada de cada uno de los fármacos, siendo cantidades muy pequeñas, pero que en estudios biológicos in vitro demostraron una acción eficaz.

La sutura quirúrgica que se encontraba recubierta con el sistema propuesto, fue sometida a estudios de fuerza tensil, obteniendo que la sutura diseñada requiere una fuerza de 91 N para romperse, siendo esta fuerza similar a la requerida en una sutura sin recubrir (89 N), lo cual nos indica que esta propiedad no se ve modificada en gran manera al recubrir la sutura. También, a partir de este estudio, se determinó el módulo de Young, arrojándonos que la sutura diseñada redujo su elasticidad casi a la mitad, por lo cual podemos decir que esta si se ve modificada después de ser recubierta y sería necesario hacer pruebas para saber si esto es una limitante al momento de realizar la suturación de una herida.

Se confirmó, por medio de pruebas antimicrobianas, que el sistema al ser colocado en un dispositivo médico, como lo es una sutura quirúrgica, se le pueden conferir propiedades antimicrobianas útiles en el tratamiento de infecciones de sitio quirúrgico. Pues obtuvimos que en *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y SARM, la sutura es capaz de inhibir sin generar tolerancia a lo largo de cinco días, siendo clorhexidina la mayor responsable de que esto suceda, aunque se propone que los resultados obtenidos se deben al sistema diseñado, pues se sabe que los sistemas

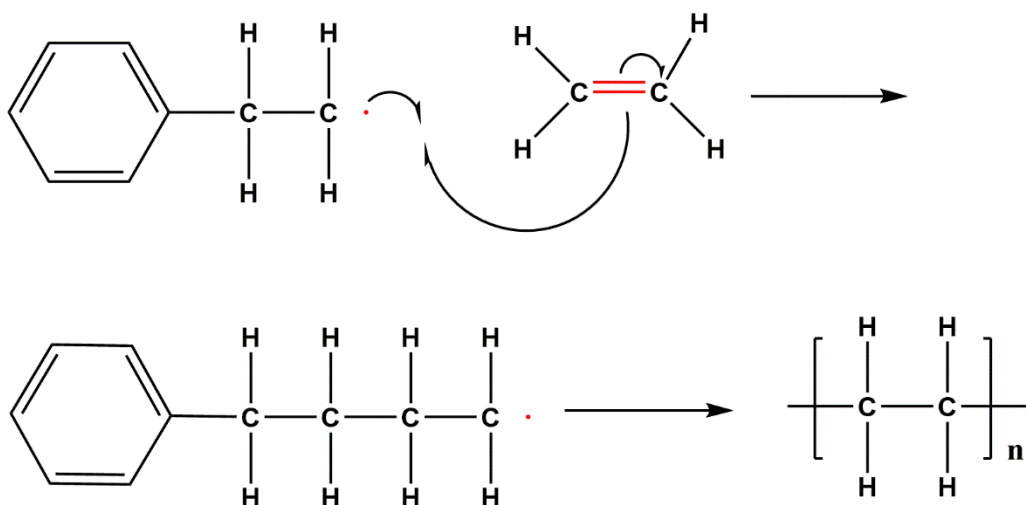
nanométricos y poliméricos tienen un papel fundamental al momento de inhibir bacterias, pues gracias a sus características pueden evitar los mecanismos de resistencia y causar la muerte segura de estos microorganismos. Esta podría ser una propuesta importante, pues actualmente se atraviesa por momentos difíciles en cuanto a resistencia bacteriana hablamos, pues cada vez es más complicado tratar infecciones con los antibióticos convencionales.

Finalmente, se logró demostrar que las suturas recubiertas con el sistema propuesto, no son citotóxicas para las células de HeLa, fibroblastos de ratón BALB 3T3, ni para células de melanoma. Esto nos indica, de manera preliminar, que las suturas no causan la muerte celular y que posiblemente puedan ayudar en la regeneración de tejido. Para conocer más a fondo la seguridad de dichas suturas, se requieren estudios in vivo que puedan confirmar o complementar los resultados obtenidos en las pruebas in vitro.

