

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**SUTURAS IMPLANTABLES CON SISTEMA DUAL PARA LA
PROFILAXIS ANTE PROCESOS INFLAMATORIOS E INFECCIOSOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

BRISA GUADALUPE HERNÁNDEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

OCTUBRE, 2021.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Folio No. 311
Tijuana, B.C., a 05 de octubre del 2021

C. Brisa Guadalupe Hernández Ramírez
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 los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema: "Suturas implantables como sistema dual para profilaxis
ante procesos inflamatorios e infecciosos", el cual deberá
usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. FUNDAMENTO TEÓRICO
- III. METODOLOGÍA
- IV. CARACTERIZACIÓN
- V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VI. CONCLUSIÓN
- VII. BIBLIOGRAFÍA
- VIII. ANEXOS



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICA E INGENIERÍA
CAMPUS TIJUANA

Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla
Director de Tesis

Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Sub-Directora

Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co-Director de Tesis

M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director Provisional

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías por realizar mi formación como profesional y ser un lugar donde sé que puedo contar para realizar plenamente mis deseos de seguir formándome y aprendiendo. A CONACYT por la beca que me permitió poder dedicarme a realizar este proyecto. Gracias a TJPLAST al Dr. Héctor Milla, al Dr. Saúl Castañeda y a la Q.F.B. Ana Karla Nava por el material de trabajo para poder realizar este proyecto que fue la base para realizar los experimentos.

Agradezco principalmente a el Dr. Héctor Alfonso Magaña, por darme la confianza de ser de sus primeros alumnos de posgrado sin tener un conocimiento previo a como yo era como alumna, creo que fue una moneda al aire, pero todo resultó ser mejor de lo esperado. Gracias por tenerme la confianza para realizar experimentos que no sabíamos si saldrían o no, y siempre animarme en los resultados buenos y no tan buenos, siempre viendo lo positivo, por siempre tratar de que los alumnos contáramos con todo el material posible para sacar el proyecto adelante y nos sintiéramos en un ambiente agradable. Y sobre todo gracias por no solo ser nuestro tutor, sino también una persona con la que sé que puedo contar.

Gracias a la Dra. Lilia Angelica Hurtado por abrir las puertas de su laboratorio para poder realizar parte muy importante del proyecto y no solo eso, si no darme la confianza de trabajar cuando lo necesitara, por compartir sus conocimientos y por los convivios que se realizaron y me invito, hizo más ameno el trabajar en microbiología y me sorprendió la gente que conocí ahí, sobre todo a Jonathan Vincent Lopez quien me ayudo en la parte práctica, me despejó

dudas y siempre estuvo dispuesto a enseñar. A la Dra. Kenia Palomino le agradezco la paciencia y el conocimiento que me brindó los últimos meses del posgrado, no esperaba que todo lo que me enseñó repercutiera tanto en mí que incluso me inspiró para intentar seguir por el área de trabajo de células. Tanto como la Dra. Lilia Angelica Hurtado como la Dra. Kenia Palomino son una inspiración de que las mujeres en la ciencia tienen propuestas novedosas e interesantes y pueden ser grandes investigadoras y por eso las admiro.

Gracias al Dr. José Manuel Cornejo por abrirme las puertas al laboratorio de Biofarmacia e incluso de su hogar, agradezco sus comentarios y retroalimentaciones con el proyecto ya que es una persona con una perspectiva diferente y siempre aportaba algo que ni siquiera consideraba. Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio ya que, aunque a mitad del posgrado tuvimos que dejar trabajar juntos por pandemia, el poco tiempo que tuvimos para convivir me fue suficiente para considerarlos amigos. Alondra, Paola, Ayla, Efraín gracias por recibirme en el laboratorio de la manera más amable y siempre estar disponibles para cualquier duda. A mis amigos Hebrón y Jocelyn les puedo decir que no solo me llevo de esta etapa un título, si no también dos grandes amigos con los que puedo contar, no esperaba esto y fue de lo más grato de la maestría.

Agradecimientos Personales

Agradezco a mi familia por siempre ser una inspiración para mejorar y seguir creciendo. Gracias Yiyi por siempre creer en que puedo hacer grandes cosas, a mi hermano por ser un buen amigo y compañero. Gracias a Luis porque sin usted no hubiera podido ni siquiera ser Q.F.B., y por todo lo demás que hizo por mi sin tener que hacerlo.

Agradezco a mis amigos Abraham, Irenia, Hogi y Daray por ser un escape del estrés que a veces me tocaba vivir en Tijuana y me demuestran lo que es una amistad verdadera. A mis amigos Eliseo, Maria, Israel, Amalia, Zulahi, Rubí por ser excelentes amigos, no esperaba que después de la carrera siguiéramos siempre en contacto, han sido un gran apoyo para mí ya que son las personas más cercanas a una familia que tengo en Tijuana. A Samuel por ser un gran amigo y que ha sido mi principal compañía, gracias por incluso apoyarme en experimentos, y escucharme siempre, aunque no quisieras sobre mi tesis. Gracias a todos por todo.

Contenido

Lista de Tablas.....	8
Lista de Ilustraciones.....	9
Lista de Imágenes.....	9
Lista de Figuras.....	9
Lista de Gráficos.....	10
Capítulo 1. Introducción.....	12
1.1. Objetivo General.....	15
1.2. Objetivos Específicos	15
1.3. Hipótesis.....	17
1.4. Justificación	17
Capítulo 2. Fundamento Teórico.....	18
2.1. Polímeros.....	18
2.2. Suturas- Vicryl (Poliglactina 910)	19
2.3. Suturas Para El Suministro De Fármacos	21
2.4. Dexametasona	23
2.5. Clorhexidina	26
2.6. Problemas Relacionados Con Dispositivos Médicos.....	27
2.7. Espectrofotometría UV-Visible	28
2.8. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	32
2.9. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	35
2.10. Fuerza Tensil.....	38
2.11. Eficacia Antibacteriana de Suturas Recubiertas Vía Zonas de Inhibición.....	40
2.12. Ensayo de Viabilidad Celular 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- Bromuro de Difeniltetrazolio (MTT).....	43
Capítulo 3. Metodología.....	46
3.1. Solución De Recubrimiento Clorhexidina Y Acetato De Dexametasona Usando Como Acarreador Ácido Láurico	46
3.1.1 Cargado De Sutura Vicryl Con Solución De Recubrimiento	46
3.2. Preparación De Medio Fisiológico Simulado Para Análisis De Liberación PBS pH 7.4.....	47

3.3. Determinación De Longitud De Onda Máxima De Los Fármacos A Cuantificar	47
3.4. Cuantificación De Diacetato De Clorhexidina Y Acetato De Dexametasona En CLAR	48
3.4.1 Solución Estándar De Diacetato De Clorhexidina Para Recta De Calibración ...	48
3.4.1 Solución Estándar De Acetato De Dexametasona Para Recta De Calibración ...	48
3.4.2 Fase Móvil Para Diacetato De Clorhexidina	49
3.4.3 Fase Móvil Para Acetato De Dexametasona	49
3.4.4 Recta de calibración para diacetato de clorhexidina	49
3.4.5 Recta De Calibración Para Acetato De Dexametasona.....	50
3.4.6 Liberación Simultánea De Diacetato De Clorhexidina Y Acetato De Dexametasona Para Cuantificación En CLAR.....	51
3.4.7 Integración De Áreas Bajo La Curva	51
Capítulo 4. Caracterización	53
4.1. Espectrómetro FTIR-ATR	53
4.2. Prueba De Fuerza Tensil	54
4.3. Estudio De Efecto Antimicrobiano En Suturas Modificadas Con Clorhexidina Y Dexametasona Comparada Con Sutura Vicryl Plus	55
4.3.1 Preparación Del Estándar De Turbidez 0.5 McFarland	55
4.3.2 Preparación De Cajas Petri Con Agar Mueller-Hinton.....	56
4.3.3 Preparación Del Inóculo	56
4.3.4 Inoculación En Placa	57
4.3.5 Colocación De Suturas En Placa Inoculada	57
4.3.6 Medición De Zona De Inhibición	58
4.4. Detección De Los Fármacos En Liberación De Suturas Mediante Cromatografía De Alta Resolución (CLAR)	58
4.5. Evaluación De Viabilidad Celular De Suturas Con Recubrimiento Y Sin Recubrimiento	60
4.5.1 Método Directo	60
4.5.2 Método Indirecto.....	61
Capítulo 5. Resultados y Discusión	62
5.1. Barridos Para Determinación De Longitud De Onda Máxima	62
5.2. Diacetato De Clorhexidina	64
5.3. Acetato De Dexametasona	66

5.4. Cuantificación por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	67
5.4.1 Cromatografía Para Sistema Dual.....	67
5.4.2 Cuantificación De Diacetato De Clorhexidina En CLAR	71
5.4.3 Cuantificación De Acetato De Dexametasona En CLAR	72
5.5. Espectrometría De Infrarrojo	74
5.6. Evaluación De Fuerza Tensil.....	79
5.7. Prueba De Sensibilidad Por Difusión En Disco	81
5.7.1 Comparación de zonas de inhibición de suturas con diferentes cargados contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	82
5.7.2 Sensibilidad De <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador	83
5.7.3 Sensibilidad De <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador	85
5.7.4 Sensibilidad De Meticiline Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador	87
5.7.1 Sensibilidad De <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador	89
5.7.2 Sensibilidad De <i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador	91
5.7.1 Sensibilidad De <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador	92
5.8. Evaluación De Viabilidad Celular.....	93
Capítulo 6. Conclusión.....	97
Capítulo 7. Bibliografía.....	99
Capítulo 8. Anexos	106
8.1. Anexo I Rectas De Calibración	106

Lista de Tablas

Tabla 1.1 Frecuencia y tipo de cirugía en Infección en el Sitio Quirúrgico (ISQ) en adultos, cirugía por categoría, 2015-2017 (Weiner-Lastinger et al. 2020).	14
Tabla 2.1 Fuerza tensil del nudo de la sutura	39
Tabla 2.2 Suplemento en línea del Informe de resistencia a los antimicrobianos (RA) para adultos 2015-2017: distribución de todos los patógenos reportados a NHSN, 2015-2017 .	41

Tabla 3.1 Recta de calibración clorhexidina.	50
Tabla 3.2 Recta de calibración para dexametasona.	51
Tabla 4.1 Soluciones stock para la cromatografía.	59
Tabla 4.2 Cargados de suturas para prueba de viabilidad celular método directo.....	60
Tabla 5.1 Concentración de dexametasona y ácido láurico en los experimentos.....	66
Tabla 5.2 Fuerza tensil de suturas.....	80
Tabla 5.3 Comparación de suturas con diferentes recubrimientos.	82
Tabla 5.4 Zonas de inhibición contra S. aureus.....	84
Tabla 5.5 Zonas de inhibición contra E. coli.....	85
Tabla 5.6 Zonas de inhibición de S. aureus MRSA.....	87
Tabla 5.7 Zonas de inhibición P. aeruginosa.....	89
Tabla 5.8 Zonas de inhibición E. faecalis.	91
Tabla 5.9 Zonas de inhibición C. albicans	92

Lista de Ilustraciones

Ilustración 4-1 Inoculo en tubo con solución salina.....	56
Ilustración 4-2 Sembrado por hiposado.....	57
Ilustración 4-3 Colocación de suturas en placa.....	58
Ilustración 4-4 Medición de zona de inhibición.....	58

Lista de Imágenes

Imagen 3.1 Oscilador con temperatura VWR Shel Lab.....	46
Imagen 3.2 Espectrofotómetro UV/Vis DU 520 Beckma Coulter	47
Imagen 4.1 FT-IR Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™5	53
Imagen 4.2 Analizador de textura Brookfield CT3	54
Imagen 4.3 Sutura entre pinzas del texturómetro.	54
Imagen 4.4 Estándar de turbidez 0.5 McFarland	55
Imagen 4.5 UltiMate™ 3000 HPLC	59
Imagen 5.1 Sutura sin recubrimiento y sutura después de dejarla por la noche en solución de diacetato de clorhexidina.	65
Imagen 5.2 Días de inhibición del 1al 4. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador.	85
Imagen 5.3 Días de inhibición del 1al 4. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador.	86
Imagen 5.4 Días de inhibición del 1al 4. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador.	88
Imagen 5.5 Días de inhibición del 1al 3. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador.	90
Imagen 5.6 Días de inhibición del 1al 2. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador (A). Dia 2 de duplicados de sistema dual (B).....	92
Imagen 5.7 Inhibición de suturas con sistema dual por triplicado (A, B) y sutura con triclosán (B) en parte derecha.....	93

Lista de Figuras

Figura 2.1 Estructuras básicas de los principales polímeros utilizados en biomedicina	19
Figura 2.2 Sutura Vicryl.....	21
Figura 2.3 Modelo de soporte polimérico para la distribución selectiva de fármacos.	22
Figura 2.4. Recubrimiento de sutura mediante inmersión.	22
Figura 2.5. Dexametasona.....	24
Figura 2.6 Diacetato de clorhexidina	26
Figura 2.7 Los rangos de espectro electrónico y sus límites	29
Figura 2.8 Terminologías en espectrofotometría UV	30
Figura 2.9 Tiempo de retención.....	33
Figura 2.10 Octadecilsilano (ODS empaque de columna) para cromatografía fase reversa	34
Figura 2.11 Ejemplo de vector eléctrico de una onda de luz	36
Figura 2.12 Espectro infrarrojo de poliestireno.....	36
Figura 2.13 Espectro infrarrojo de poliestireno graficado en porcentaje de transmitancia (%T)	37
Figura 2.14 Reflexión de luz en cristal creando onda evanescente	38
Figura 2.15 Diagrama del tiro por encima de la sutura y su modo de falla bajo carga de tracción	39
Figura 2.16 Estructura de los anillos de tetrazol característicos de las sales de tetrazolio.	43
Figura 2.17 Reducción de bromuro de MTT a su formazán.	44

Lista de Gráficos

Gráfico 5.1 Barrido dicetato de clorhexidina	62
Gráfico 5.2 Barrido acetato de dexametasona.....	63
Gráfico 5.3 Barrido ácido láurico	63
Gráfico 5.4 Liberaciones de diacetato de clorhexidina con ácido láurico.....	64
Gráfico 5.5 Dexametasona con acarreador y sin acarreador a diferentes concentraciones.	67
Gráfico 5.6 Cromatograma de solución estándar de acetato de dexametasona (20 µg/ ml)	69
Gráfico 5.7 Cromatograma de solución estándar de diacetato de clorhexidina (100 µg/ml)	70
Gráfico 5.8 Cromatograma del blanco (PBS pH 7.4).	70
Gráfico 5.9. Liberación de sistema dual.	70
Gráfico 5.10 Cromatograma de recta de calibración 30 µg(A) comparado con la liberación de diacetato de clorhexidina en sistema dual concentrado (B).....	71
Gráfico 5.11 Cromatograma de recta de calibración 15 µg/ ml (A) comparado con la liberación de acetato de dexametasona en sistema dual concentrado (B).....	73
Gráfico 5.12 Espectro de infrarrojo sutura Vicryl	74
Gráfico 5.13 Espectro de infrarrojo ácido láurico.	75
Gráfico 5.14 Espectro de infrarrojo de diacetato de clorhexidina.	77
Gráfico 5.15 Espectro de infrarrojo de acetato de dexametasona.....	78
Gráfico 5.16 Comparación de infrarrojos de los fármacos y sistema dual.....	79
Gráfico 5.17 Fuerza tensil comparativa entre sutura blanco y sutura con sistema dual.	81
Gráfico 5.18 Inhibición de suturas contra S. aureus.	84

Gráfico 5.19 Inhibición de suturas contra E. coli.	86
Gráfico 5.20 Inhibición de suturas contra MRSA.	88
Gráfico 5.21 Inhibición de suturas contra P. aeruginosa.	90
Gráfico 5.22 Inhibición de suturas contra E. faecalis.	91
Gráfico 5.23 Actividad metabólica por método directo. El * por encima indica que las medias muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza comparadas con el control.	94
Gráfico 5.24 Actividad metabólica por método indirecto 100% de elución. El * por encima indica que las medias muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza comparadas con el control.	95
Gráfico 5.25 Actividad metabólica por método indirecto 50:50. El * por encima indica que la medias muestra diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza comparada con el control.	96

Resumen

La presente tesis de investigación tuvo como fin el desarrollo de un sistema de liberación con un antiinflamatorio y un antimicrobiano a partir de hilos de sutura; este proceso se llevó a cabo mediante el revestimiento de hilos de uso médico con clorhexidina (antibacterial) y dexametasona (antiinflamatorio) utilizando como acarreador un ácido graso. Posteriormente se realizó un proceso de caracterización para asegurar la modificación del material de uso médico, para continuar con estudios de liberación y cuantificación de fármacos, además de la evaluación de actividad antimicrobiana y la viabilidad celular.

Capítulo 1. Introducción

Las *infecciones de sitio quirúrgico* (ISQ) siguen siendo complicaciones que se pueden presentar después de una cirugía a pesar de la profilaxis antibiótica sistémica indicada como tratamiento postoperatorio debido a que los pacientes no siempre siguen la terapia de antibióticos como está indicada, al cuidado de la herida y el tipo de cirugía (ej. colón) entre otros factores. Los procedimientos quirúrgicos conllevan un riesgo de infección bacteriana con gran impacto a millones de pacientes que cada año se practican una cirugía.

La ruptura de la piel que funciona como barrera entre el medio interno y externo como protección contra agentes físico, químicos y sobre todo microbiológicos representa un riesgo potencial a infección quirúrgica. En los países de ingresos bajos y medianos, un 11% de los

pacientes operados sufren infecciones, en África, hasta un 20% de las mujeres sometidas a cesárea sufren infecciones de la herida que comprometen su salud y su capacidad para cuidar a los hijos. En los Estados Unidos de América contribuyen a que los pacientes pasen 400 000 días más en el hospital, con un costo adicional de US\$ 900 millones al año **(Kieny, 2016)** y como consecuencia adquirir mayor resistencia a microorganismos e incluso muerte.

El Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos reportó que 14% a 16% de las infecciones relacionadas a la atención de la salud se atribuyen a infecciones quirúrgicas contraídas por un paciente en su tratamiento en un hospital y que el paciente no tenía ni estaba incubando microorganismos al llegar al hospital **(Farrill et al. 2016)**.

En un resumen de reportes enviados al Centro de Control y Prevención a Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) sobre infecciones asociadas a la atención de la salud realizado en 2015-2017 se reportó la frecuencia con la que ocurrían las ISQ (Tabla 1.1) y se reportó que *Staphylococcus aureus* fue el patógeno más común en todos los tipos de cirugías **(Weiner-Lastinger et al. 2020)**.

La progresión de una infección quirúrgica también involucra múltiples factores entre los microorganismos y el hospedero como el tipo de herida, el tamaño y la profundidad, así como el estado de salud e inmunológico del paciente, la carga microbiana y el nivel combinado de virulencia expresado por los tipos de microorganismos involucrados anaerobios y aerobios **(Bowler, Duerden, and Armstrong 2001)**.

Tabla 1.1 Frecuencia y tipo de cirugía en Infección en el Sitio Quirúrgico (ISQ) en adultos, cirugía por categoría, 2015-2017 (Weiner-Lastinger et al. 2020).

Tipo específico de ISQ				
Categoría de cirugía	No. De patógenos (fila %)			Todas las ISQ No. De patógenos (Columna %)
	Incisión superficial	Profundidad de incisión	Órgano/Espacio	
Abdominal	25,120 (30.2)	9,637 (11.6)	48,540 (58.3)	83,297 (54.0)
Ortopédica	9,798 (27.1)	15,362 (42.5)	10,987 (30.4)	36,147 (23.5)
Obstétrica/Gine	10,851 (53.3)	2,616 (12.9)	6,878 (33.8)	20,345 (13.2)
Cardiaca	3,907 (45.2)	2,588 (29.9)	2,152 (24.9)	8,647 (5.6)
Vascular	1,003 (48.7)	873 (42.4)	182 (8.8)	2,058 (1.3)
Neurocirugía	245 (13.9)	398 (22.6)	1,118 (63.5)	1,761 (1.1)
Cirugía de seno	285 (29.9)	438 (46.0)	229 (24.1)	952 (0.6)
Riñón	223 (43.2)	50 (9.7)	243 (47.1)	516 (0.3)
Cuello	104 (32.6)	198 (62.1)	17 (5.3)	319 (0.2)
Cirugía de próstata	25 (27.5)	5 (5.5)	61 (67.0)	91 (0.1)
Total	51,561 (33.5)	32,165 (20.9)	70,407 (45.7)	154,133 (100.0)

Dentro de los parámetros fisiológicos de una respuesta inmune protectora contra agentes extraños, la inflamación es esencial para una inmunidad eficiente, que incluye la curación de los tejidos y el retorno a la homeostasis (Cekici et al. 2014). Es probable que el área inflamada sea dolorosa, ya que se liberan sustancias químicas que estimulan las terminaciones nerviosas, lo que hace que el área sea más sensible y es importante para que la inflamación termine la descontaminación de los microorganismos presentes en la herida, en caso de haber una infección presente puede generar una inflamación constante por las endotoxinas y la elevación de citocinas proinflamatorias lo que puede afectar la completa recuperación de la herida creando un estado crónico de inflamación y falla de la sanación de la herida (Guo and DiPietro 2010).

El dolor post operatorio es un problema que se presenta en más de un 80% en pacientes que se someten a cirugía y aproximadamente 75% de esos pacientes presentan dolor de moderado, severo a extremo. El dolor crónico posquirúrgico es la consecuencia de una inflamación continua o, mucho más comúnmente, una manifestación de dolor neuropático, como resultado de una lesión quirúrgica en los nervios periféricos principales. Evidencia sugiere que menos de la mitad de pacientes mencionados reportan un adecuado alivio del dolor lo que afecta su calidad de vida, función y completa recuperación (**Kehlet, Jensen, Woolf,2006**).