Todos los resultados obtenidos en este proyecto, nos ayudaron a constatar que se puede diseñar un sistema polimérico y nanométrico acarreador de fármaco a partir del monómero de MAOB, dicho sistema se puede implementar en hilos de sutura para el posible tratamiento profiláctico de infección en heridas. Esta propuesta puede ser una alternativa novedosa ante aquellas suturas comerciales diseñadas con triclosán capaces de causar tolerancia, debido a su uso indiscriminado actualmente.

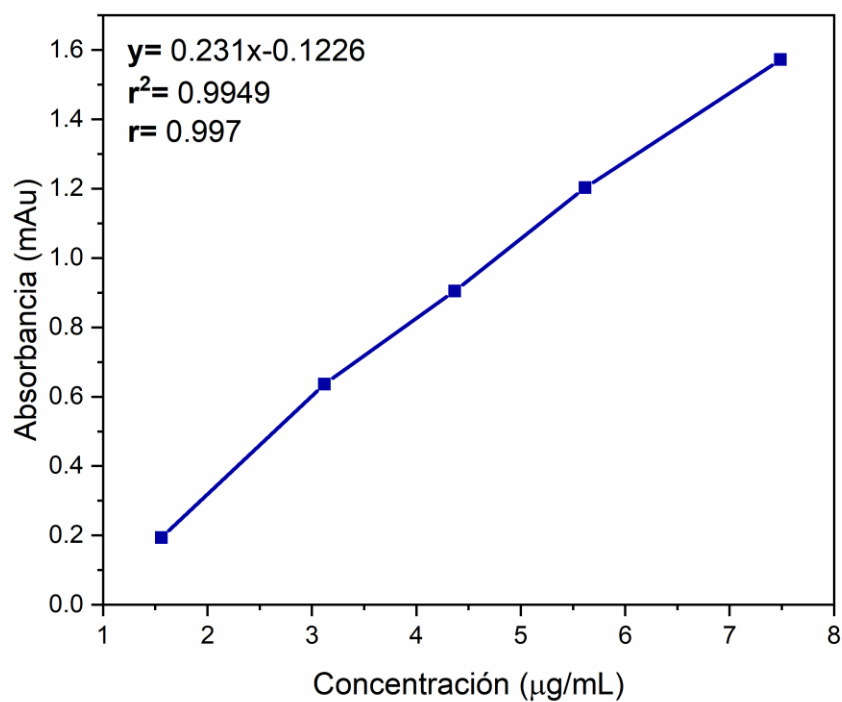
CAPÍTULO V. ANEXOS

Anexo 1. Polimerización vinílica vía radicales libres.

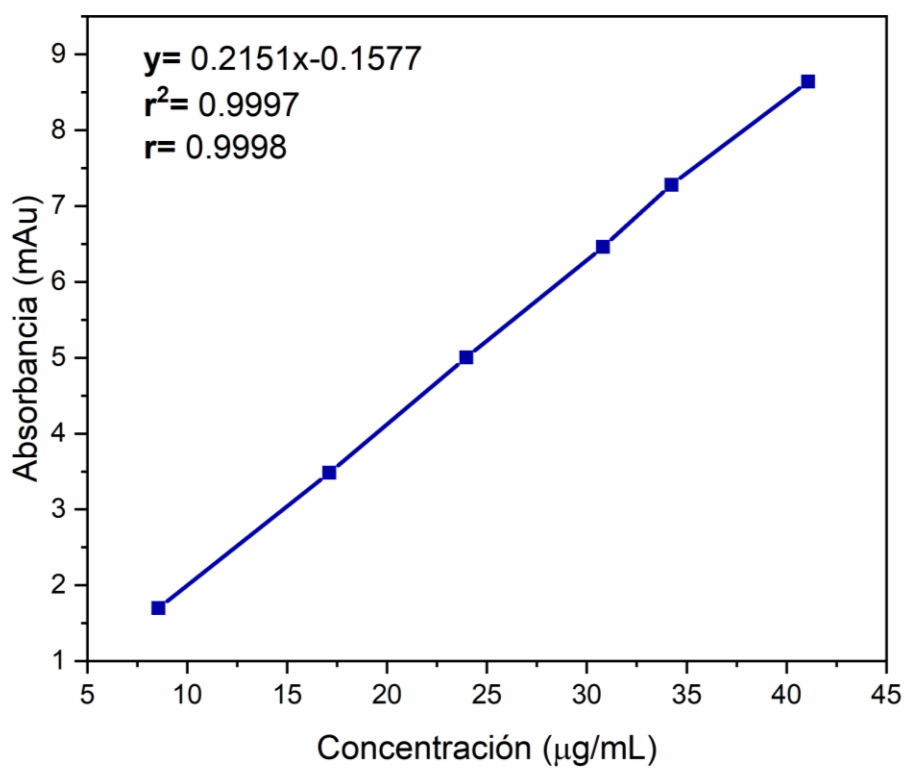


Anexo 2. Recta de calibración para la cuantificación de clorhexidina por CLAR a 232 nm.

(Diseño propio).



Anexo 3. Recta de calibración para la cuantificación de ácido salicílico por CLAR a 232 nm.
(Diseño propio).



CAPÍTULO VI. REFERENCIAS

- [1] Cerda, J; Torres R; Valdéz J; Escudero Á; Guzmán R; Galindo A. (2014). Prevención y manejo de infección de heridas quirúrgicas, (pp. 6-7) de Asociación de Cirugía General A.C. Sitio web: https://amcg.org.mx/images/guiasclinicas/infecciones_de_heridas_quirurgicas_infectadas.pdf
- [2] Secretaría de salud. (2011). Informe documental en extenso: Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud (pp. 3-4).
- [3] World Health Organization. (2016). Global guidelines for the prevention of surgical site infection World Health Organization. Sitio web: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250680/9789241549882-eng.pdf?sequence=8>
- [4] Magill, S. (Marzo, 2014). Multistate point- prevalence survey of health care-associated infections. The new England Journal of Medicine. Vol. 370:1198-1208.
- [5] Zarate, G; Fuentes, R. Manual de heridas y suturas: Materiales de suturas, pp 59-66.
- [6] Granados, J; Valderrama, I. (Enero – diciembre 2015). Comparación entre sutura recubierta con antibacterial versus cierre tradicional en la incidencia de complicaciones en apendicentomías y colecistectomías laparoscópicas. Cirugía endoscópica, medigraphic. Vol. 16, No. 1-4. 31-36.
- [7] Obermeier, A. (Julio 2014). Novel high efficient coatings for antimicrobial surgical sutures using chlorhexidine in fatty acid slow - release carrier systems. PLoS One. 9(7):e101426. Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24983633>
- [8] Hermida, É. (2011). Guía didáctica: polímeros, capítulo 9 (pp. 14-15). Buenos Aires: INET.
- [9] Young, R; (2011). Lovell, P. Introduction to polymers (pp. 4). New York: CRS Press.
- [10] Rifé, M. (2007). Síntesis de copolímeros a partir de glicolida y poli(p-dioxanona). Univeridad politécnica de Catalunya Barcelonatech.
- [11] Moffat, C; Soldevilla, J. (2005, Septiembre). Identificación de los criterios de infección en heridas (pp. 1-2). Londres: Medical Education Partnership Ltd.