1.1. Objetivo General

Desarrollo de suturas recubiertas con clorhexidina y dexametasona por método de recubrimiento por inmersión realizando su caracterización y evaluación de actividad biológica.

1.2. Objetivos Específicos

1. Buscar condiciones para el cargado de suturas mediante el método de recubrimiento por inmersión con solución compuesta con acetato de dexametasona-diacetato de clorhexidina como los compuestos activos y ácido láurico funcionando como acarreador.

2. Estudiar el proceso de liberación de acetato de dexametasona y diacetato de clorhexidina con el acarreador *in vitro* en oscilador en PBS pH 7.4.
3. Cuantificar fármaco liberado por medio de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).
4. Caracterizar suturas por medio de espectrofotometría de infrarrojo (FTIR-ATR), con acarreador y sin él para comprobar la presencia de los fármacos y cambios en la estructura de la sutura.
5. Realizar pruebas fuerza tensil para evaluar cambios mecánicos en la sutura al ser tratada con una solución de recubrimiento.
6. Determinar de efecto inhibición bacteriana de la sutura recubierta con dexametasona y clorhexidina usando como referencia una sutura comercial recubierta con triclosán contra microorganismos Gram positivos y negativos.
7. Evaluar la viabilidad celular en fibroblastos NIH/3T3 de hilos recubiertos con el sistema dual y sin él.

1.3. Hipótesis

El desarrollo de una sutura recubierta con clorhexidina y dexametasona podría tener un efecto antiinflamatorio y antimicrobiano, para procedimientos médico-quirúrgicos.

1.4. Justificación

Debido a los graves procesos infecciosos e inflamatorios relacionados a la implantación de dispositivos médicos y que la sutura recubierta con triclosán (antibacterial) ya existente en el mercado ha demostrado resistencia antibiótica debido a su prevalencia en cosméticos y jabones así como se ha reportado que en su metabolización ocurre formación de productos secundarios tóxicos (por ejemplo, fenoles clorados, metil triclosán) (**Bedoux et al. 2012**), se propone otra alternativa con un antiséptico de amplio espectro y un antiinflamatorio que le dará el efecto dual: antibacterial (clorhexidina) y antiinflamatorio(dexametasona).

El efecto antiinflamatorio y antibacterial será localizado en la herida quirúrgica lo que hará al fármaco tener mayor biodisponibilidad omitiendo el efecto del primer paso. Además, la sutura es absorbible lo cual la hace más cómoda para el paciente y para el médico al no tener la necesidad de retirarla.

Los hilos de sutura tienen un papel destacado entre todos los demás dispositivos de cierre de heridas que representan un mercado que actualmente se estima en alrededor de 1.3 millones de dólares anuales (**Champeau et al. 2017**) por lo que el sistema dual propuesto tendría un amplio rango de aplicación.

Capítulo 2. Fundamento Teórico

2.1. Polímeros

De acuerdo con la IUPAC los polímeros son sustancias compuestas de macromoléculas que son moléculas muy grandes con pesos moleculares de miles a millones gramos/mol, cuya estructura comprende esencialmente la repetición múltiple de unidades derivadas de moléculas de baja masa molecular relativa (peso molecular) para formar una estructura tridimensional. Los polímeros pueden tener una extensa distribución en todos los sistemas biológicos, gracias a esto se le ha encontrado una amplia aplicación en medicina y existen polímeros usados comúnmente en el área de biomedicina (Figura 2.1). Algunos polímeros tienen la característica llamada “*shape memory*” que consiste en que el polímero puede deformarse y regresar a su forma original por un estímulo como pH, temperatura, campo magnético o luz. Así como también algunos pueden hidrolizarse una vez cumplido el objetivo como por ejemplo algunas suturas que cumplen la función de unir tejido, pero después de un lapso esta se degrada. En la biomedicina se ha encontrado aplicación a los polímeros como sistema de liberación de fármacos gracias a que se puede lograr una amplia gama de propiedades físicas y químicas basadas en las unidades monoméricas, la reacción de polimerización entre otras (Maitz 2015).

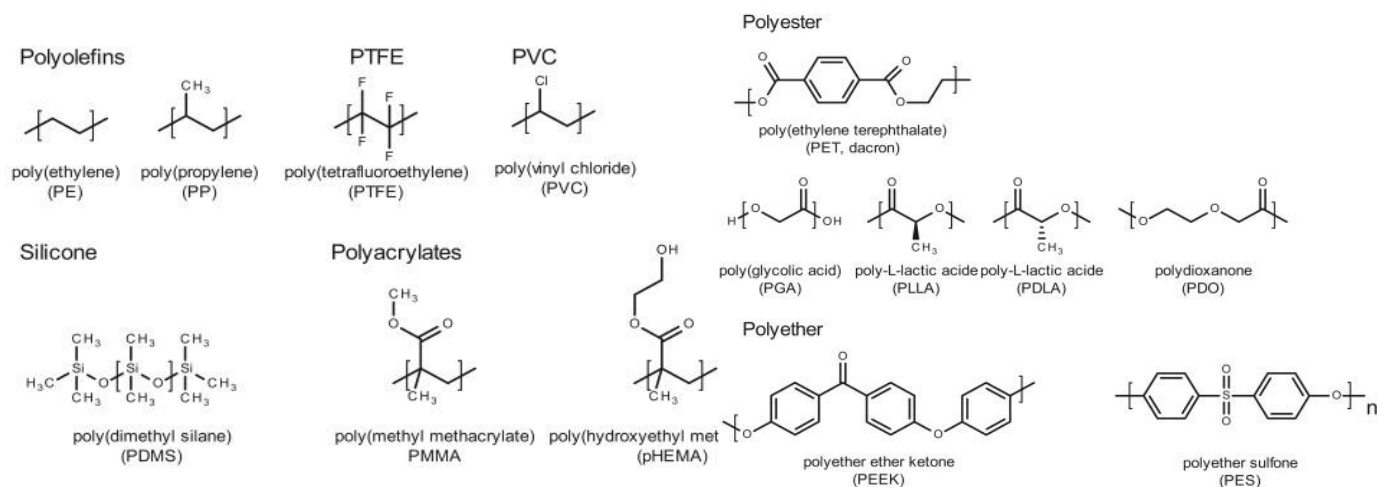


Figura 2.1 Estructuras básicas de los principales polímeros utilizados en biomedicina (Maitz MF. Et al., 2015).

2.2. Suturas- Vicryl (Poliglactina 910)

Sutura es la técnica y el material destinados a favorecer la cicatrización de una herida (quirúrgica o no) en la piel, órganos internos, vasos sanguíneos y demás tejidos manteniéndolos unidos de los bordes o extremidades de dicha herida disminuyendo la tensión entre ellos (**Caro Aragonés 2012**). Debido a su habilidad para cerrar heridas o inmovilizar prótesis, las suturas son usadas ampliamente en el área médica. Existen diferentes grupos de suturas:

- Clase I estéril: suturas adhesivas cutáneas.
- Clase II a estéril: adhesivos tisulares, grapadoras cutáneas,
- Clase II b: suturas no absorbibles
- Clase III: suturas absorbibles

Así como también se diferencian entre suturas manuales (ej. hilo y aguja) y mecánicas (ej. grapadoras). Hay una amplia variedad de tipos hilos de sutura convencionales (hilo y aguja) y se clasifican dependiendo su origen ya sea natural: animal (seda), vegetal

(lino), mineral (acero inoxidable) o de origen sintético (Vicryl) además basado en la constitución de sus fibras se clasifican como suturas de monofilamento y multifilamento (trenzadas). La sutura monofilamento es una sola hebra mientras que la multifilamento está compuesta por múltiples hebras trenzadas. La sutura multifilamento tiene mayor flexibilidad y fuerza tensil o resistencia a la tensión que es importante ya que se refiere a cantidad de fuerza que se debe ejercer en la hebra para romperla. Así como los espacios entre los trenzados puede proporcionarle a la sutura una mayor área para impregnar la sutura con el fármaco de interés **(Maitz 2015)**.

Sutura VICRYL (Figura 2.2) es una sutura quirúrgica estéril absorbible sintética multifilamento compuesto de un copolímero hecho de 90% de glicolida y 10% de L-lactida o también llamada Poliglactina 910. VICRYL ofrece un perfil predecible de retención de la resistencia de ruptura para proporcionar soporte durante 14 a 28 días mientras los tejidos sanan. Se absorbe completamente mediante hidrólisis entre los 56 y 70 días **(Ethicon Latin America, Spanish, n.d.)** lo cual le proporciona ventajas sobre suturas no absorbibles.

Las células polimorfonucleares y otros macrófagos digerirán el material de sutura después de que la sutura se haya degradado por hidrólisis. Se prefieren las suturas sintéticas porque la hidrólisis es un mecanismo más estable que la proteólisis que es otro mecanismo de degradación donde las suturas absorbibles naturales son digeridas por el organismo que ataca y así se degrada el hilo de sutura, por lo tanto, se prefiere la hidrólisis por que la absorción es más predecible y produce menos inflamación **(Rose and Tuma 2020)**.

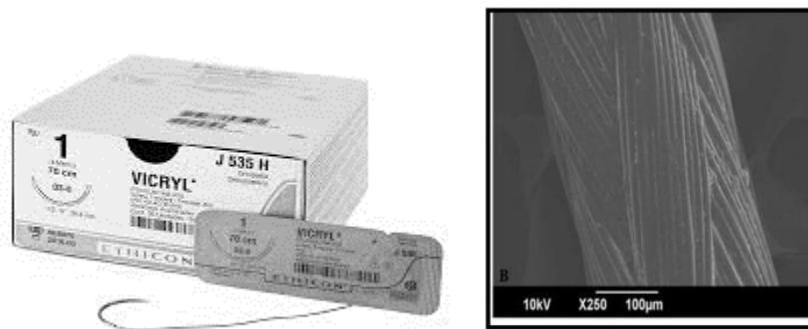


Figura 2.2 Sutura Vicryl (Kalarikkal N, et al., 2017).

2.3. Suturas Para El Suministro De Fármacos

Para reducir la inflamación y prevenir infecciones se administra generalmente vía oral o parenteral fármacos, lo que representa en algunos casos problemas para poder llegar al sitio específico de acción debido a la falta de especificidad además de su baja biodisponibilidad y que se requiere mayor concentración para poder realizar su efecto terapéutico lo que podría dar como consecuencia una *reacción adversa* que se define como “una respuesta a un medicamento que es nociva y no intencionado, y que se produce a dosis que normalmente se usan en el hombre” (Sevene 2003). Al dirigir el fármaco al sitio de acción que en este caso son heridas quirúrgicas se pueden limitar estos efectos y aumentar el efecto terapéutico.

Una alternativa es usando dispositivos modificados, que son un precursor inactivo de un fármaco que una vez administrado requiere una biotransformación metabólica (química o enzimática) para liberar el fármaco (agente biológicamente activo) (Vel 2014). Y con la intención de aumentar la selectividad de este fármaco al área de interés e incluso modular la liberación se diseñan alternativas como la modificación de un polímero uniéndolo a un fármaco (Figura 2.3) para mejorar la especificidad del fármaco hacia un tejido definido o

evitando así efectos secundarios debido a las altas concentraciones en plasma que pueden dañar otros tejidos.

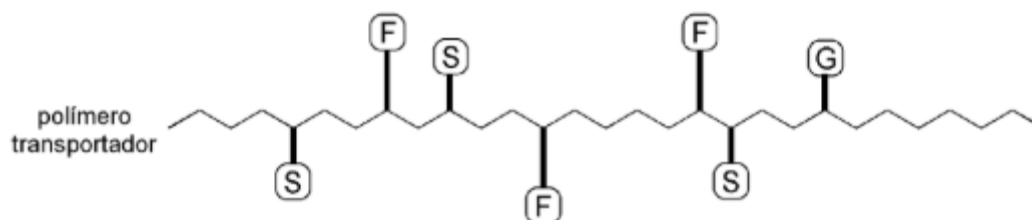


Figura 2.3 Modelo de soporte polimérico para la distribución selectiva de fármacos (Llombart M., et al., 2004).

El control de la distribución de un fármaco puede llevarse a cabo por la aplicación de técnicas biofísicas: en formas encapsuladas en liposomas y nanopartículas (nanoesferas y nanocápsulas) e implantes en los que el fármaco se une a un soporte polimérico que sirve de transportador o reserva (**Llombart M., Joglar, C., Delgado, T & Cirilo 2004**). Las técnicas para incorporar el fármaco a las suturas, reportadas ya en diferentes artículos son por medio de *electrospinning* (electrohilado), *melt spinning* (hilado en estado de fusión), injerto por radiación, así como el método de recubrimiento por inmersión (Figura 2.4).

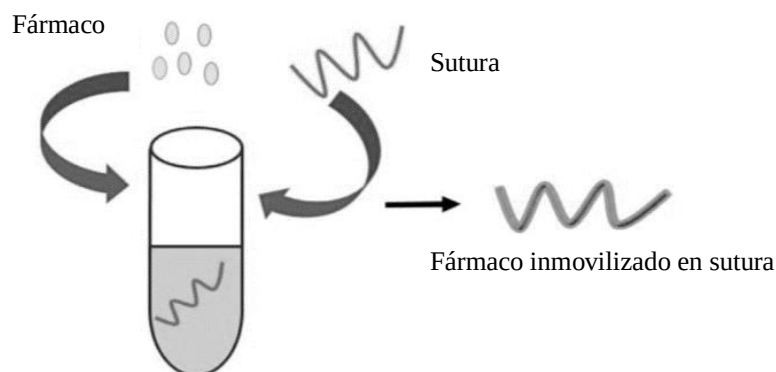


Figura 2.4. Recubrimiento de sutura mediante inmersión (Kalarikkal N. et al., 2017).

Para tener propiedades deseables como fuerza tensil para poder mantener tejidos unidos y la estabilidad del fármaco, moléculas bioactivas o agentes terapéuticos son comúnmente recubiertos en suturas por algunos de los métodos ya mencionados. El método de recubrimiento por inmersión es una técnica sencilla y es comúnmente usada para suturas antimicrobianas, un ejemplo de estas son las suturas Plus de ETHICON que son recubiertas con triclosán (**Kalarikkal et al. 2017**). El recubrimiento por inmersión consiste en que la sutura es inmersa en una solución con el fármaco o biomaterial (ej. nanopartículas) por un periodo de tiempo y después se deja secar.

Los ácidos grasos constituyen una película lubricante y son lo último en tecnología para reducir el efecto de costura no deseado de las suturas y se ha empleado como acarreador para el cargado de suturas con fármaco por el método de inmersión. Este tipo de sistema donde se utiliza un ácido graso como un acarreador de fármacos y de liberación permite propiedades de liberación lenta, debido a la baja solubilidad de los portadores de ácidos grasos en ambientes acuosos.

2.4. Dexametasona

Dexametasona, un corticosteroide sintético fluorado (Figura 2.5) de gran potencia con acciones y efectos de un glucocorticoide, una auténtica novedad en su momento, por la introducción de un halógeno en la estructura del anillo esteroideo, lo que le confiere propiedades fisicoquímicas; es más liposoluble, por lo tanto, aumenta su absorción y su

penetración en los tejidos, lo que invariablemente mejora su eficacia terapéutica **(Tecnoquímicas n.d.)**.

Los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de dexametasona son aproximadamente 30 veces más potentes que cortisol; es un agonista de glucocorticoides.

El mecanismo de acción no está completamente definido, pero se sugiere que dexametasona no unida a proteínas cruza las membranas celulares y se une con alta afinidad a receptores citoplásmicos glucocorticoides específicos. Este complejo se une a los elementos de ADN (elementos de respuesta a glucocorticoides), lo que resulta en una modificación de la transcripción y, por lo tanto, de la síntesis de proteínas para lograr la inhibición de la infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación, interferencia en la función de los mediadores de la respuesta inflamatoria, supresión de respuestas inmunes humorales y reducción de edema o tejido cicatricial. Se cree que las acciones antiinflamatorias de dexametasona involucran proteínas inhibidoras de fosfolipasa A2, lipocortinas, que controlan la biosíntesis de mediadores potentes de la inflamación, como las prostaglandinas y los leucotrienos **(Human Metabolome Database n.d.)**

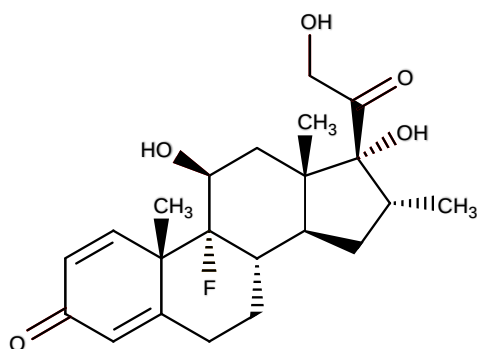


Figura 2.5. Dexametasona

Se han realizado estudios donde se compara la administración de dexametasona vía oral e intravenosa para disminuir el dolor e inflamación en pacientes después de una cesárea, se observó que se redujo el edema local y dolor de manera más significativa con la infiltración de dexametasona en la herida **(Maged et al. 2018)**.

Problemas asociados a la inflamación son la formación de cicatrices hipertróficas y queloides. Después de realizarse una cirugía factores inflamatorios son liberados y el proceso de granulación y la reparación del tejido se activa, si la inflamación es persistente se produce angiogénesis y después la formación de la cicatriz, si este proceso es lento entonces, la hiperplasia continua dará como resultado una cicatriz hipertrófica o queloide **(Shi, Zhu, and Yang 2017)**. Las cicatrices queloides se diferencian de las hipertróficas en que se extienden más allá de la herida original y rara vez remiten, mientras que las cicatrices hipertróficas se limitan al lugar de la herida y puede desaparecer con el tiempo **(Zaballos et al. 2001)**. Se ha demostrado que dexametasona puede ayudar a disminuir la formación de cicatrices queloides, se reportó un caso de un niño de 13 años con formación cicatriz queloide en el pene después de circuncisión a los 7 años. Se removió el tejido queloide con cirugía y el área se inyectó con dexametasona. Después de 3 años postoperatorios no se vio formación de cicatriz queloide de nuevo **(Alyami et al. 2019)**. Resultados analíticos demostraron que las inyecciones de esteroides suprimen la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el tejido queloide e inducen su regresión *in vivo* **(Wu et al. 2006)**.

2.5. Clorhexidina

Clorhexidina (CHX) (Figura 2.6) es un antiséptico catiónico de amplio espectro se ha usado como agente antimicrobial desde hace muchos años, se ha reportado que 86% al 92% de microbiota de la piel disminuye con lavarse las manos con clorhexidina (**Zhang et al. 2019**). Actúa a concentraciones bajas directamente en la superficie de la célula microbiana, destruye la integridad de la membrana celular y a concentraciones altas precipita el citoplasma que conduce a la muerte celular (**Keerthisinghe et al. 2019**). Debido a su amplio espectro antimicrobial contra bacterias, hongos y levaduras, clorhexidina es utilizada en diferentes desinfectantes, cepillos quirúrgicos, y en México se ha empleado como antiséptico con base en la NOM-045-SSA2-2005 Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.

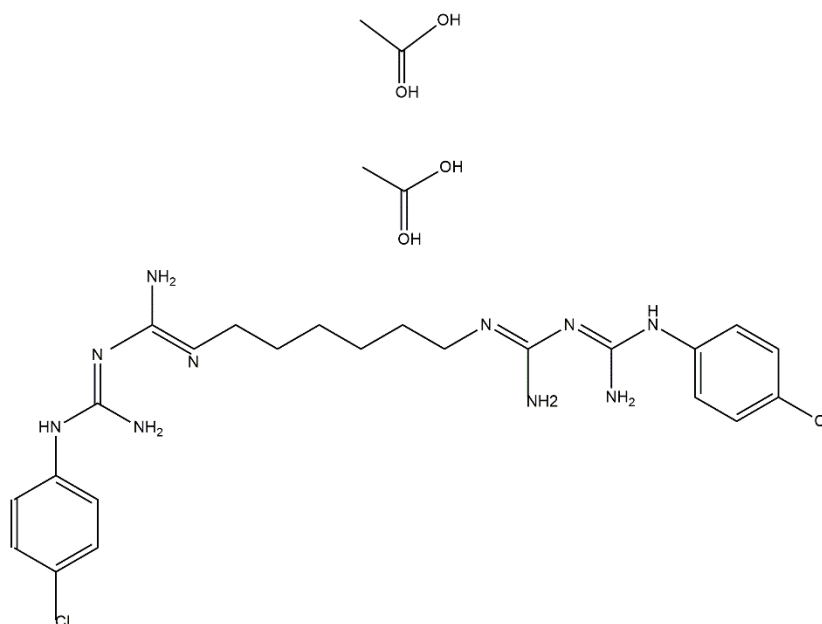


Figura 2.6 Diacetato de clorhexidina

Se ha evaluado la distribución de los genes de resistencia *qacA/B* y *qacC(smr)*, implicados en el desarrollo de resistencia a antisépticos catiónicos contra estafilococos aislados de pacientes con infección del torrente sanguíneo asociada a la línea central (CLABSI) donde no se detectó tendencia a incrementar la concentración mínima inhibitoria ni la concentración mínima bactericida de clorhexidina **(Jun et al. 2019)**.

También se realizó un estudio donde se utilizó clorhexidina como recubrimiento en apósitos de herida en cerdos inoculados con *Staphylococcus aureus* meticilina- resistente (MRSA) y se observó reducción de carga de MRSA por 3 días **(Mana et al. 2019)**.

2.6. Problemas Relacionados Con Dispositivos Médicos

A pesar de que los dispositivos médicos se diseñan para que sean biocompatibles y se les realicen pruebas de hemocompatibilidad, toxicidad entre otros, existen complicaciones asociadas a implantación de estos como sangrado, inflamación, infecciones, desarrollo de tejido de granulación y fibrosis. Se estima que en 2015 se publicaron alrededor de 9205 artículos referentes a la respuesta inmune en dispositivos médicos **(Osorio et al. 2017)**. Muchos dispositivos médicos están rodeados por un gran número de fagocitos como leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y monocitos. Al implantar el dispositivo, la sangre y el dispositivo interaccionan, uniéndose proteínas al dispositivo formando una matriz provisional alrededor del dispositivo, la herida en tejido vascularizado no solo inicia un proceso inflamatorio sino también la formación de trombos que envuelve la activación

extrínseca e intrínseca de la cascada de coagulación donde se ve envuelto el sistema fibrinolítico, el sistema generador de quinina y plaquetas (**Anderson 2008**).

Se ha demostrado que la inflamación causada por el dispositivo puede llevar a la degradación de este mismo, así como la disolución de tejido circundante (**Zhou et al. 2013**). Lo cual hace que el recubrimiento de dispositivos con fármacos pueda contribuir a resolver este tipo de problemas, ya que se puede recubrir con fármacos inmunosupresores como lo es la dexametasona.

2.7. Espectrofotometría UV-Visible

La espectrofotometría UV y Visible (VIS) ha sido una de las técnicas más populares por la disponibilidad del instrumento, la simplicidad del procedimiento, velocidad y precisión (**Sánchez Rojas and Bosch Ojeda 2009**). Involucra la medición de absorción de luz de la sustancia en la región de longitud de onda de 190 a 380 nm para absorción UV y de 380 a 900 nm para absorción de luz VIS (Figura 2.7). Los límites dados en la figura 7 no son fijos porque existen moléculas que exhiben absorción por debajo de 200 nm, aunque son poco comunes (**Perkampus 1992**).

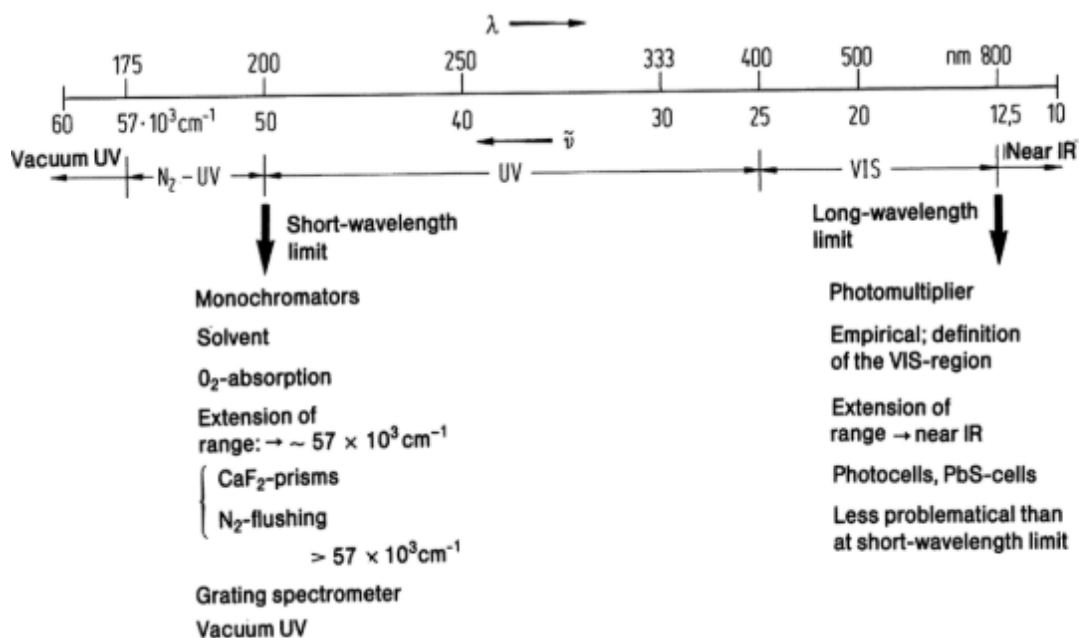


Figura 2.7 Los rangos de espectro electrónico y sus límites (Perkampus H. et al., 1992).

La absorción de luz en estas regiones surge de las transiciones electrónicas dentro de la molécula. La frecuencia de absorción depende de la diferencia de energía entre el estado basal o fundamental de un electrón y del estado excitado (nivel de energía más alto). La absorción de luz UV o VIS está acompañada también por transiciones vibracionales y rotacionales que resultan en una amplia banda característica de un espectro UV-VIS. Una molécula que contiene electrones en los orbitales σ , π , y n puede absorber energía luminosa y ser ascendidos del estado fundamental a estados de energía más altos (Figura 2.8) (Hayes and Kruger 2014).

Orbitales *antienlace* (σ^* y π^*) existen en el estado excitado para los electrones de enlace, y n electrones pueden estar asociados al estado fundamental con heteroátomos que no participan en enlaces, pero pueden absorber energía y pueden ser promovidos al orbital σ^* ó π^* . Las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ son las de mayor utilidad por que ocurren en un rango

útil (200-750 nm) del espectro UV-VIS; transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ requieren mayor energía y usualmente ocurren a longitudes de onda menores de 200 nm.

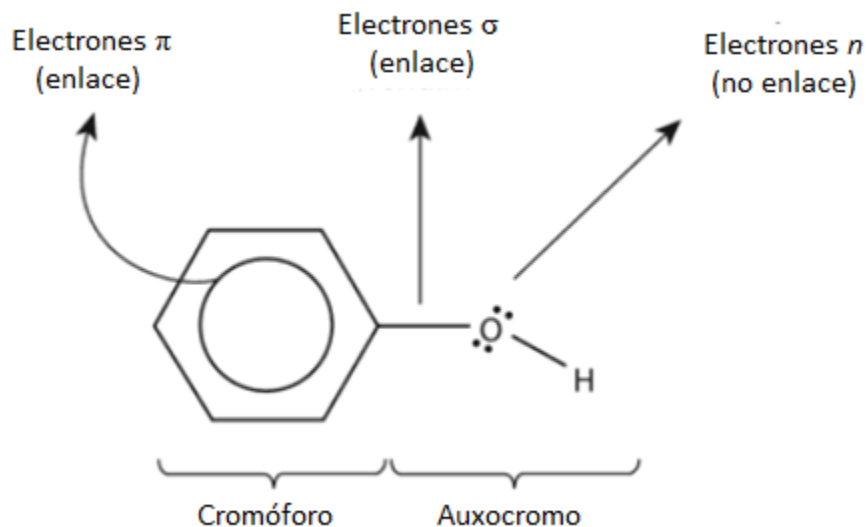


Figura 2.8 Terminologías en espectrofotometría UV (Hayes and Kruger 2014).

Cuando la luz UV atraviesa la celda que contiene el soluto absorbente disuelto en un solvente adecuado, la intensidad de la luz es disminuida por la reflexión en las superficies internas y externas de la celda y por la dispersión por algunas partículas en la solución, o por la absorción de luz por las moléculas del soluto. La intensidad de la luz absorbida puede expresarse como

$$I = I_{\text{absorbida}} - I_0 - I_T \quad (1)$$

Donde I_0 es incidente de intensidad original en la celda y I_T es la intensidad reducida transmitida desde la celda.

La transmitancia (T) es la proporción I_T/I_0 y el porcentaje de transmitancia esta dado por

$$\%T = 100 \frac{I_T}{I_0} \quad (2)$$

La *absorbancia* (A) es el logaritmo común del recíproco de T:

$$A = \log \frac{I_0}{I_T} \quad (3)$$

La ley de Lambert dice que la absorbancia es proporcional a la longitud de trayectoria (*b*) de la solución y la ley de Beer establece que la intensidad de un haz de radiación monocromática paralela disminuye exponencialmente con el número de moléculas absorbentes, o más simple la absorbancia es proporcional a la concentración (*c*). Una combinación de las dos leyes da como resultado la ley Lambert -Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I_T} = abc \quad (4)$$

La constante de proporcionalidad (*a*) es la absortividad. El nombre y valor de *a* depende de las unidades de concentración. Cuando C es mol/L, la constante es llamada *absortividad molar* o *coeficiente de extinción molar*. Por lo tanto:

$$A = \epsilon bc \quad (5)$$

La espectrofotometría puede ser aplicada para determinar la composición cuantitativa de muestras que contienen múltiples analitos, la ley de Lambert y Beer aplica a mezclas que contienen varias moléculas (1,2,3...n) que proveen interacciones entre las moléculas afectando su espectro:

$$A = \varepsilon_1 bc_1 + \varepsilon_2 bc_2 + \varepsilon_3 bc_3 + \cdots + \varepsilon_n bc_n \quad (6)$$

La muestra se lee a dos diferentes longitudes de onda λ_1 y λ_2 dando las siguientes ecuaciones

$$\lambda_a: A = \varepsilon_1^a bc_1 + \varepsilon_2^a bc_2 \quad (7)$$

$$\lambda_b: A = \varepsilon_1^b bc_1 + \varepsilon_2^b bc_2 \quad (8)$$

Para que este método sea preciso las longitudes de onda deben ser razonablemente diferentes y los componentes no deben interactuar químicamente (**Atole and Rajput 2018; Müllertz, Perrie, and Rades 2016**).

2.8. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

Varios métodos están disponibles para el análisis de compuestos farmacéuticos, sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography) *HPLC* por sus siglas en inglés o también llamada cromatografía líquida de alta presión (High Pressure Liquid Chromatography) es usada para la separación, identificación y cuantificación de cada constituyente de una mezcla.

Esta técnica consiste en una separación mediante una fase líquida en la cual la muestra que usualmente es en volumen de microlitros es separada en sus componentes (o analitos) constituyentes distribuyéndolos entre la fase móvil (un líquido que fluye) y una fase estacionaria (adsorbente o empaque dentro de una columna) a diferentes velocidades; el

principio de la separación es ya sea directa (fase normal), donde la fase estacionaria es más polar que la fase móvil o la cromatografía fase reversa donde la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil; la fase normal tiene la desventaja de no ser adecuada para muestras líquidas debido que al inyectarlas pueden quedarse adheridas al empaque y formar una fase estacionaria acuosa lo cual perjudicaría al sistema a mantener el equilibrio, después se desarrollaron fases estacionarias estables para cromatografía fase reversa lo cual hizo posible un análisis directo de muestras acuosas y se convirtió en la técnica más usada.

La velocidad del flujo dependerá de cada componente por su naturaleza y la composición de la fase móvil. El tiempo entre el punto de la inyección de la muestra y el analito alcanzando al detector es llamado tiempo de retención (t_R). El tiempo de retención medido en condiciones específicas es una normalidad distintiva para un analito dado (Figura 2.9) (Ahuja and Dong 2005; Dahimiwal et al. 2013).

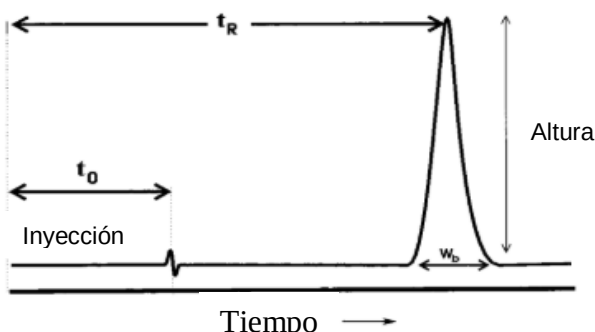


Figura 2.9 Tiempo de retención (Ahuja and Dong, 2005)

La fuerza del solvente o porcentaje orgánico del solvente contenido en la fase móvil controla este tiempo de retención del analito, así como diferentes solventes orgánicos (MeOH, ACN, THF) pueden tener un efecto dramático en la selectividad. Varios tipos de columnas están disponibles cargadas con empaques variando el tamaño de poro y la naturaleza de su

superficie. Al utilizar materiales de empaque para moléculas pequeñas requiere mayor presión del aparato y mejora regularmente la resolución cromatográfica.

Para fase normal a menudo se prefieren empaques en columna de sílica altamente purificada para no tener influencia en el rendimiento de la cromatografía. La sílica es un polímero inorgánico formado por la adición de ácido a una solución de silicato, esta puede ser unida químicamente con moléculas orgánicas más o menos hidrofóbicas. Para la cromatografía fase reversa el material de empaque más usado es octadecilsilano (ODS o C18) el cual tiene C18 cadenas de hidrocarburos en la superficie (Figura 2.10) (Müllertz, Perrie, and Rades 2016).

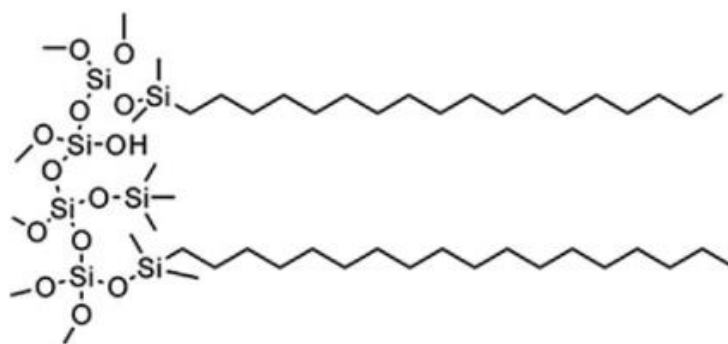


Figura 2.10 Octadecilsilano (ODS empaque de columna) para cromatografía fase reversa (Müllertz, Perrie, and Rades, 2016)

HPLC es una técnica versátil y reproducible para estimar productos farmacéuticos y tiene varias aplicaciones tanto cualitativas y cuantitativas (Rishabha et al. 1995).

Existen diferentes tipos de cromatografías, para el presente proyecto se realizó la cromatografía por intercambio iónico la cual consiste en separar analitos iónicos en HPLC con una columna de fase reversa, que se basa en la adición de compuestos iónicos (reactivos de par iónico) a la fase móvil para promover la formación de pares iónicos con los analitos

de la muestra estos pueden ser tensioactivos aniónicos o catiónicos tales como sales de tetraalquilamonio o ácidos n-alquilsulfónicos.

2.9. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El Infrarrojo (IR) o la espectroscopia Infrarroja transformada de Fourier (FTIR) tiene muchas aplicaciones desde análisis de moléculas pequeñas o complejas hasta análisis de células o tejidos. La espectroscopia es el estudio de la interacción de la luz con la materia, por lo tanto, la espectroscopia infrarroja estudia la interacción de luz infrarroja con la materia y cuando esto ocurre los enlaces químicos de la materia vibran. Los grupos funcionales tienden a absorber radiación infrarroja en el mismo número de onda independientemente de la estructura del resto de la molécula en el que el grupo funcional se encuentre.

Esta luz está compuesta por ondas eléctricas y magnéticas llamadas vector eléctrico y vector magnético, estas ondas se ondulan en planos mutuamente perpendiculares entre sí y se mueven a través del espacio en una tercera dirección perpendicular a los planos de ondulación.

Es la interacción del vector eléctrico con la materia que da la absorbancia de luz, este vector cambia su amplitud y tiene la forma de una onda sinusoidal, este vector también alterna su polaridad de + a – con el tiempo; ya que el movimiento de las ondas es repetitivo van por ciclos, para un ciclo la onda comienza en amplitud cero y termina cuando la onda a cruzado la amplitud cero por tercera vez (Figura 2.11). La distancia en la que la onda viaja durante el ciclo se llama longitud de onda (λ). Otra propiedad de la luz es el número de onda (W) que

mide el número de ciclos que una onda pasa por unidad de longitud (cm^{-1}).

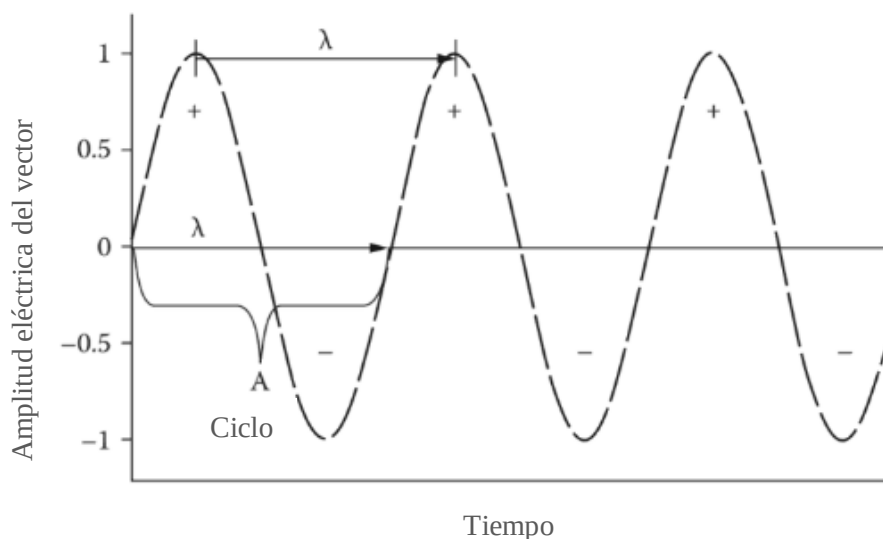


Figura 2.11 Ejemplo de vector eléctrico de una onda de luz (Smith B., 2011).

Si un espectro muestra una banda a 3000 cm^{-1} significa que la muestra que absorbió luz infrarroja pasó 3000 ciclos por centímetro, esta grafica se representa con el eje de X indicando el número de onda versus el eje de Y indicando la absorbancia (Figura 2.12).

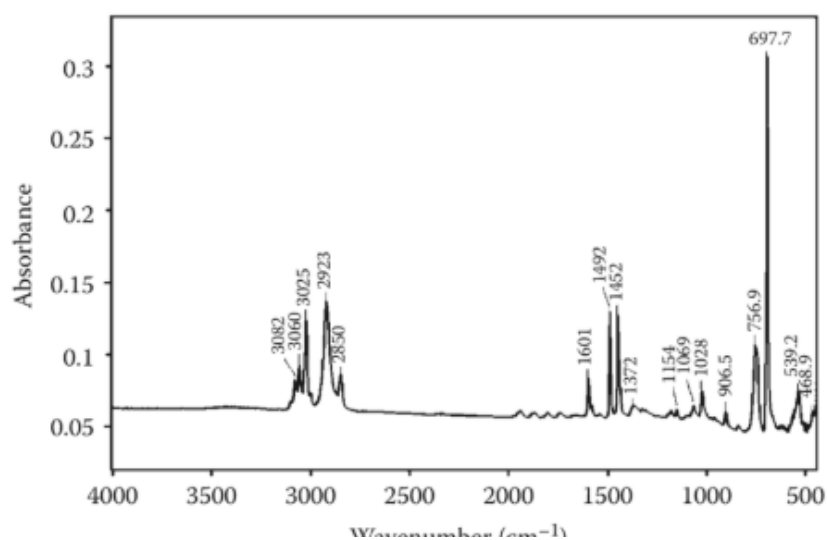


Figura 2.12 Espectro infrarrojo de poliestireno (Smith B., 2011).

El eje de Y también puede graficarse en porcentaje de transmitancia (%T), que mide el porcentaje de luz transmitida por una muestra (Figura 2.13), donde las bandas de %T apuntan hacia abajo. Se calcula con la operación mencionada anteriormente.

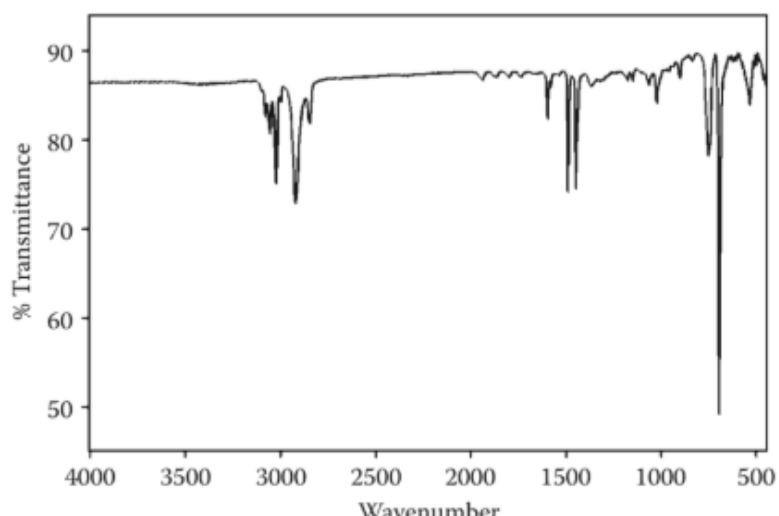


Figura 2.13 Espectro infrarrojo de poliestireno graficado en porcentaje de transmitancia (%T) (Smith B., 2011).

La espectroscopia de infrarrojo provee detalles de caracterización de un producto (**Smith 2011**). Podemos verificar la presencia de fármacos en el caso de este proyecto donde se realizará la modificación de suturas las cuales serán recubiertas con dos fármacos. Para analizar las muestras se utilizó FTIRI con el accesorio ATR (Reflectancia Total Atenuada) el cual funciona midiendo los cambios que ocurren en un haz IR reflejado internamente cuando el haz entra en contacto con una muestra. Un haz de infrarrojos se dirige a un cristal ópticamente denso con un alto índice de refracción en ángulo determinado. Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal hacia la muestra mantenida en contacto con el cristal (Figura 2.14) (**FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR) | Thermo Fisher Scientific - MX n.d.**)

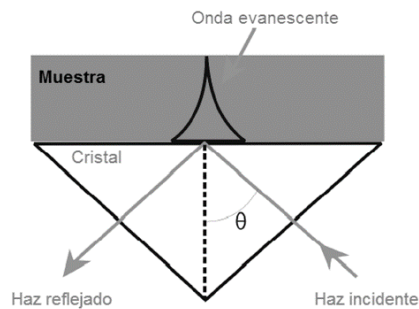


Figura 2.14 Reflexión de luz en cristal creando onda evanescente (Espectroscopía IR de reflexión – 2: Reflexión total atenuada [cited 2021 Aug 13]).