- [12] Bennett, S. (2016). La OMS recomienda 29 formas de detener las infecciones quirúrgicas y evitar microorganismos multirresistentes. Organización Mundial de la Salud. Sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/detail/03-11-2016-who-recommends-29-ways-to-stop-surgical-infections-and-avoid-superbugs>
- [13] Calsina, G; Serrano, J. (2005, Julio – Agosto). ¿Existen realmente diferencias clínicas entre las distintas concentraciones de clorhexidina? Comparación de colutorios. RCOE, Vol. 10, No. 4, 457-463.
- [14] Kumar, B; Jalodia, K; Kumar, P; Gautam, HK. (2017). Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. Journal of Drug Delivery Science and Technology. Vol 41. 260-8.
- [15] Magaña, H. et al. Polymeric prodrug-functionalized polypropylene films for sustained release of salicylic acid. Int J Pharm. (2016). 511(1), pp. 579-585.
- [16] Licea, A; Rogel, E; López, J; Castillo, L; Cornejo, J; Arndt, K. (2003). A facile synthesis route for carboxyaryl-methacrylates: A way to obtain aromatic polyelectrolytes. Designed monomers and polymers. Vol 6, Issue, pp 67-80.
- [17] Shun, Lu et al. Salicylic acid sensitizes cervical cancer cells to radiotherapy by activating AMPK/TSC2/mTOR pathway. (2022). Radiation Medicine and Protection 3, 9-15.
- [18] Ramírez, M. (2010). Los sistemas de liberación modificada de fármacos. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. N°. 29.
- [19] USP 30, 2007. The United States Pharmacopoeia, 30 ed., U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, MD.
- [20] Laza, D; Gómez, M; Ramos, D. (2001). Desarrollo de tecnologías de avanzada para la producción de fármacos. Análisis informático. Rev. Cubana Farm. 35, 181-186.
- [21] Sáez, V; Hernáez, E; Sanz, L. (2004). Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales poliméricos. Revista Iberoamericana de Polímeros 5, 55-70.
- [22] Collett, J; Moreton, C. Modified-release peroral dosage forms. Pharmaceutics, the science of dosage form design. Aulton, M.E. Ed.; Churchill Livingstone Elsevier Science Limited. España.2002; Pág. 290-305.

- [23] Varma, M; Kaushal, A; Garg, A; Garg, S. (2004). Factors affecting mechanism and kinetics of drug release from matrix-based oral controlled drug delivery systems. *Am. J. Drug Delivery*, 2, 43-57.
- [24] Berrozpe, J; Ferrer E. Preparados orales de cesión modificada: cinética. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Vol. II: Biofarmacia. Berrozpe, J.D., Martínez Lanao, J., Plá Delfina, J.M., Ed.; Editorial Sintesis S.A.: Madrid, 1997; Pág 317-347.
- [25] Harris, M; Ghebre-Sellassie, I. Aqueous polymeric coating for modified release oral dosage form. *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*, 2da ed.; McGinity, J.W. Ed.; Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, 1997; Pág. 81-100.
- [26] Chang, R; Robinson, J. Sustained drug release from tablets and particles through coating. *Pharmaceutical dosage forms. Tablets*. Vol. 3, 2da ed. Lieberman, H.A., Lachman, L. y Schwatz, J.B. Eds.; Marcel Dekker, Inc.: Nueva York., 1990; Pág. 199-302.
- [27] Ansel, H; Allen, L; Popovich, N. Solid oral Modified-Release Dosage forms and drug delivery systems. *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 9na ed. Lippincott Williams & Wilkins: USA, 2005; Pág. 257-271.
- [28] Zerquera, H; Pérez, G; Díaz, I; Delgado, S; Armas, R. (2000). Resinas de intercambio iónico para prolongar la liberación de los fármacos. *Rev. Cubana Farm.* 34, 196-206.
- [29] Sur, S; Rathore, A; Dave; V; Reddy, KR. (Octubre, 2019). Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *ELSEVIER*. Vol. 20, 100397. Sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352507X19303191>
- [30] Jong, W; Borm, P. (Junio, 2008). Drug deliver nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 3, No. 2: 133-49.
- [31] Lee, B; Yun, Y; Park, K. (Marzo, 2015). Smart nanoparticles for drug delivery: boundaries and opportunities. *Chemical Engineering Science*. Vol. 125. 158-164.
- [32] Fonseca, J; Loureiro, J; Tanqueiro, S; Mouro, F; Ruivo, P; Carvalho, T; Sebastiao, A; Diógenes, M; Pereira, M. (2020). In vivo bio-distribution and toxicity evaluation of polymeric and lipid-based nanoparticles: a potential approach for chronic diseases treatment. *International journal of nanomedicine*. Vol. 15, pp, 8609-8621.