En regiones del espectro IR donde la muestra absorbe energía, la onda evanescente se atenuará. El rayo atenuado regresa al cristal, luego sale por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector en el espectrómetro IR. El detector registra el haz de infrarrojos atenuado como una señal de interferograma, que luego se puede utilizar para generar un espectro de infrarrojos (**FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR) | Thermo Fisher Scientific - MX n.d.**).

2.10. Fuerza Tensil

La fuerza tensil de una sutura es importante por muchas razones incluyendo la habilidad de la sutura para resistir nudos y el estrés impuesto para traer tejido suave en aposición. Suturas con baja fuerza tensil pueden romperse durante la cirugía o en el peor de los casos, postcirugía (Figura 2.15) (**von Fraunhofer, Storey, and Masterson 1988**).

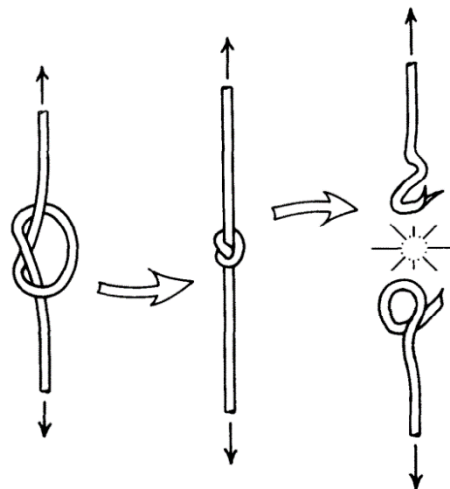


Figura 2.15 Diagrama del tiro por encima de la sutura y su modo de falla bajo carga de tracción. (Von F. et al. 1988)

La fuerza tensil esta expresada en el área trasversal del material y es normalizada basada en la dimensión del material, por lo tanto, podría usarse para comparar suturas que tengan diferente estructura química y/o tamaño. Entre más pequeña es la sutura, menor es la fuerza tensil de la hebra como se muestra en la tabla 2.1. El valor mínimo requerido para una sutura es de 50.8 N para suturas absorbibles.

Tabla 2.1 Fuerza tensil del nudo de la sutura

USP	Diameter	Tensile Strength (surgeon's knot)
4-0	0.2mm	7.5N
3-0	0.3mm	12.3N
2-0	0.35mm	19.6N
0	0.4mm	22.3N
1	0.5mm	37.3N

2.11. Eficacia Antibacteriana de Suturas Recubiertas Vía Zonas de Inhibición

De acuerdo al Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades CDCI por las siglas en inglés, Centers for Disease Control and Prevention en 2015-17 se recolectaron reportes mediante la NHSN (National Healthcare Safety Network) sobre la distribución de patógenos en infecciones nosocomiales las cuales incluyen: infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la línea central, infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres, posibles neumonías asociadas al ventilador e infecciones del sitio quirúrgico atribuidas a procedimientos hospitalarios que se muestran en la Tabla 2.2 y se observa la distribución de los 10 primeros patógenos de los 691 reportados en número y porcentaje (**Weiner-Lastinger et al. 2020**). Se puede observar que los principales microorganismos son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los cuales serán evaluados en el presente proyecto mediante el test de susceptibilidad por difusión en agar la cual es una técnica cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente, y está diseñada específicamente para bacterias de crecimiento rápido como los *Staphylococcus sp.* Ó los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*.

En esta técnica, el inóculo bacteriano es llevado a una concentración estándar de 0.5 de McFarland indicado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (**CLSI 2015**) y se aplica sobre la superficie de una placa seca de agar Mueller-Hinton. La cepa se debe inocular por estriado sobre la superficie del medio de cultivo y de tal forma que se logre un crecimiento confluyente. Una vez realizado esto, en un plazo no mayor de 15 minutos, se procede a colocar los discos o en este caso las suturas.

Tabla 2.2 Suplemento en línea del Informe de resistencia a los antimicrobianos (RA) para adultos 2015-2017: distribución de todos los patógenos reportados a NHSN, 2015-2017

Patógeno	No. De Patógenos	% de Patógenos
<i>Escherichia coli</i>	62,571	17.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	42,132	11.8
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	31,530	8.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28,513	8.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	28,236	7.9
<i>Estafilococos coagulasa negativa</i>	24,199	6.8
<i>Enterobacter spp.</i>	16,568	4.6
<i>Enterococcus faecium</i>	13,687	3.8
<i>Proteus spp.</i>	11,463	3.2
<i>Candida albicans</i>	11,043	3.1

Luego, la placa se incuba a 35°C en incubadora y por un periodo no mayor a las 18 horas excepto para los aislamientos de *Staphylococcus sp* y *Enterococcus sp*, para los cuales se recomienda una incubación de 24 horas, principalmente para lograr una mejor detección **(Herrera 1999)**.

Los diámetros alrededor de cada disco son medidos y su interpretación se basa en guías publicadas por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) y el organismo es reportado como sensible, intermedio o resistente al antibiótico probado.

El agar Mueller-Hinton es uno de los medios disponibles para este tipo de pruebas por que muestra una reproducibilidad aceptable lote a lote y ayuda al crecimiento de la mayoría de los patógenos además de que existe mucha información sobre test de susceptibilidad en estos medios.

Las categorías para poder interpretar valores son tres: susceptibilidad, intermedio y resistencia. La susceptibilidad-dosis dependiente la cual indica que la susceptibilidad de una cepa es dependiente del régimen de dosificación que es usado en el paciente en orden para ser efectivo clínicamente contra una cepa; Intermedio es la categoría que incluye cepas con la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un agente antimicrobial que se aproximan a los niveles en tejido y sangre usualmente alcanzables y cuya respuesta puede ser menor que el de las cepas susceptibles; la categoría de resistencia indica que las cepas no son inhibidas por las concentraciones habituales de un agente con una posología de dosificación normal o que demuestra que la CMI falló en el rango en el cual es probable que clínicamente sea eficaz contra la cepa. El punto de corte clínico o interpretativo también llamado *breakpoint* es la CMI o valor de la zona de inhibición usado para indicar susceptibilidad, intermedio y resistencia, se muestra un ejemplo.

El antimicrobial X con un criterio interpretativo es el siguiente:

	CMI (µg/mL)	Zona de Inhibición (mm)
Susceptible	≤4	≥20
Intermedio	8-16	15-19
Resistencia	≥ 32	≤14

El *breakpoint* susceptible es 4 µg/mL o 20 mm y el breakpoint de resistencia es 32 µg/mL o 14 mm **(CLSI 2015)**.

2.12. Ensayo de Viabilidad Celular 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- Bromuro de Difeniltetrazolio (MTT)

Muchos métodos se usan para evaluar los efectos de biomateriales en la viabilidad celular, la mayoría de las técnicas están basadas en la reproducibilidad estimada, que evalúa la influencia de factores que reducen la vitalidad, pero no necesariamente afectan la multiplicación solo puede determinarse mediante la detección de alteraciones en la estructura y función de las células. Estos incluyen observaciones de la morfología general y características específicas de la membrana (potencial de membrana, integridad, por ejemplo, capacidad de excluir colorantes y motilidad celular) y el perfil bioquímico de moléculas específicas, incluidas las enzimas. Esta prueba mide la viabilidad celular midiendo la actividad enzimática donde el nivel de actividad enzimática se basa en las células capaces de biotransformar las sales de tetrazolio.

El término tetrazolio deriva de la estructura química de las sales, ya que son compuestos heterocíclicos con cuatro átomos (tetra) de nitrógeno (aza) en el anillo de tetrazol, que definen este grupo de sales orgánicas. El 1H o 2H adicional en la nomenclatura de la sal de tetrazolio describe la ubicación formal del átomo de hidrógeno (Figura 2.16) (**Grela, Kozłowska, and Grabowiecka 2018**).

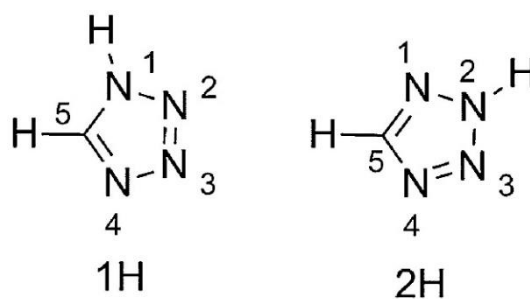


Figura 2.16 Estructura de los anillos de tetrazol característicos de las sales de tetrazolio.

Las sales de tetrazolio más comunes son 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT) y 2- (4-Yodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disulfofenil) -2Htetrazolio (WST-1). El ensayo se basa en la reducción de MTT, un colorante amarillo de tetrazolio soluble en agua, reducido principalmente por las deshidrogenasas mitocondriales, a cristales de formazán de color púrpura. (Figura 2.17). El ensayo MTT tiene una detección cuantitativa y sensible donde se mide la tasa de crecimiento de las células en virtud de una relación lineal entre la actividad celular y la absorbancia. Típicamente, 10,000 células suspendidas en 100 μ L de medio se incuban con 10 μ L de reactivo MTT, seguido de la adición de una solución de detergente para lisar las células (DMSO) y solubilizar los cristales coloreados. Por otro lado, el ensayo WST-1 produce un formazan soluble en agua, por lo que no requiere un paso de solubilización en solvente orgánico lo cual hace la medición más rápida y reproducible. La detección colorimétrica se realiza a una longitud de onda de 550-570 nm. La cantidad de color producido es directamente proporcional al número de células viables (Mahajan et al. 2012; Şen, Emanet, and Çulha 2016).

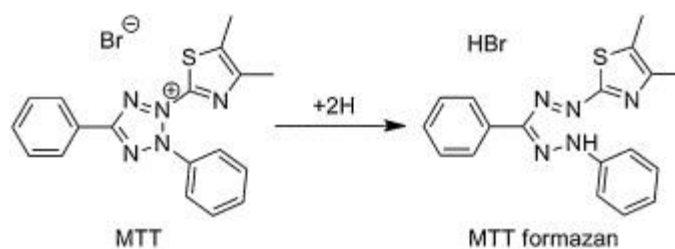


Figura 2.17 Reducción de bromuro de MTT a su formazán.

La viabilidad celular se calcula (CV (%)) usando la siguiente formula:

$$C_v(\%) = \frac{\text{Densidad optica de la muestra}}{\text{Densidad optica control}} \times 100 \quad (9)$$

La viabilidad celular evalúa la citotoxicidad como altamente citotóxica cuando se obtiene CV (%) menos del 25% y valores entre 50-25% se califica como moderadamente citotóxicos **(Nam and Lee 2012).**

Capítulo 3. Metodología

3.1. Solución De Recubrimiento Clorhexidina Y Acetato De Dexametasona Usando Como Acarreador Ácido Láurico

La solución de recubrimiento se preparó con 100 mg de diacetato como el agente antimicrobial y se disolvió en 10 mL de etanol al 96% en un recipiente con rosca, se disolvió con ayuda de agitación magnética y se agregó poco a poco 237 mg de ácido láurico; finalmente se añadió 50 mg de acetato de dexametasona manteniéndolo en agitación hasta solubilizar completamente.

3.1.1 Cargado De Sutura Vicryl Con Solución De Recubrimiento

La sutura Vicryl fue cortada en muestras de 15 cm y se pesaron individualmente en balanza analítica. Cada hilo fue inmerso en la solución de recubrimiento durante 10 minutos en oscilador VWR Shel Lab (Imagen 3.1). con temperatura a 35°C a 150 rpm. Se deja secar durante 2 horas a temperatura ambiente en caja Petri y se pesa.



Imagen 3.1 Oscilador con temperatura VWR Shel Lab.

3.2. Preparación De Medio Fisiológico Simulado Para Análisis De Liberación PBS pH 7.4

Se disolvió 6.8 g de fosfato monobásico de sodio en 250 ml de agua desionizada y se agregó 190 mL de 0.2 N NaOH. Se midió pH con un potenciómetro previamente calibrado, se ajustó pH en caso de ser necesario con 0.1 N de NaOH y se llevó al volumen de 1 litro con agua desionizada.

3.3. Determinación De Longitud De Onda Máxima De Los Fármacos A Cuantificar

Se realizó barrido de cada fármaco para determinar su longitud de onda máxima en espectrofotómetro UV/Vis DU 520 Beckman Coulter (Imagen 3.2). Se pesó individualmente 2 mg cada fármaco (dexametasona y diacetato de clorhexidina) en una balanza analítica, se disolvió en 20 mL de etanol al 96% y se tomó 1 mL con una micropipeta de 1000 μ L. El barrido se realizó desde 200 a 600 nm.



Imagen 3.2 Espectrofotómetro UV/Vis DU 520 Beckman Coulter

3.4. Cuantificación De Diacetato De Clorhexidina Y Acetato De Dexametasona En CLAR

3.4.1 Solución Estándar De Diacetato De Clorhexidina Para Recta De Calibración

Se pesó 5 mg de diacetato de clorhexidina y se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL y se agregó 10 mL de etanol al 96% para disolver en sonicador por 5 min. Se agregó PBS pH 7.4 poco a poco en el matraz hasta llegar casi al aforo en sonicador por 15 minutos. Una vez completamente disuelto se aforó a 100 mL.

3.4.1 Solución Estándar De Acetato De Dexametasona Para Recta De Calibración

Se pesó 5 mg de acetato de dexametasona y se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL y se agregó 10 mL de etanol al 96% para disolver en sonicador por 5 min. Se agregó PBS pH 7.4 poco a poco en el matraz hasta llegar casi al aforo en sonicador por 15 minutos. Una vez completamente disuelto se aforó a 100 mL.

3.4.2 Fase Móvil Para Diacetato De Clorhexidina

Solución A

Se pesó 26.6 g de fosfato monobásico de sodio y se disolvió en 10 mL de trietanolamina y 1.5 litros de agua destilada. Se ajustó pH a 3 con ácido fosfórico. Una vez ajustado el pH se llevó a 2 litros.

Solución Mixta

Se preparó una mezcla de la solución A y acetonitrilo en una proporción (7:3) y se filtró a vacío con una membrana de 0.22 μm de Nylon. Se desgasificó por 10 minutos.

3.4.3 Fase Móvil Para Acetato De Dexametasona

Para 1 litro se colocó 750 mL de metanol grado HPLC y 250 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 2 L, después de agregó 30 mL ácido acético glacial y se mezcló con agitador magnético. Finalmente se añadió 2 gramos de ácido octano-1-sulfónico, sal sódica y se agitó hasta disolver y se filtró a vacío con una membrana de 0.22 μm de Nylon. Se desgasificó por 10 minutos.

3.4.4 Recta de calibración para diacetato de clorhexidina

Se tomaron alícuotas de la solución estándar (Tabla 3.1) y se colocaron en matraces volumétricos de 10 mL, se aforaron con PBS pH 7.4. Se tomó del matraz volumétrico con

una jeringa de 1 mL muestra suficiente y se filtró con un acrodisc de Nylon de 25 mm con un tamaño de poro de 45µm. La muestra filtrada se colocó en un vial THERMO TTR-T de 2 mL para ser procesada en HPLC.

Las condiciones del procesamiento fueron en columna C18 (250 X 4.6 mm, 5µm el tamaño de partícula). 50 µl de inyección de muestra con un flujo de 2 mL/min por una corrida de 8 minutos.

Tabla 3.1 Recta de calibración clorhexidina.

Concentración (mg/mL)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)
0.001	0.2	10
0.005	1	10
0.01	2	10
0.015	3	10
0.02	4	10
0.03	6	10
0.04	8	10

3.4.5 Recta De Calibración Para Acetato De Dexametasona

Se tomaron alícuotas de la solución estándar (Tabla 3.2) y se colocaron en matraces volumétricos de 10 mL, se aforaron con PBS pH 7.4. Se tomó del matraz volumétrico con una jeringa de 1 mL muestra suficiente y se filtró con un acrodisc de Nylon de 25 mm con un tamaño de por de 45µm. La muestra filtrada se colocó en un vial THERMO TTR-T de 2 mL para ser procesada en HPLC. Las condiciones del procesamiento fueron en columna C18

(250 X 4.6 mm, 5µm el tamaño de partícula). 20 µL de inyección de muestra con un flujo de 2 mL/min por una corrida de 4 min.

Tabla 3.2 Recta de calibración para dexametasona.

Concentración (mg/mL)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)
0.001	0.2	10
0.005	1	10
0.01	2	10
0.015	3	10
0.02	4	10
0.03	6	10
0.04	8	10

3.4.6 Liberación Simultánea De Diacetato De Clorhexidina Y Acetato De Dexametasona Para Cuantificación En CLAR

Se colocó sutura en frasco con rosca para evitar evaporación con 5 mL de PBS a pH 7.4 en agitador orbital OHAUS a 37° C a 250 rpm por 96 horas. Una vez transcurridas las 96 horas se tomó con una jeringa de 1 mL muestra suficiente y se filtró con un acrodisc Ade Nylon de 13 mm con un tamaño de poro de 0.2µm. La muestra filtrada se colocó en un vial THERMO TTR-T de 2 mL para ser procesada en HPLC.

3.4.7 Integración De Áreas Bajo La Curva

En el software del equipo Chromeleon console se seleccionó la opción DATA → SECUENCIA → Se seleccionó la muestra de interés → PROCESSING METHOD → QUANTITATIVE → Se colocó el nombre de la muestra y se seleccionó la

inyección actual o la secuencia completa→ FINISH→ DETECTION →RUN COBRA WIZZARD→INTEGRATION AREA → Se seleccionó el área deseada y NEXT→ Se seleccionó la BASE LINE y se continuó con NEXT→COBRA SMOOTHING WIDTH CONFIGURATION→NEXT→MINIMUM AREA CONFIGURATION→CHANNEL AND INJECTION TYPE CONFIGURATION→FINISH→COMPONENT TABLE y se dio click en add new component, se nombró la muestra y CREATE→ Se escribió el tiempo de retención que se encontraba sobre el pico en el cromatograma en el cuadro que dice RET. TIME y se presionó ENTER→ Y finalmente INTERACTIVE RESULTS.

Capítulo 4. Caracterización

4.1. Espectrómetro FTIR-ATR

Se limpió platina del espectrómetro FT-IR Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™5 (Imagen 4.1) con etanol al 96%. Una vez seco se realizó un blanco mediante un barrido para eliminar humedad presente en el ambiente. Con unas pinzas se tomó la sutura sin recubrimiento que se utilizó como referencia y se colocó en el detector. Se bajó la punta de diamante hasta el tope. Se realizó análisis de sutura con recubrimiento del sistema dual y acarreador, así como de cada fármaco en su estado sólido con la ayuda de una espátula para colocar la muestra.

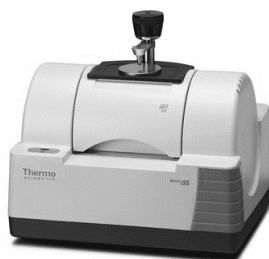


Imagen 4.1 FT-IR Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™5

4.2. Prueba De Fuerza Tensil

La prueba de fuerza tensil de la sutura se realizó con un Analizador de textura Brookfield CT3 (Imagen 4.2). Se probó sutura recubierta con sistema dual y sin sistema dual de 15 cm con nudos en ambos extremos. Se colocó la sutura entre las pinzas (Imagen 4.3) con ayuda del ajuste con la opción de BEAM desplazando la pinza superior hacia abajo y se programó la prueba en el software del equipo en la ventana de TEST TYPE →DUAL GRIP TENSION



Imagen 4.2 Analizador de textura Brookfield CT3

TEST → TAREG TYPE→DISTANCE→TARGET VALUE→80.0 MM→ GENERAL TEST PARAMETERS→ TRIGGER LOAD 30. G→ TARGET SPEED→3.00 MM/S→ PROBE→TA3/100→FIXTURE→TA-RT-KIT→RUN TETS. El test se realizó por triplicado.

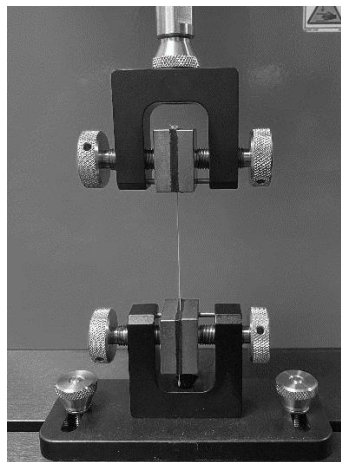


Imagen 4.3 Sutura entre pinzas del texturómetro.

4.3. Estudio De Efecto Antimicrobiano En Suturas Modificadas Con Clorhexidina Y Dexametasona Comparada Con Sutura Vicryl Plus

4.3.1 Preparación Del Estándar De Turbidez 0.5 McFarland

Se preparó una solución stock de 0.0048 mol/L $BaCl_2$ (1.175% w/v $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) y una solución stock de 0.18 mol/L (0.36N) H_2SO_4 (1% w/v). Se mantuvo las suspensiones en constante agitación y se agregó 0.5 ml de la solución de $BaCl_2$ a la solución de 99.5 mL de H_2SO_4 . Para verificar la densidad del estándar de turbidez se midió la absorbancia usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm y la absorbancia debe corresponder entre 0.08 y 0.13 para el estándar 0.5 McFarland.

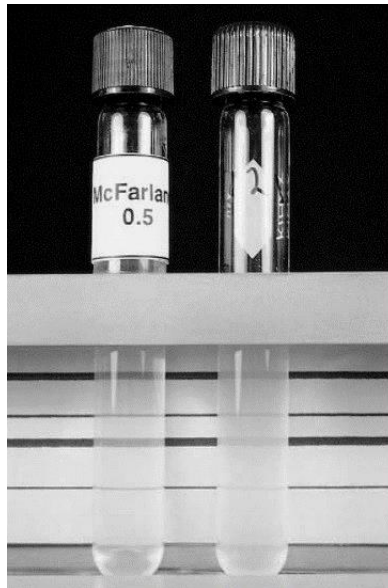


Imagen 4.4 Estándar de turbidez 0.5 McFarland

4.3.2 Preparación De Cajas Petri Con Agar Mueller-Hinton

Se pesaron 36 g de agar Mueller Hinton correspondiente para 1 L, se hidrató con agua destilada y se calentó hasta disolverse completamente y hervir. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a una presión de 15 libras a una temperatura de 121°C. Se dejó enfriar a 45°C y se vertió en cajas Petri con un grosor de 4 ± 5 mm (aproximadamente 25 ml en placa circular de 90 mm, 31 mL en placa circular de 100 mm) todo el procedimiento se realizó dentro de campana de flujo laminar Una vez solidificado el medio las cajas se conservaron en refrigeración.

4.3.3 Preparación Del Inóculo

Se sembró en placas de agar nutritivo el microorganismo a evaluar por medio de estriado y se incubó por 24 horas a 35°C. Después del periodo de incubación se preparó la suspensión bacteriana tomando colonias aisladas con asa de la placa con la cepa a evaluar ajustándola al estándar de turbidez 0.5 de McFarland visualmente en un tubo con 5 ml de solución salina estéril (Ilustración 4.1).



Ilustración 4-1 Inóculo en tubo con solución salina.

4.3.4 Inoculación En Placa

Se tomó un hisopo estéril y se sumergió en la suspensión del inóculo del microorganismo a evaluar ajustado al 0.5 McFarland, en caso de que el microorganismo del inóculo fuese Gram negativo se trató de evitar sobre inoculación presionando el hisopo en las paredes del tubo de la suspensión. El hisopo se frotó en tres direcciones en la placa (Ilustración 4-2); se esparció el inóculo por estría cerrada, asegurándose que no quedaran espacios entre las estrías. En caso de ser varias cajas se debió sumergir el hisopo en la suspensión para cada sembrado.

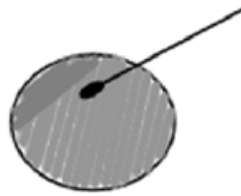


Ilustración 4-2 Sembrado por hiposado.

4.3.5 Colocación De Suturas En Placa Inoculada

Se colocó sutura de 3 cm previamente tratada con luz UV por 20 min para eliminar microorganismos, así como las pinzas a utilizar para colocar las suturas la cuales fueron lavadas con alcohol isopropílico al 70%. Se tomó la sutura con la pinza y se colocó en la placa con 3 cm de separación entre cada una (dos suturas por caja) (Ilustración 4-3), se le hizo una pequeña presión a toda la sutura para que se adhiriera a la superficie de la placa. Se incubó por 24 horas a 35°C.

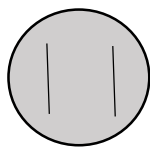


Ilustración 4-3 Colocación de suturas en placa.

4.3.6 Medición De Zona De Inhibición

La zona de inhibición se midió en mm con un calliper longitudinalmente a través de la sutura (Ilustración 4-4).

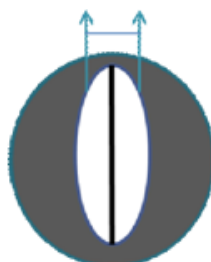


Ilustración 4-4 Medición de zona de inhibición.

4.4. Detección De Los Fármacos En Liberación De Suturas Mediante Cromatografía De Alta Resolución (CLAR)

Para confirmar el cargado de los fármacos en las suturas se realizó una cromatografía. Se utilizó un cromatógrafo UltiMate™ 3000 HPLC (Imagen 4.5) con una columna C18 (250 X 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μ m), la separación de los fármacos se obtuvo con una fase móvil compuesta de MeOH: Agua: Ácido acético glacial (75:25:10) con 0.2 g de sodio 1-heptanesulfonato a temperatura ambiente con un flujo de 1.0 mL/min.

Las muestras de liberación se procesaron en una proporción 50 μ L de muestra y 50 μ L de fase móvil. Se prepararon soluciones stock para tener referencias de clorhexidina y dexametasona (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Soluciones stock para la cromatografía.

50 mg de acetato de dexametasona en 100 ml fase móvil

Concentración (mg/mL)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)
0.005	0.1	10
0.01	0.2	10
0.015	0.3	10
0.05	1	10

2 mg de diacetato de Clorhexidina en 10 ml fase móvil

Concentración (mg/mL)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)
0.02	1	10
0.1	1	2



Imagen 4.5 UltiMate™ 3000 HPLC

4.5. Evaluación De Viabilidad Celular De Suturas Con Recubrimiento Y Sin Recubrimiento

4.5.1 Método Directo

Se colocó en placa de 96 pocillos 5000 células de fibroblastos murinos BalB/3T3 (ATCC CCL-163) en medio DMEM y se incubó por 24h a 37°C, 5% CO₂.

Se realizaron recubrimientos de suturas de 1 cm de largo con diferentes soluciones (n=3) como se muestra en Tabla 4.2. Usando como control positivo pocillo sin sutura, pocillo con sutura sin recubrimiento y sutura comercial con triclosán Vicryl Plus. Las suturas fueron tratadas con luz UV por 20 minutos.

Tabla 4.2 Cargados de suturas para prueba de viabilidad celular método directo.

Nombre	Contenido
CHX + Sutura	100 mg de diacetato de clorhexidina
Dx + Sutura	50 mg de acetato de dexametasona
CHX + Ác. Láurico+ Sutura	100 mg de diacetato de clorhexidina + 237 mg de ácido láurico
Dx + Ác. Láurico + Sutura	50 mg de acetato de dexametasona + 237 mg de ácido láurico
Sistema dual + Ác. Láurico +Sutura	100 mg de diacetato de clorhexidina + 50 mg de acetato de dexametasona +237 mg de ácido láurico

Se retiró el medio DMEM después de 24 horas y se agregó 100 µL de DMEM nuevo. Se colocaron las suturas en pocillos y se incubaron por 24 h a 37°C, 5% CO₂. Después de 24 h de incubación se retiraron las suturas y se agregó mezcla del reactivo MTT y medio DMEM en proporción 1:10. Se dejó incubar por 4 horas y después se agregó 100 µL de solución

solubilizante para los cristales de formazán en cada pocillo y se dejó incubar toda la noche para después leer la placa a 620 nm en un lector de Multiskan FC Thermo Scientific.

4.5.2 Método Indirecto

Se colocó en placa de 96 pocillos 10,000 células de fibroblastos murinos BalB/3T3 (ATCC CCL-163) en medio DMEM y se incubó por 24 h a 37°C, 5% CO₂. Se realizaron cargados de suturas de 1 cm de largo con diferentes cargados (n=3) como se muestra en Tabla 4.2. Usando como control positivo pocillo solo con células y pocillo elución de sutura comercial con triclosán Vicryl Plus. Se colocaron suturas recubiertas y secas previamente tratadas con luz UV durante 20 min en tubos eppendorf de 2 mL con 1.5 mL de medio DMEM en oscilador a 150 rpm a 37°C por 24 horas.

Se retiró el medio DMEM de la placa de 96 pocillos después de 24 horas y se tomaron 100 µL del medio con la elución de las suturas por triplicado y 50 µL de elución con 50 µL de medio DMEM para diluir la muestra a la mitad para otro triplicado. Se colocaron en la placa de 96 pocillos y se incubó por 24h a 37°C, 5% CO₂. Después de la incubación se retiró el medio y se agregó mezcla del reactivo MTT y medio DMEM en proporción 1:10. Se dejó incubar por 4 horas y después se agregó 100 µL de solución solubilizante para los cristales de formazán y se dejó incubar toda la noche para después leer la placa a 620 nm en un lector de Multiskan FC Thermo Scientific.

Capítulo 5. Resultados y Discusión

5.1. Barridos Para Determinación De Longitud De Onda Máxima

Se realizaron barridos de los fármacos, así como del acarreador ácido láurico para confirmar la longitud de onda máxima de absorción reportada en la bibliografía y también verificar si no contenían impurezas. Se estimaron las longitudes de onda máxima 240 nm para dexametasona, 252 nm para ácido láurico y 280 nm para diacetato de clorhexidina según lo reportado (**Attin et al. 2008**).

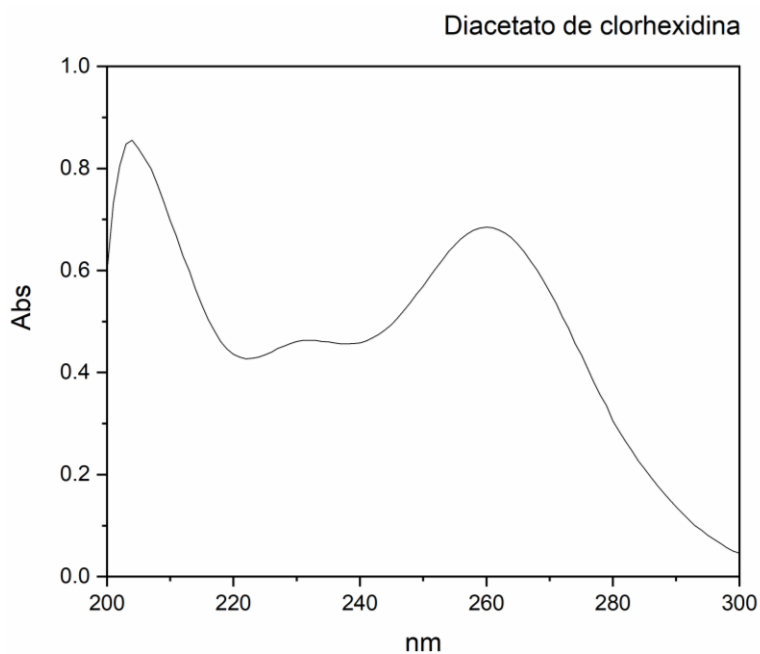


Gráfico 5.1 Barrido dicetato de clorhexidina

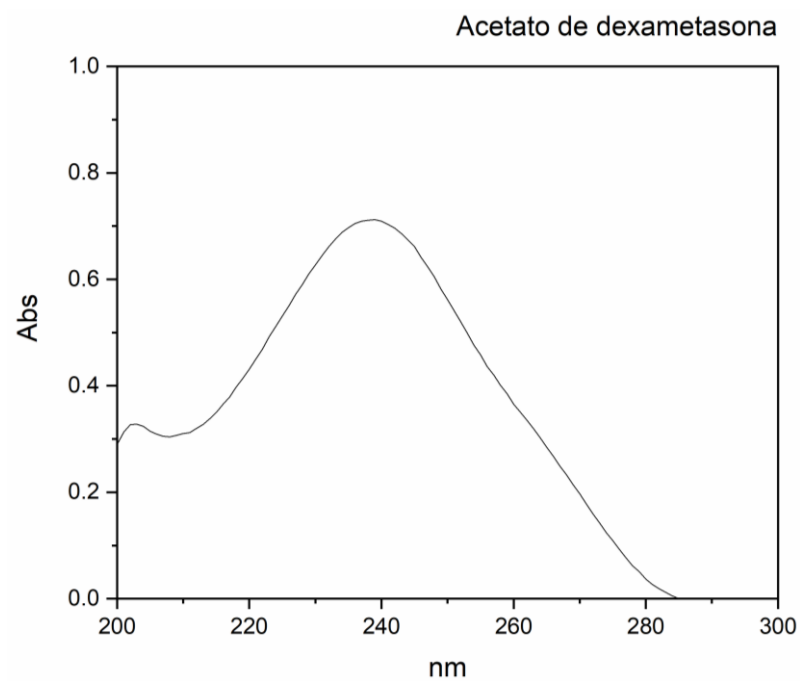


Gráfico 5.2 Barrido acetato de dexametasona

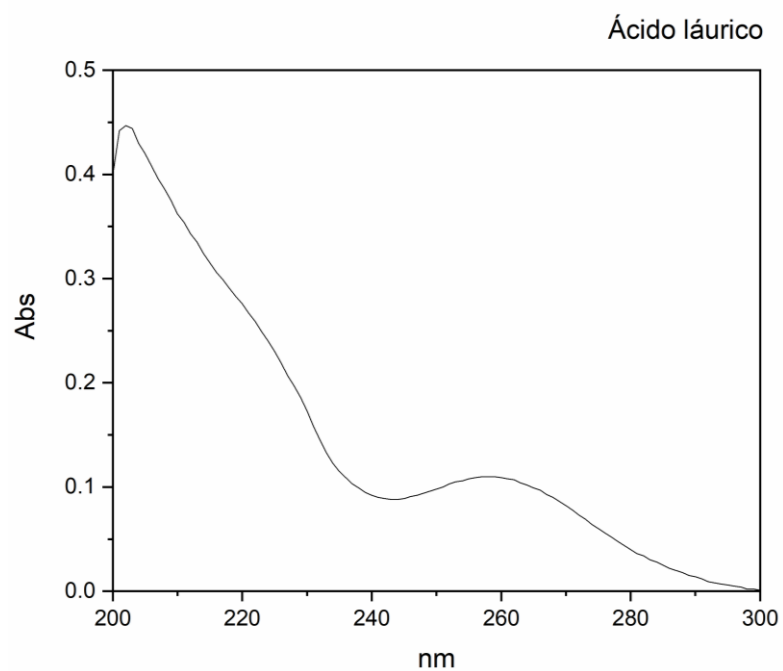


Gráfico 5.3 Barrido ácido láurico

5.2. Diacetato De Clorhexidina

Se obtuvieron suturas Vicryl recubiertas de diacetato de clorhexidina utilizando soluciones de recubrimiento a concentraciones de 50 mg y 158.4 mg de clorhexidina utilizando como acarreador ácido láurico de 316.8 mg y 237 mg para cada solución. Se realizaron liberaciones para comprobar si al aumentar la concentración aumentaba la absorbancia. En la Gráfica 5.4 se observan las absorbancias recopiladas contra el tiempo en minutos de las liberaciones.

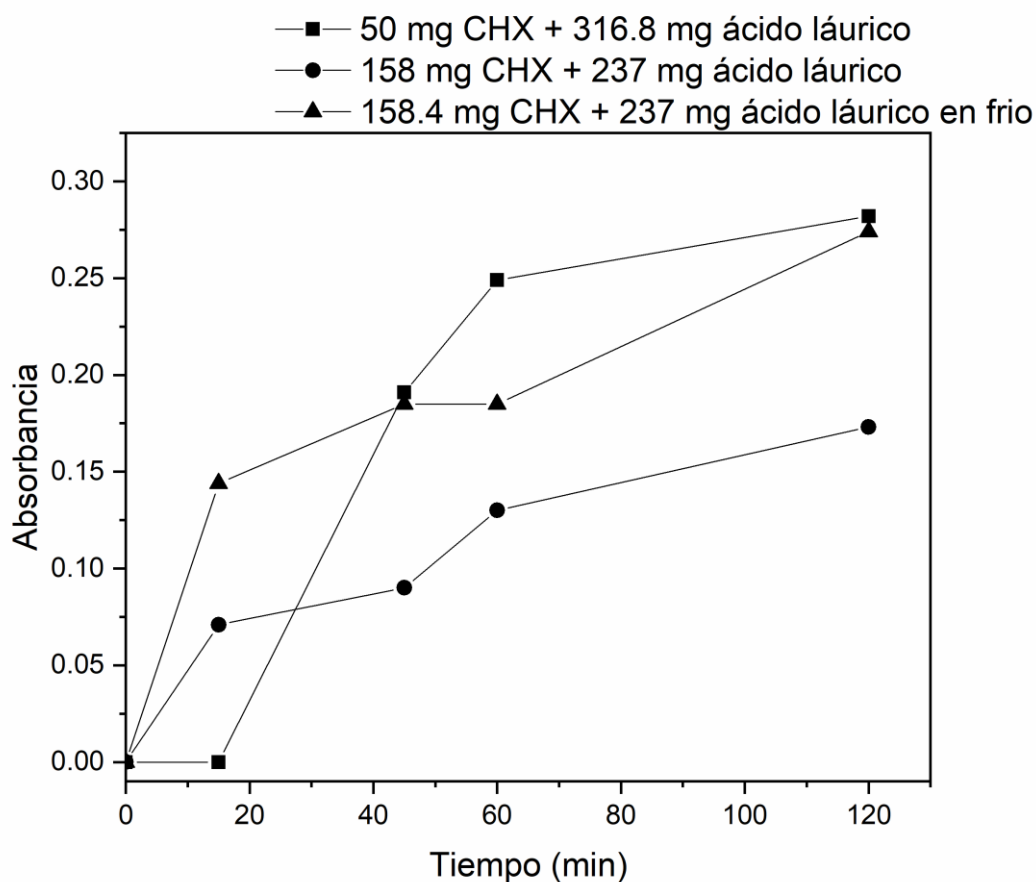


Gráfico 5.4 Liberaciones de diacetato de clorhexidina con ácido láurico.

Se hizo una variación en el método de cargado con la temperatura de 35 °C a temperatura de 5 °C aproximadamente. Se dejó una sutura inmersa en la solución de cargado con 158.4 mg de diacetato de clorhexidina a 5°C por 12 horas obteniendo una capa gruesa del recubrimiento en la superficie de la sutura (Imagen 5.1), por lo cual se esperaba obtener las mayores absorbancias al realizar la liberación, pero como se puede observar en la Gráfica 5.1 en la línea 158.4 mg CHX + ácido láurico frío, se encuentra en el segundo nivel de los 3 experimentos además que en aplicación no sería atractivo para los cirujanos ya que la mayor parte del fármaco se pudiera desprender al momento de hacer la inserción de la sutura en la piel además, la estructura? consistencia de la sutura se volvió pegajosa al manejo.

La sutura con mayores absorbancias con el tiempo fue la sutura con 50 mg de clorhexidina, sin embargo, se tenía que evaluar su comportamiento en el sistema dual.



Imagen 5.1 Sutura sin recubrimiento y sutura con recubrimiento de diacetato de clorhexidina.

5.3. Acetato De Dexametasona

Se realizaron cargados de dexametasona con y sin ácido láurico a diferentes concentraciones para comprobar que el ácido láurico ayudara al fármaco a tener una liberación prolongada y lenta, así como la concentración de dexametasona en la solución de recubrimiento afectaría la liberación; aumentando la concentración liberada a mayor concentración de recubrimiento, así como a la inversa (Gráfico 5.5). Los datos de las concentraciones de acetato de dexametasona y ácido láurico utilizados en cada experimento se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Concentración de dexametasona y ácido láurico en los experimentos.

Sutura	Concentración
DX 158.4 mg + Ác. L	158.4 mg de acetato de dexametasona
DX 158.4 mg	158.4 mg de acetato de dexametasona + 237.4 mg de Ác. láurico
DX 79.2mg	79.2 mg de acetato de dexametasona
DX 79.2mg + Ác. L	79.2 mg de acetato de dexametasona + 316.8 mg de Ác. Láurico

La liberación se realizó en PBS pH 7.4. La sutura con mayor liberación promedio fue la sutura con mayor concentración la cual fue de 158.4 mg con ácido láurico y en su contraparte la liberación sin el acarreador presentó la segunda mejor liberación en las primeras 6 horas.

Dexametasona demostró tener alta afinidad a la sutura con y sin acarreador, observando una tendencia donde al aumentar la concentración de dexametasona en la solución de recubrimiento aumenta la concentración en la sutura.