- [33] Stanistic, D; Costa, A; Cruz, G; Durán, N. (2018). Aplicaciones of flavonoids, with an emphasis on hesperidin, as anticancer prodrugs: phytotherapy as an alternative to chemotherapy. Elsevier, Vol. 58, pág. 162-212.
- [34] Sharma, M. (2019). Chapter 18: Tranadermal and intravenous nano drug delivery systems. Applications of targeted nano drugs and delivery systems. Elsevier, pages 499-550.
- [35] Namitha, K; Rashmi, R; Anjali, V; Sandesh, G; Renjith, P. Recent developments in stimuli-responsive polymer nanogels for drug delivery and diagnostics: a review. Elsevier, biopharmaceutics, vol. 157, December 2020, pp 121-153.
- [36] Escalona, O; Quintanar, D. (2014). Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 45 (3).
- [37] Cano, A; Ettcheto, M; Espina, M; López, A; Cajal, Y; Rabanal, F; Sánchez, E; Camins, A; García, M; Souto, E. (2020). State-of-the-art polymeric nanoparticles as promising therapeutic tools against human bacterial infections. *Journal of nanobiotechnology*. Vol. 18 (1), pp. 156.
- [38] Gao W, Chen Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;127:46–57.
- [39] Mowery, B; Lee, S; Kissounko, D; Epand, R; Epand, R; Weisblum, B; Stahl, S; Gellman, S. Mimicry of antimicrobial host-defense peptides by random copolymers. *Journal of American Chemical Society*. 2007; 129:15474–6.
- [40] Judzewitsch, P; Nguyen, T; Shanmugam, S; Wong, E; Boyer, C. Towards sequence controlled antimicrobial polymers: effect of polymer block order on antimicrobial activity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2018; 130(17):4649–54.
- [41] Zielinska, A; Carreiro, F; Olivero, A; Pires, B; Venkatesh, N; Durazzo, A; Lucarini, M; Eder, P; Silva, A; Santini, A; Souto, E. (2020) Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Journal of nanobiotechnology*. 2020, Vol. 18 (1), pp. 156.
- [42] Cuadros, A; Casañas, R; San Martín, E. (2014). Dispersión de luz dinámica en determinación de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*. Vol. 8, No. 4.

- [43] Junwei, C; Shaomin, Y; Jiangtao, W; Shengshan, B. (2020). Determination of thermal and mutual diffusivity of n-heptane with dissolved carbon dioxide by dynamic light scattering. *Fluid Phase Equilibria*, Elsevier, Vol. 526, December 2020, 112804.
- [44] Lancheros, R; Beleño, J; Guerrero, C; Godoy, R. Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsion y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). (2014). Vol 19(2), pp. 161-168.
- [45] Bunaciu, A; Aboul, H; Fleschin, S. (2011). Recent Applications of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Herbal Medicine Analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 46: 4, 251-260.
- [46] Garrido, R; Vélez, H; Vérez, V. (2013). Resonancia magnética nuclear: nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas de polisacáridos. *VacciMonitor*, 22(1):35-42.
- [47] Suarez, D; Morales, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezcla. *Revista semilleros: formación investigativa*, vol. 4, enero-diciembre de 2018.
- [48] Gutiérrez, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter (U.P.C.)*, N°122.