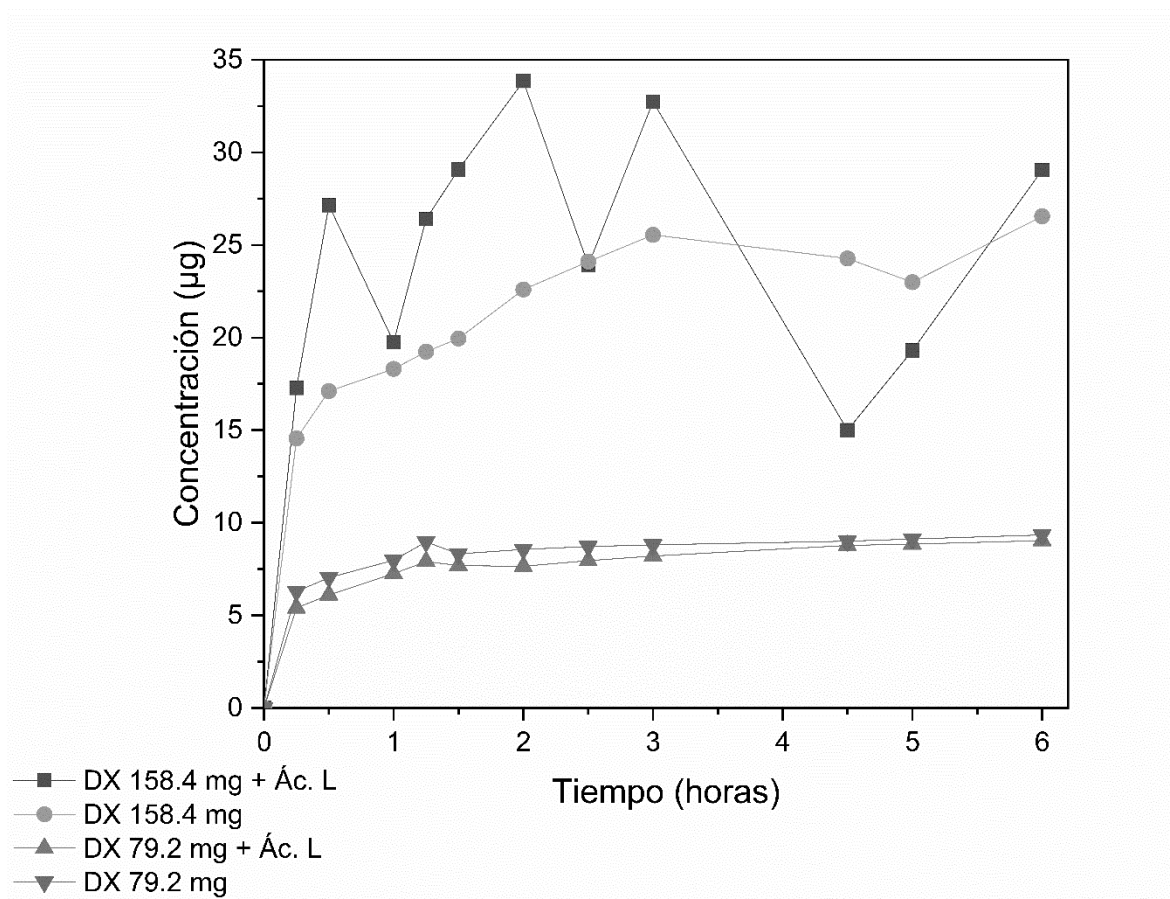


Gráfico 5.5 Dexametasona con acarreador y sin acarreador a diferentes concentraciones.

5.4. Cuantificación por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

5.4.1 Cromatografía Para Sistema Dual

Se realizó una CLAR para cuantificar dexametasona basado en un método reportado previamente como sistema dual (Upadhyay S U, Patel V B, Patel A A et al. 2012), para identificar los fármacos cargados y liberados a partir de la sutura como prueba cualitativa. Se analizaron primero soluciones estándar de cada fármaco individual y posteriormente un

estándar de la mezcla de los fármacos y finalmente se analizó una muestra de la liberación a partir de una sutura cargada con el sistema dual.

En el cromatograma pudimos observar que el método propuesto sirve para identificar acetato de dexametasona, así como clorhexidina, teniendo acetato de dexametasona un tiempo de retención de 3.4 min observando un pico simétrico (Gráfico 5.6), en el caso de diacetato de clorhexidina se obtuvo un tiempo de retención de 6.2 min con un coeluto (Gráfico 5.7). También se realizó un análisis del buffer o medio empleado para la liberación (Gráfico 5.8), para detectar señales analíticas provenientes del mismo.

Se pueden observar los picos característicos del buffer y de dexametasona en el cromatograma de la liberación de la sutura con el sistema dual acumulado durante 96 horas (Gráfico 5.9), pero en el caso del diacetato la altura y anchura del pico son mucho menores de lo que se observó en las soluciones estándar, esto puede ser debido a que se encontraba en baja concentración, debido a la concentración de la solución estándar de 100 µg y las concentraciones liberadas en la sutura oscilan entre 28 µg. Se intentó mejorar la resolución de los picos agregando a la solución de liberación 50% de fase móvil, sin obtener resultados viables para una cuantificación dual.

Por lo cual se optó por realizar la cuantificación por métodos separados para tener resultados más precisos.

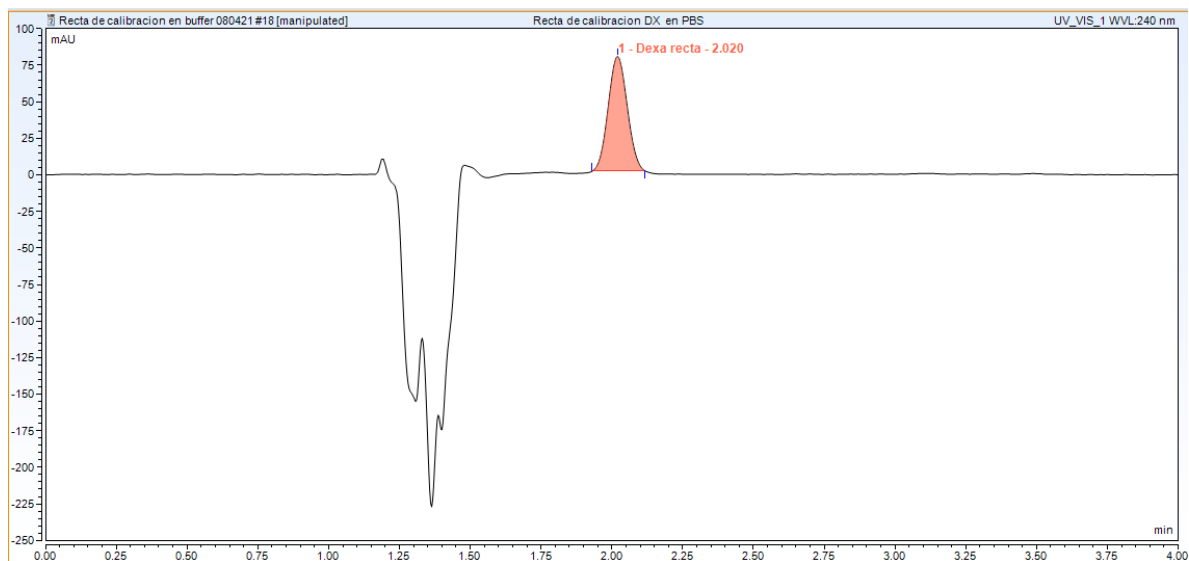


Gráfico 5.6 Cromatograma de solución estándar de acetato de dexametasona (20 µg/ ml)

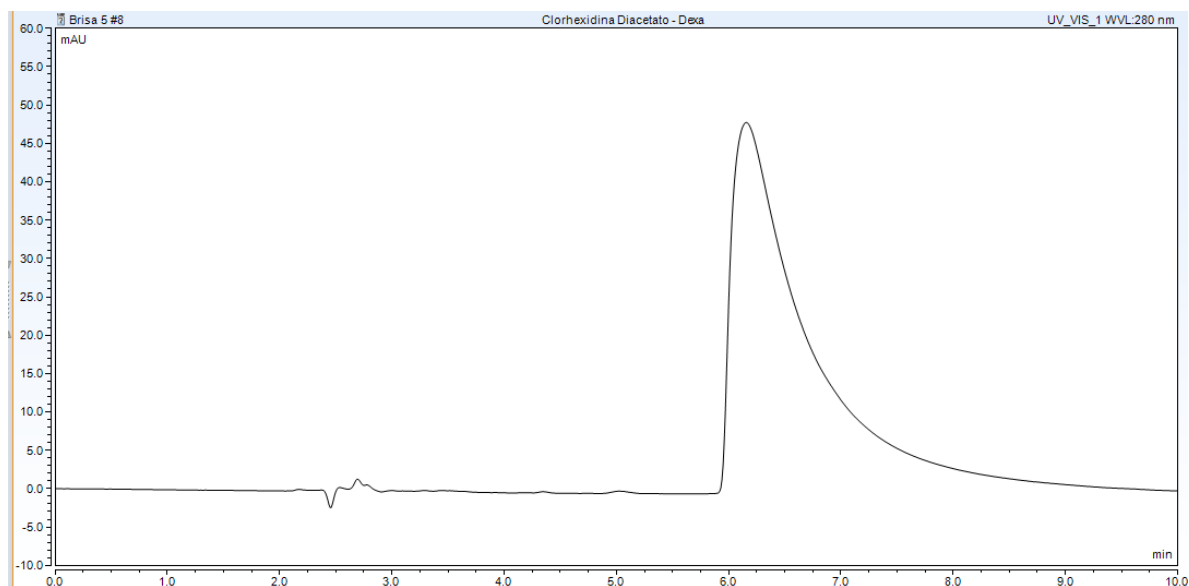


Gráfico 5.7 Cromatograma de solución estándar de diacetato de clorhexidina (100 µg/ml)

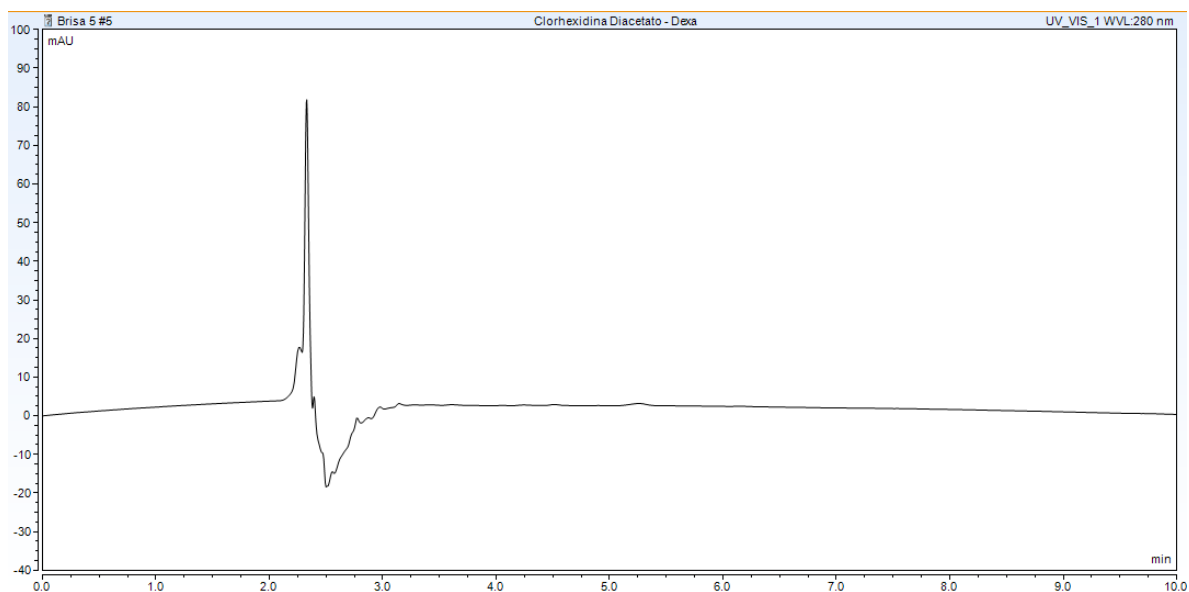


Gráfico 5.8 Cromatograma del blanco (PBS pH 7.4).

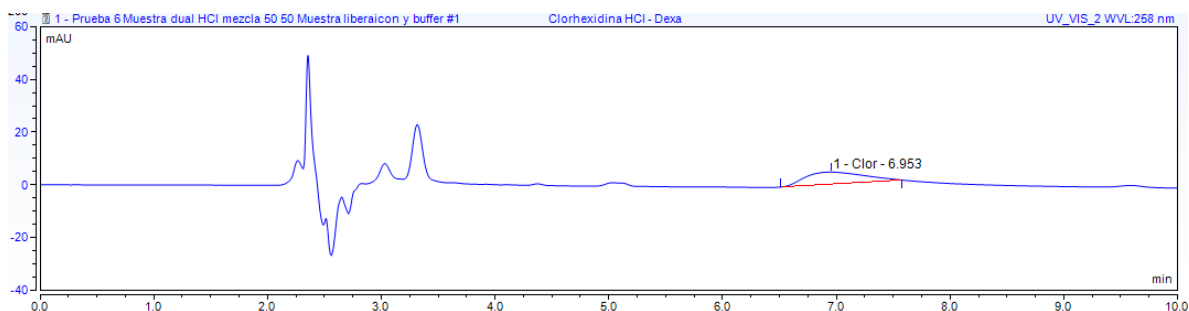


Gráfico 5.9. Liberación de sistema dual.

5.4.2 Cuantificación De Diacetato De Clorhexidina En CLAR

Se cuantificó diacetato de clorhexidina por separado debido a que el método dual no presentaba selectividad y sensibilidad para las concentraciones en el sistema dual. Se realizó la cuantificación de clorhexidina por el método ya mencionado en la metodología obteniendo picos simétricos. Se realizaron dos liberaciones por triplicado obteniendo una concentración máxima de $28\mu\text{g}$ (± 1.17) a las 96 horas (Gráfico 5.10).

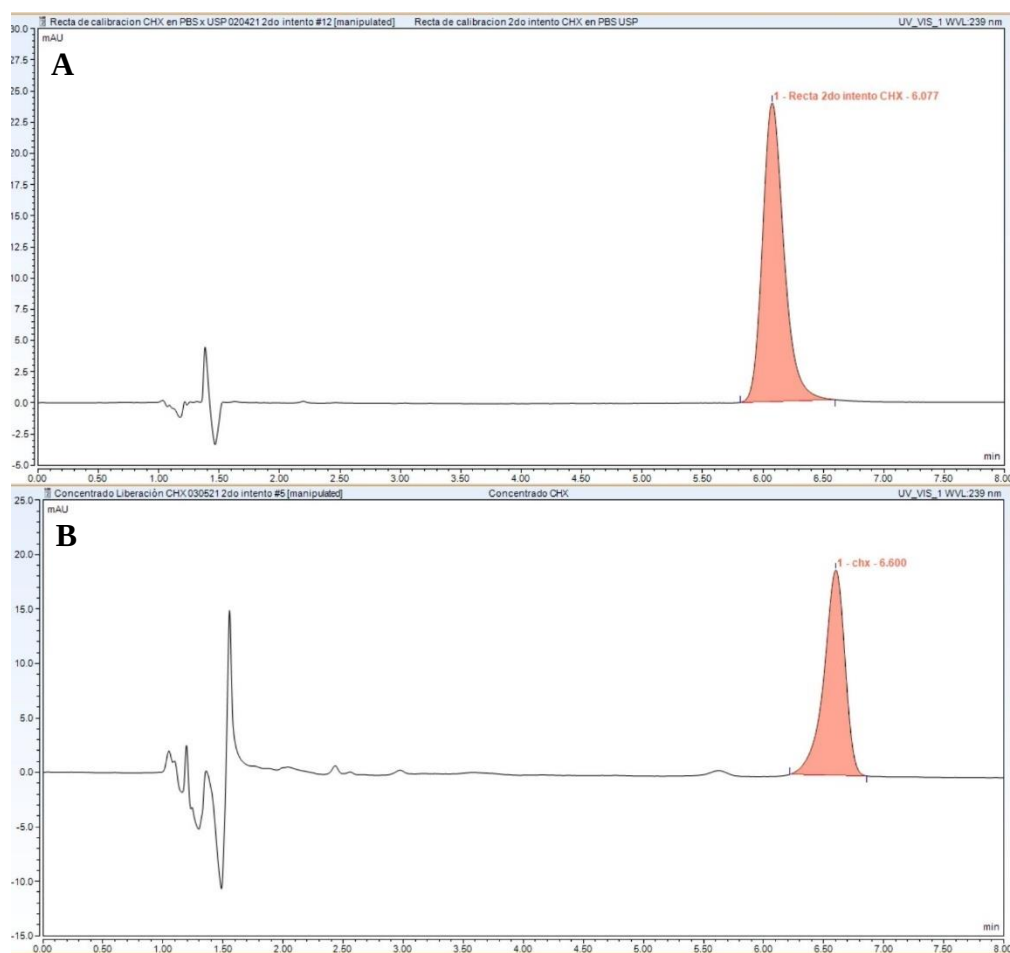


Gráfico 5.10 Cromatograma de recta de calibración $30\mu\text{g}$ (A) comparado con la liberación de diacetato de clorhexidina en sistema dual concentrado (B).

Se realizó un análisis de ANOVA de una vía RM para comparar los resultados de los triplicados de ambas liberaciones sin diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.809$).

5.4.3 Cuantificación De Acetato De Dexametasona En CLAR

La metodología para el sistema dual mostró una alta resolución para dexametasona inclusive a concentraciones bajas, por lo cual se decidió seguir con esta metodología para la cuantificación de dexametasona, sin embargo, para concentraciones menores a 10μ la resolución no era buena por lo cual no era un método viable para tiempos de liberación menores a 24 horas. Se hicieron dos liberaciones por triplicado para cuantificarlas por medio de CLAR, dejando las soluciones en liberación por un periodo de 96 horas obteniendo concentración promedio de $13.29 (\pm 0.657)$ (Gráfico 5.10). Se realizó un ANOVA de una vía RM para comparar los lotes sin diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.430$).

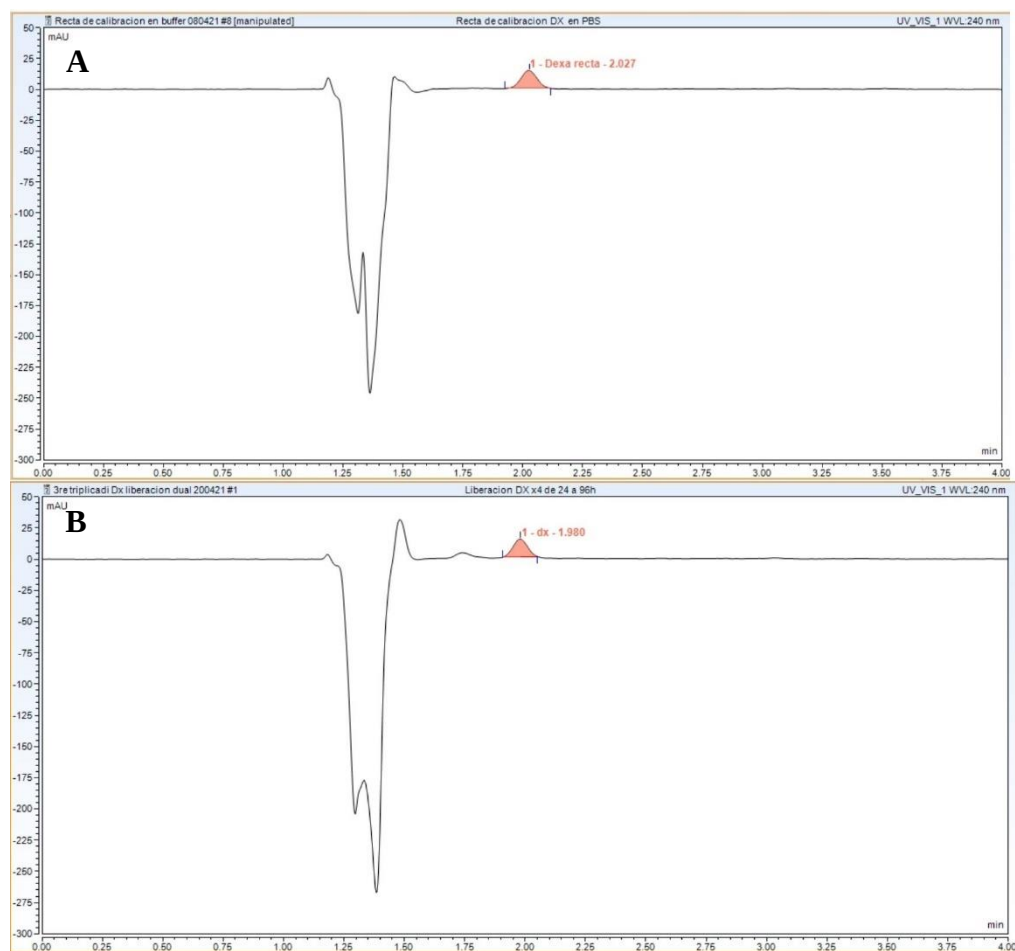


Gráfico 5.11 Cromatograma de recta de calibración 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (A) comparado con la liberación de acetato de dexametasona en sistema dual concentrado (B).

5.5. Espectrometría De Infrarrojo

Se obtuvieron espectros de infrarrojo a partir de dexametasona, clorhexidina, ácido láurico, sutura de referencia (Vicryl) y finalmente la sutura cargada. Esto para demostrar la incorporación de los compuestos de la formulación. En la sutura Vicryl podemos observar bandas características de la molécula de poliglactina 910, donde se señalan las bandas más representativas del copolímero. A 1740 cm^{-1} , se presenta una banda de alta intensidad correspondiente a la vibración del carbonilo de tipo éster ($\text{C}=\text{O}$) presente en la molécula, a 2917 cm^{-1} se observa una banda de intensidad débil correspondiente a la vibración C-H (hibridación SP^3) y finalmente otras bandas características del estiramiento C-O de 1058 a 1153 cm^{-1} a (Gráfico 5.11).

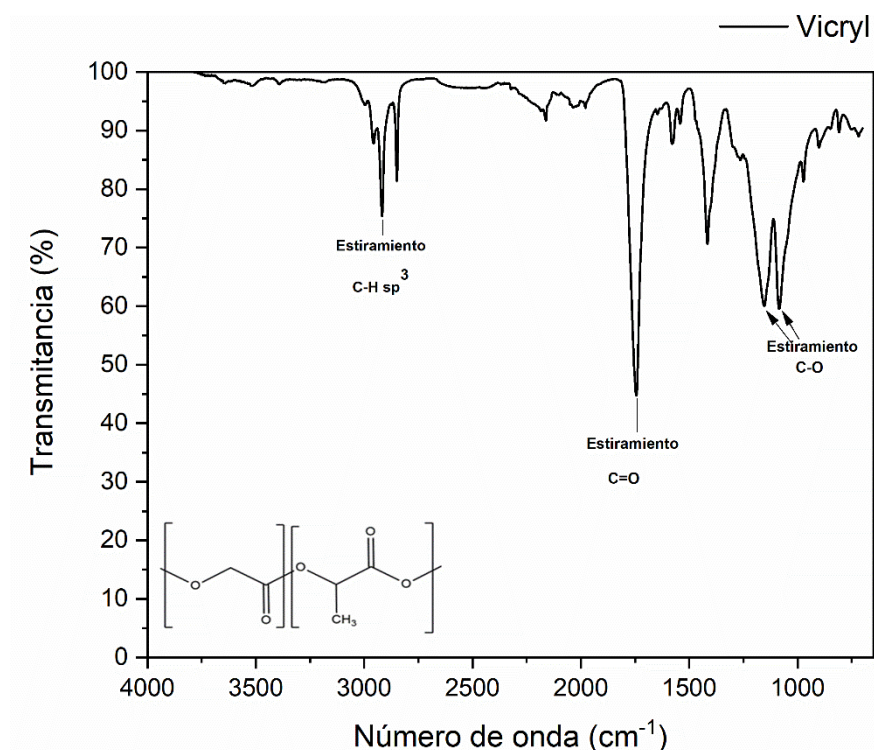


Gráfico 5.12 Espectro de infrarrojo sutura Vicryl

Para el ácido láurico el espectro de infrarrojo se observó a 1697 cm^{-1} una banda intensa de estiramiento C=O del ácido carboxílico y el estiramiento O-H también perteneciente al ácido carboxílico con una señal amplia ente $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ que se sobrepone con la absorción de C-H a 2847 cm^{-1} y finalmente a 1470 cm^{-1} se observa un doblamiento C-H₂ de la cadena alifática (Gráfico 5.12).

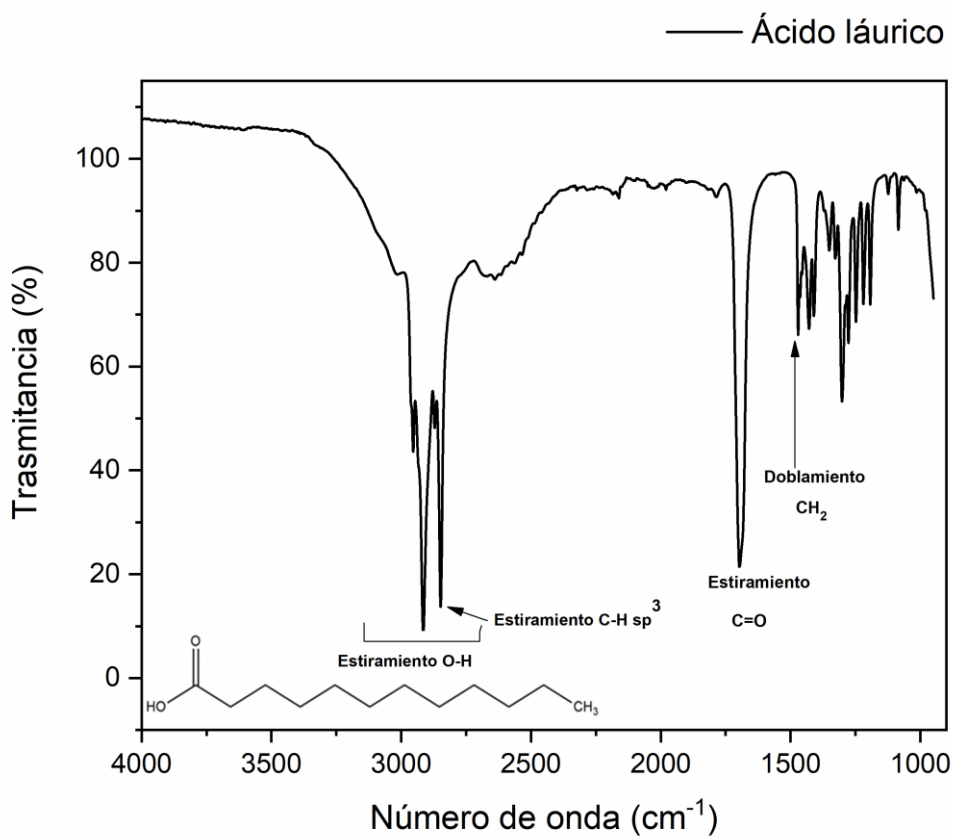


Gráfico 5.13 Espectro de infrarrojo ácido láurico.

Diacetato de clorhexidina mostró una señal a 3323 cm^{-1} N-H perteneciente al grupo de amina secundaria que se puede encontrar en la estructura además como una señal intensa por el doblamiento N-H a 1487 cm^{-1} unida al anillo aromático. Se puede observar a 3120 cm^{-1} un estiramiento por la hibridación sp^2 de los anillos aromáticos y sp^3 de la hibridación de la cadena alcanos. Se observó también las bandas características de los anillos aromáticos de mediana intensidad para la sustitución *-p* que corresponden a vibraciones C-H fuera de plano a 820 cm^{-1} y el sobre tono entre $200\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$ (Gráfico 5.13). Finalmente, una banda de intensidad débil (1723 cm^{-1}), correspondiente a la vibración de estiramiento de la imina presente en clorhexidina.

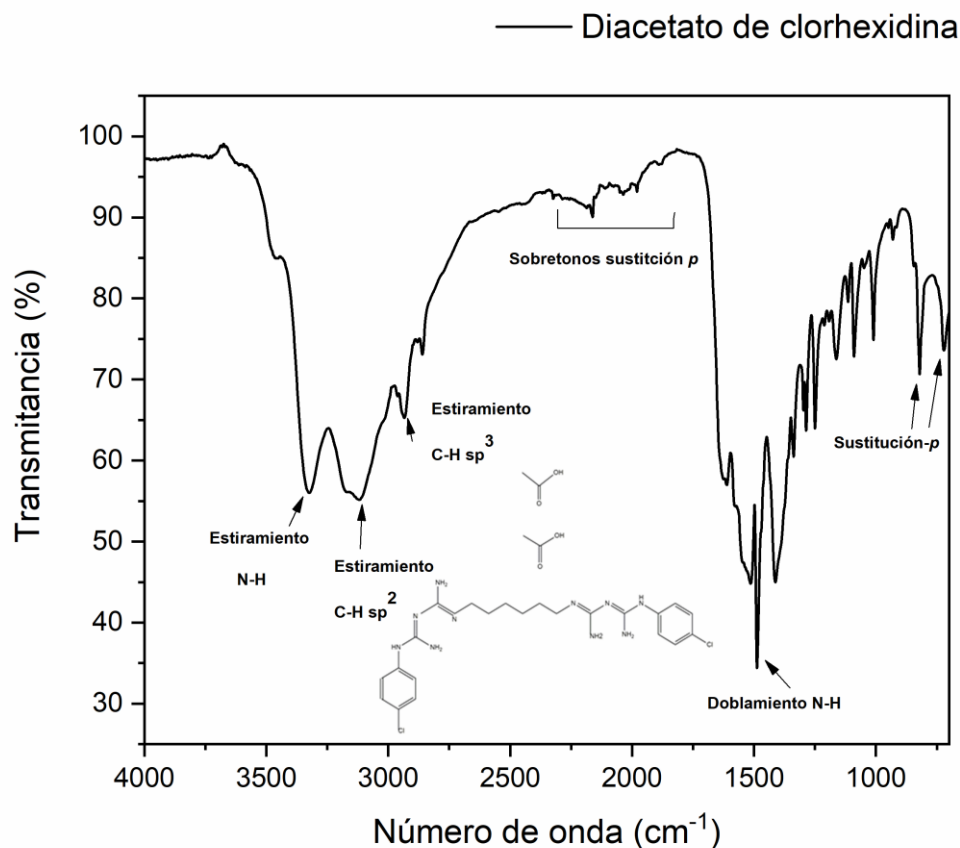


Gráfico 5.14 Espectro de infrarrojo de diacetato de clorhexidina.

En el espectro de infrarrojo de acetato de dexametasona se observó el estiramiento O-H a 3389 cm^{-1} que está unido al ciclohexano y al ciclopentano. Se visualizan señales correspondientes a hibridaciones sp^3 a 2879 cm^{-1} de los alcanos y a 2950 cm^{-1} de la hibridación sp^2 de los enlaces dobles en el ciclo, así como el estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de estos mismos a 1661 cm^{-1} . El estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del grupo carbonil presente en la cetona y el éster más desplazado hacia la izquierda a 1748 cm^{-1} y el sobretono $\text{C}=\text{O}$ a 350 cm^{-1} . El estiramiento C-O entre $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Así como también se observan los doblamientos de los enlaces CH_2 y CH_3 entre 1667 y 1410 cm^{-1} (Gráfico 5.14)

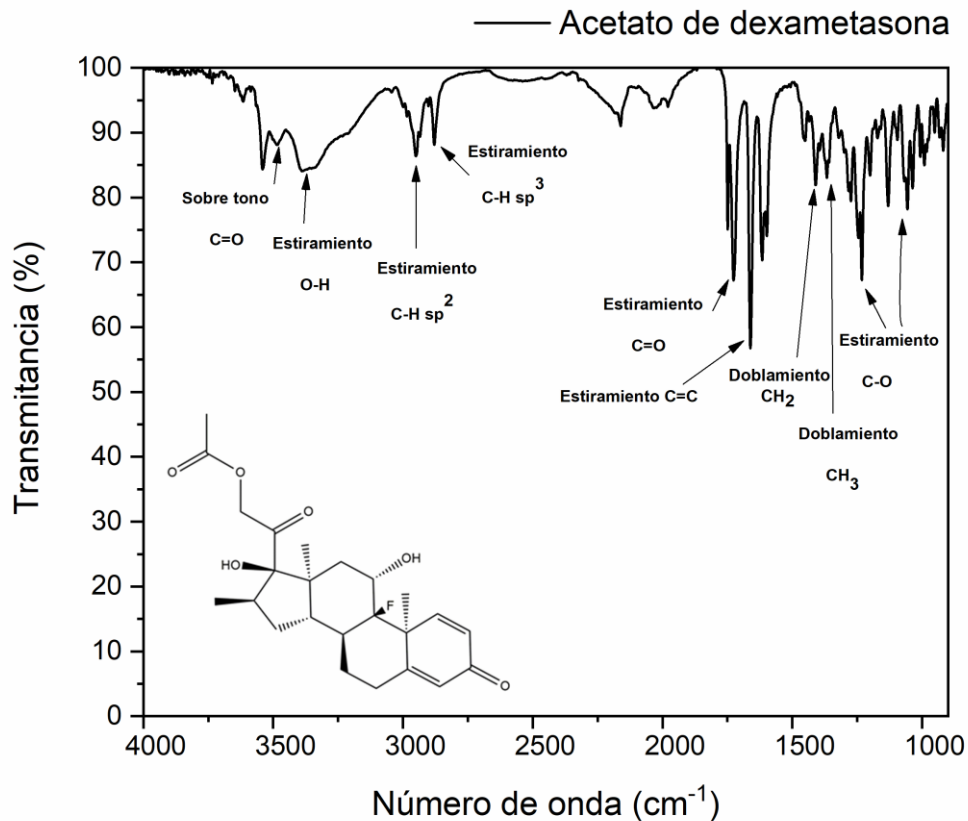


Gráfico 5.15 Espectro de infrarrojo de acetato de dexametasona.

Se realizó un gráfico comparativo (Gráfico 5.16) donde vemos el espectro de infrarrojo de la sutura Vicryl sin recubrimiento y de los 3 componentes activos: diacetato de clorhexidina, acetato de dexametasona y ácido láurico. Donde las señales más predominantes son las de los estiramientos C=O de la sutura Vicryl de color lila, así como los estiramientos C-O. Se puede apreciar de clorhexidina una señal a 3323 cm⁻¹ N-H perteneciente al grupo de amina secundaria que se puede encontrar en la estructura, además como una señal intensa por el doblamiento N-H a 1487 cm⁻¹ unida al anillo aromático, esta señal se puede apreciar mejor en la sutura del sistema dual confirmando la presencia de clorhexidina. De dexametasona podemos observar el estiramiento O-H presente en la molécula, así como los estiramientos

de las hibridaciones sp^3 a 2879 cm^{-1} de los alcanos y a 2950 cm^{-1} de la hibridación sp^2 de los enlaces dobles en el ciclo.

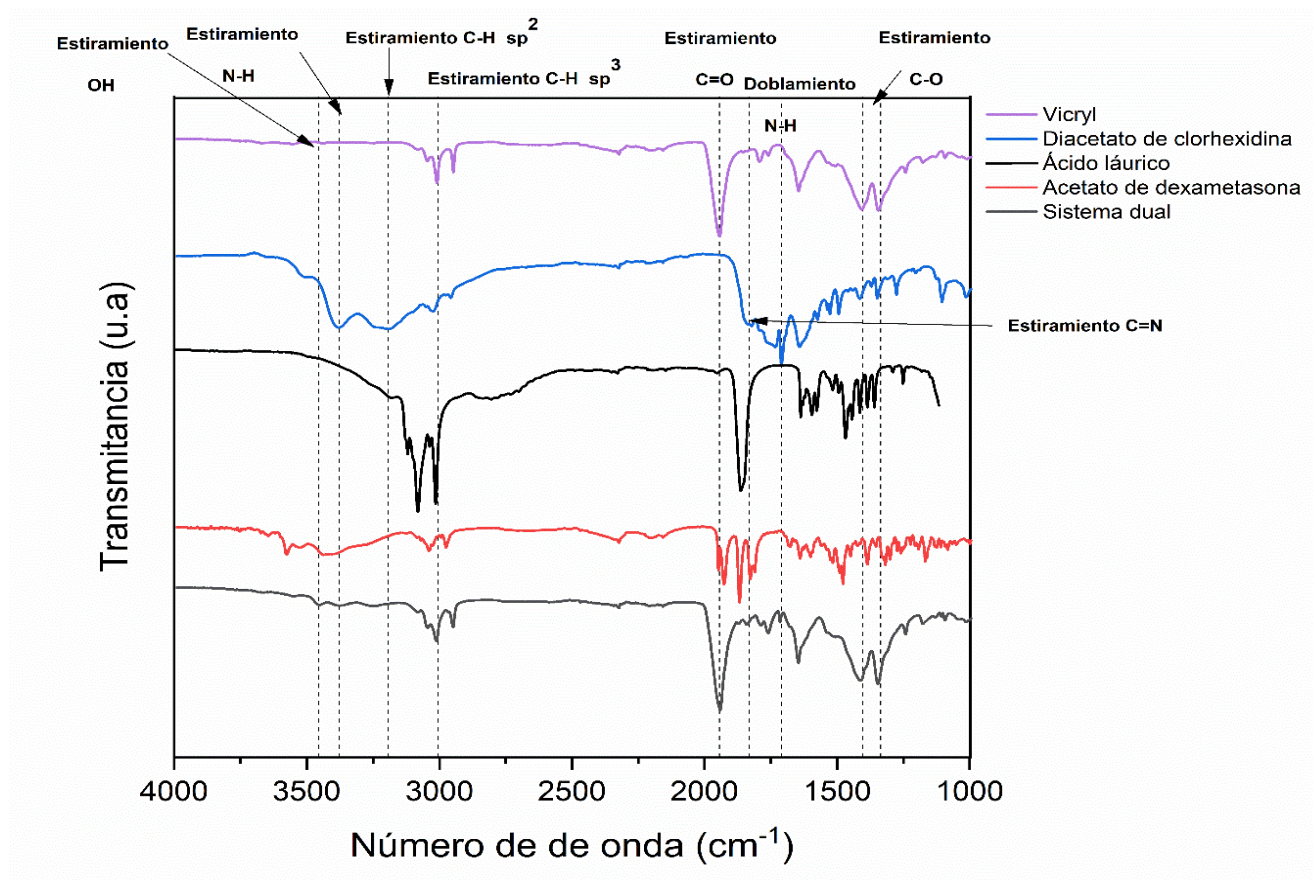


Gráfico 5.16 Comparación de infrarrojos de los fármacos y sistema dual.

5.6. Evaluación De Fuerza Tensil

Se realizó prueba de fuerza tensil para verificar que la sutura mantuviera sus propiedades mecánicas las cuales son importantes para tener un buen soporte al cierre de la herida donde será aplicada. Se realizó un experimento de comparación de la sutura sin recubrimiento, verificando que la fuerza con la que se rompe la sutura (Tabla 5.2), asegurándonos que el

valor sea mayor a 50.8 N que es el mínimo requerido por la Farmacopea Europea (**Obermeier et al. 2014**). El valor promedio fue de 76.93 N el cual está por encima del valor mínimo requerido por la Farmacopea, el cual nos indica que el recubrimiento no afecta sus propiedades mecánicas no se observó diferencia estadísticamente significativa entre la sutura blanco y la cargada ($P = 0.487$). En el gráfico 5.17 se puede observar como la fuerza al jalar la sutura va aumentando y hay una caída cuando esta se rompe.

Tabla 5.2 Fuerza tensil de suturas.

Fuerza tensil	Blanco	Sutura dual
Media (N)	79.81	76.93
Desv. Estándar	5.08	4.09

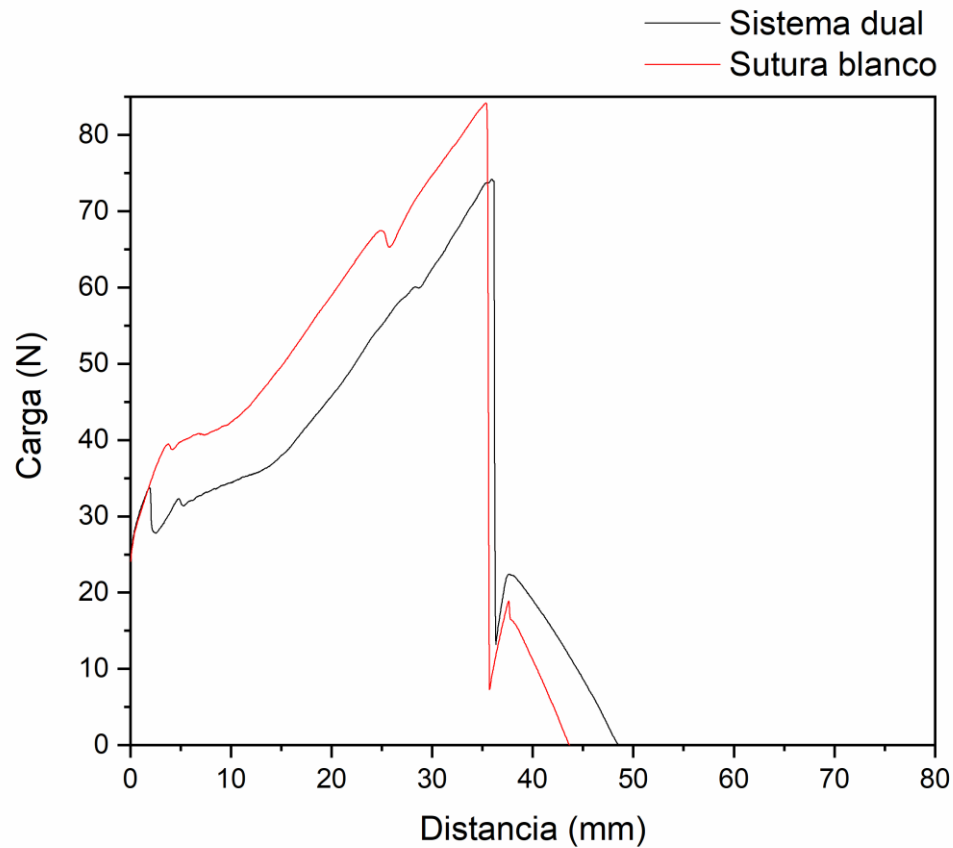


Gráfico 5.17 Fuerza tensil comparativa entre sutura blanco y sutura con sistema dual.

5.7. Prueba De Sensibilidad Por Difusión En Disco

Se observó inhibición con bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* NCTC 775, así como se probó con Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y el hongo *Candida albicans* ATCC 10231 ya que estos son los microorganismos más comunes en las infecciones de sitio quirúrgico. Al tener resultados positivos en cepas ATCC se decidió probar con una cepa

resistente que en este caso fue Meticilina Resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) que es probable que en el área clínica se encuentren este tipo de cepas ya que en la actualidad existen muchas cepas que van adquiriendo por el sobre todo por el abuso de los antibióticos.

Se realizó la prueba de inhibición contra MSRA obteniendo resultados positivos observando que la sutura propuesta con el sistema dual tuvo inhibición por 3 días mientras la sutura que se encuentra en el mercado Vicryl Plus no tuvo efecto en la cepa.

5.7.1 Comparación de zonas de inhibición de suturas con diferentes cargados contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Se evaluó la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 contra sutura recubierta con clorhexidina por si sola y con acarreador, así como la sutura cargada con el sistema dual utilizando acarreador y sin acarreador (Tabla 5.3). Se observó que diacetato por sí solo tuvo una inhibición de 19 mm y al agregar a la solución de recubrimiento el acarreador aumento su zona de inhibición a 22 mm. Al probar el sistema dual el cual es el de mayor interés se mostró una inhibición mayor al usar acarreador que al no usarlo.

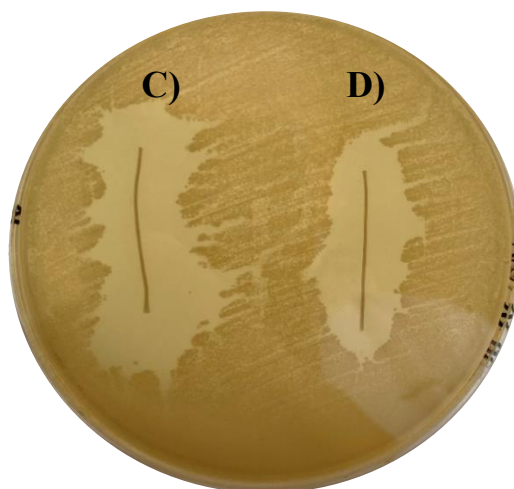
Tabla 5.3 Comparación de suturas con diferentes recubrimientos.

Sutura	Zona de Inhibición (mm)
Dicetato de clorhexidina	19
Diacetato de clorhexidina con acarreador	22
Sistema dual diacetato	13
Sistema dual diacetato con acarreador	25



A) Clorhexidina
Inhibición: 19 mm

B) Sistema dual con acarreador
Inhibición: 25 mm



C) Clorhexidina con acarreador
Inhibición: 22 mm

D) Sistema dual
Inhibición: 13 mm

5.7.2 Sensibilidad De *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador

Se comparó inhibición de la sutura con sistema dual usando como referencia la sutura comercial con triclosán contra *S. aureus* observando que la zona de inhibición de triclosán fue mayor y se mantuvo con el tiempo a comparación de la sutura con sistema dual como se puede observar en la Tabla 5.4. Se puede observar que a partir del día 3 disminuye drásticamente la zona de inhibición del sistema dual (Gráfico 5.18).

Tabla 5.4 Zonas de inhibición contra *S. aureus*.

	Sistema dual diacetato con acarreador		Vicryl Plus
Dia	Zona de inhibición (mm)	Dia	Zona de inhibición (mm)
Dia 1	22.3	Dia 1	28
Dia 2	19.3	Dia 2	27.3
Dia 3	9.6	Dia 3	25.3
Dia 4	10.4	Dia 4	26
Dia 5	9.3	Dia 5	25.5

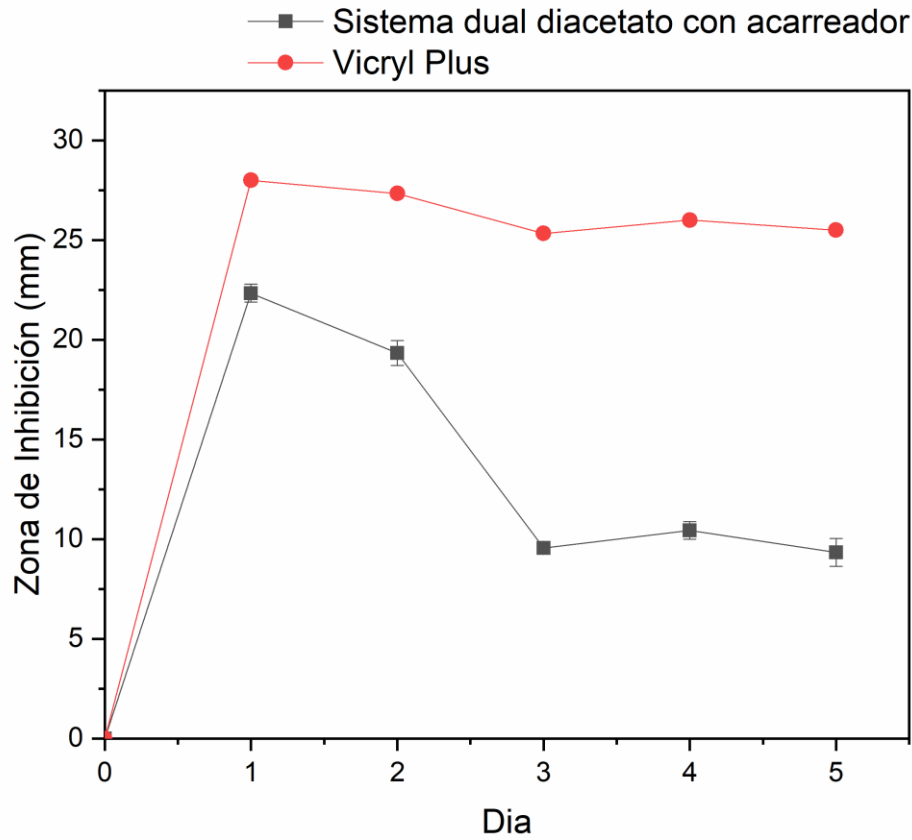


Gráfico 5.18 Inhibición de suturas contra *S. aureus*.

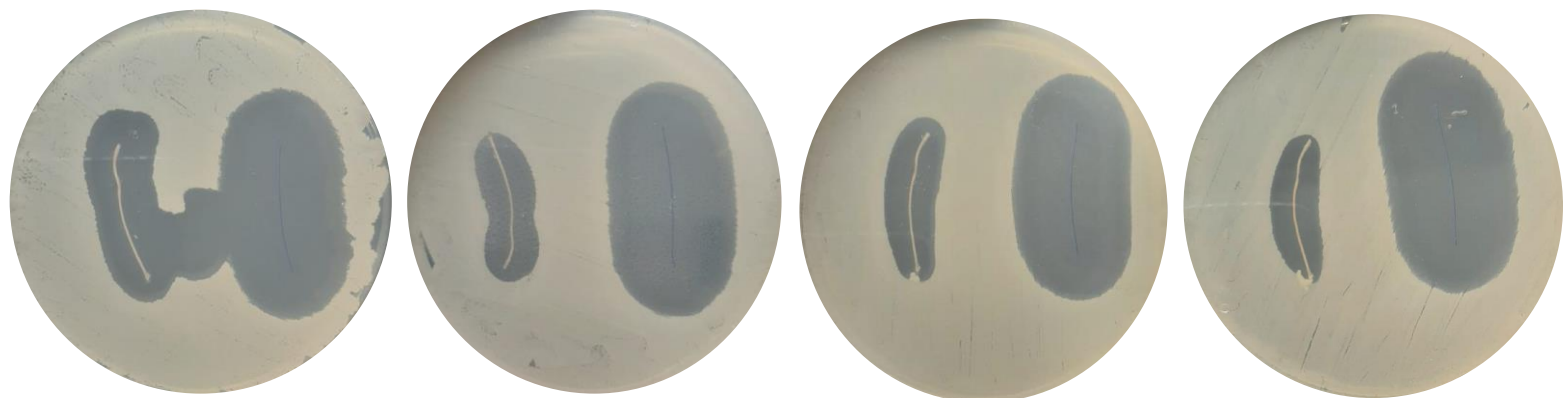


Imagen 5.2 Días de inhibición del 1al 4. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador.

5.7.3 Sensibilidad De *Escherichia coli* ATCC 25922 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador

Se comparó inhibición de la sutura con sistema dual usando como referencia la sutura comercial con triclosán contra *E. coli* observando que la zona de inhibición de triclosán fue un poco menor el primer día, pero se mantuvo similar con el tiempo a comparación de la sutura con sistema dual como se puede observar en la Tabla 5.5 inició con una zona de inhibición alta pero no se mantiene con el tiempo. Se puede observar que a partir del día 3 disminuye drásticamente la zona de inhibición del sistema dual a un poco menos de la mitad del día 2 (Gráfico 5.19).

Tabla 5.5 Zonas de inhibición contra *E. coli*

	Sistema dual diacetato con acarreador		Vicryl Plus
Día	Zona de inhibición (mm)	Día	Zona de inhibición (mm)
Día 1	23.3	Día 1	18.3
Día 2	14.8	Día 2	17
Día 3	8.9	Día 3	15
Día 4	6.6	Día 4	15.5

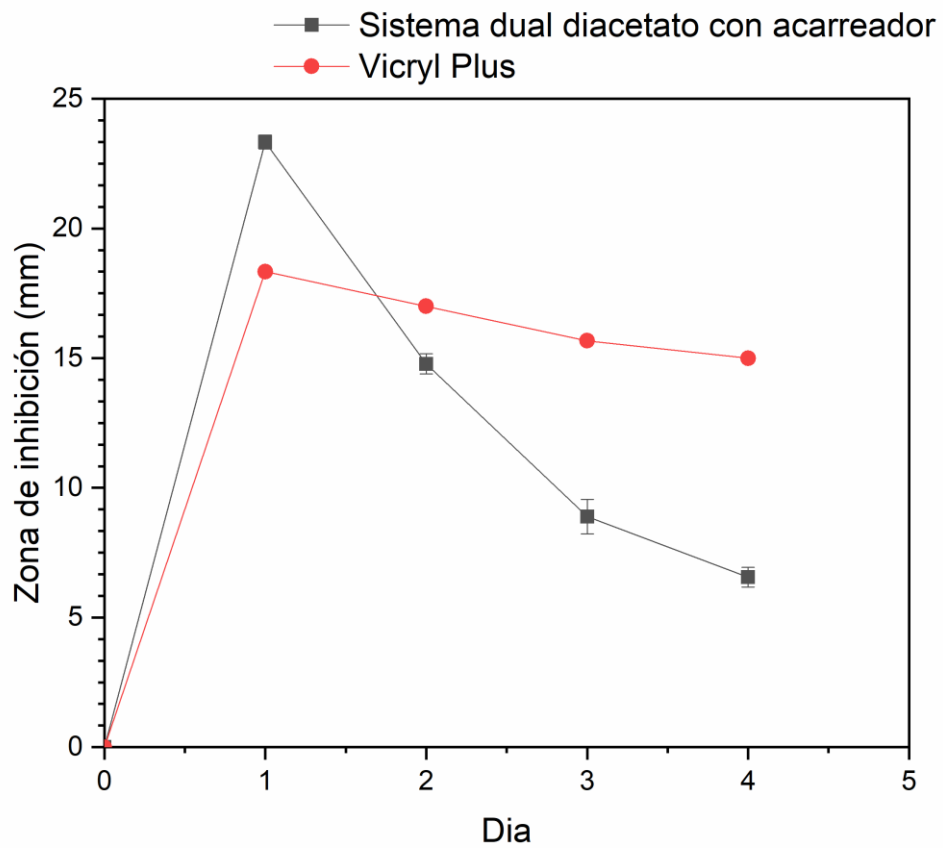


Gráfico 5.19 Inhibición de suturas contra *E. coli*.



Imagen 5.3 Días de inhibición del 1al 4. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador.

5.7.4 Sensibilidad De Meticiline Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador

Se comparó inhibición de la sutura con sistema dual usando como referencia la sutura comercial con triclosán contra *S. aureus* MRSA observando que no hubo zona de inhibición en la sutura recubierta con triclosán, en cambio la sutura recubierta con el sistema dual tuvo inhibición por 4 días como se puede observar en la Tabla 5.6. Inició con una zona de inhibición grande pero no se mantiene con el tiempo. Se puede observar que a partir del día 3 disminuye hasta ser casi imperceptible después de 4 días (Gráfico 5.20).

Tabla 5.6 Zonas de inhibición de *S. aureus* MRSA.

	Sistema dual diacetato con acarreador		Vicryl Plus
Dia	Zona de inhibición (mm)	Dia	Zona de inhibición (mm)
Dia 1	18.6	Dia 1	0
Dia 2	15.3	Dia 2	0
Dia 3	9	Dia 3	0
Dia 4	3	Dia 4	0

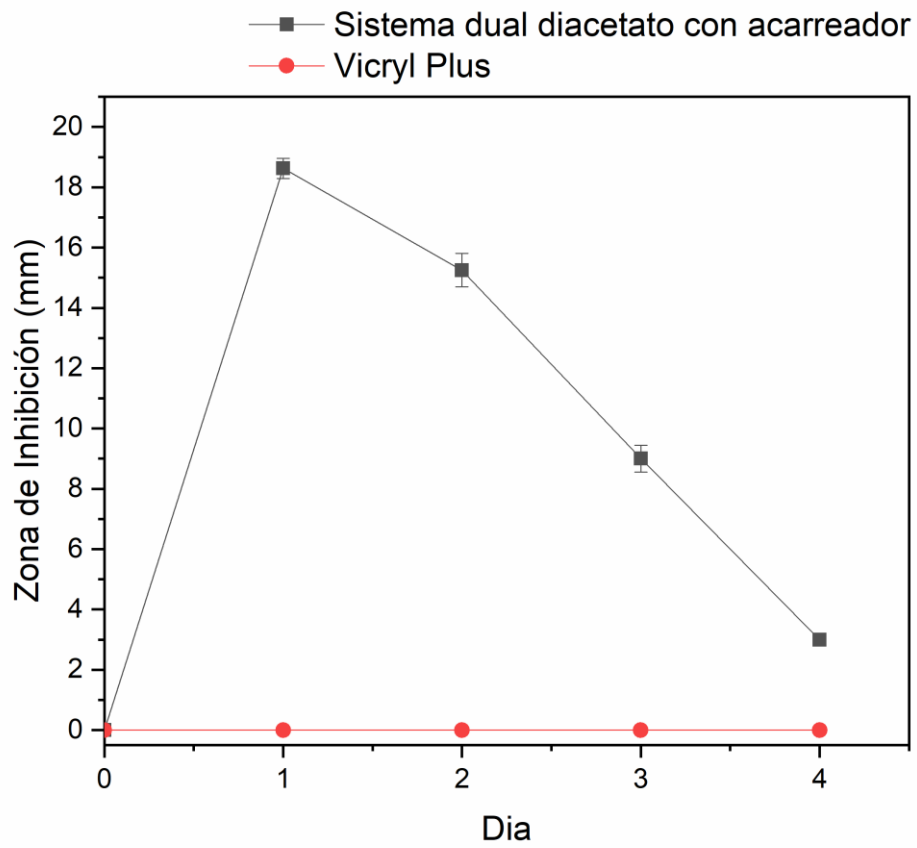


Gráfico 5.20 Inhibición de suturas contra MRSA.



Imagen 5.4 Días de inhibición del 1al 4. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador.

5.7.1 Sensibilidad De *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador

Se comparó inhibición de la sutura con sistema dual usando como referencia la sutura comercial con triclosán contra *P. aeruginosa* observando que no hubo zona de inhibición en la sutura recubierta con triclosán, en cambio la sutura recubierta con el sistema dual tuvo inhibición por 3 días como se puede observar en la Tabla 5.7. Inició con una zona de inhibición pequeña, pero al paso de los días aumenta. Se puede observar que a partir del día 2 aumenta la zona de inhibición y el día 3 de igual forma (Gráfico 5.21).

Tabla 5.7 Zonas de inhibición *P. aeruginosa*.

	Sistema dual diacetato con acarreador		Vicryl Plus
Día	Zona de inhibición (mm)	Día	Zona de inhibición (mm)
Día 1	5.4	Día 1	0
Día 2	11.8	Día 2	0
Día 3	12.7	Día 3	0

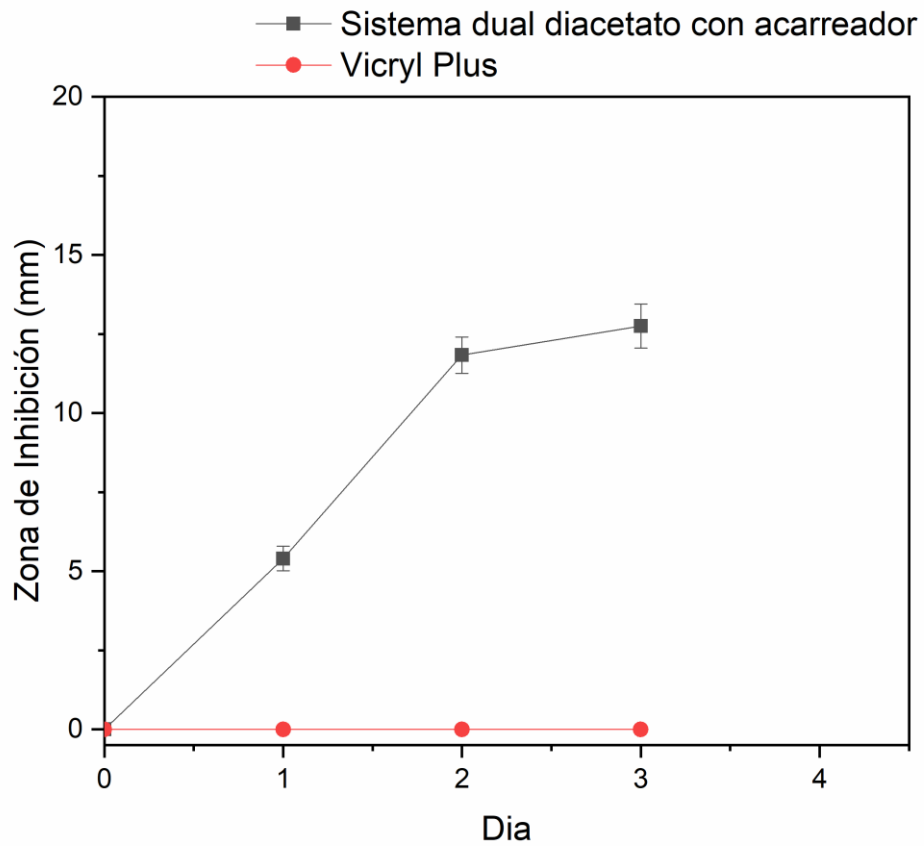


Gráfico 5.21 Inhibición de suturas contra *P. aeruginosa*.

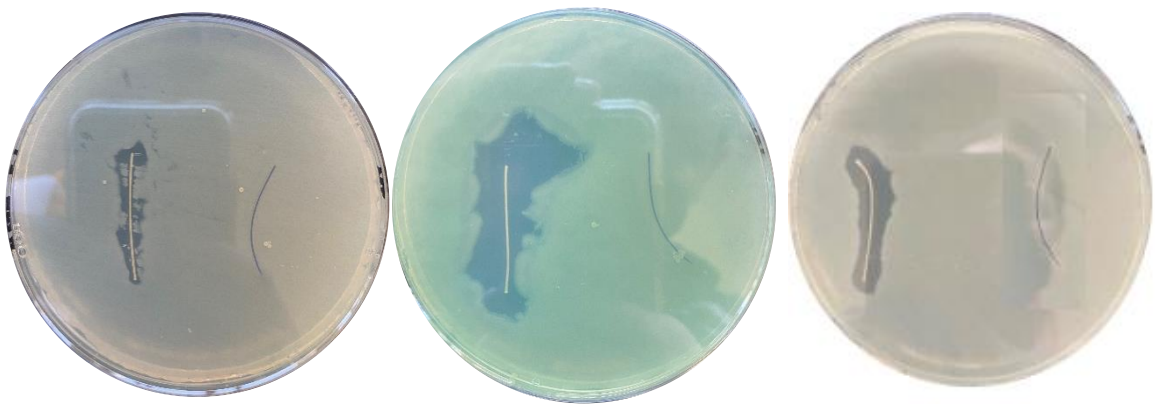


Imagen 5.5 Días de inhibición del 1 al 3. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador.

5.7.2 Sensibilidad De *Enterococcus faecalis* NCTC 775 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador

Las zonas de inhibición contra *E. faecalis* fueron mayores con el sistema dual comparado con la sutura con triclosán (Tabla 5.8), sin embargo, en ambos casos la inhibición visualmente se ve pequeña en las imágenes comparativas de ambos sistemas, por eso se muestra la imagen de los otros duplicados para que se aprecie mejor (Imagen 5.22).

Tabla 5.8 Zonas de inhibición *E. faecalis*.

	Sistema dual diacetato con acarreador		Vicryl Plus
Día	Zona de inhibición (mm)	Día	Zona de inhibición (mm)
Día 1	16.3	Día 1	7
Día 2	16.6	Día 2	10

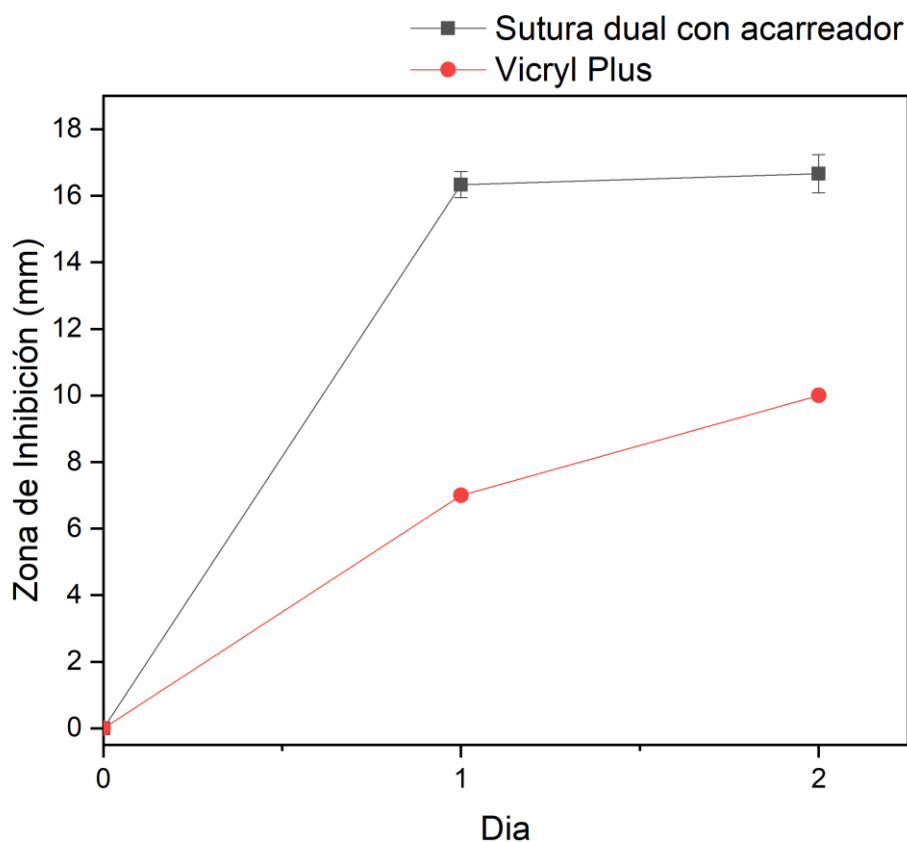


Gráfico 5.22 Inhibición de suturas contra *E. faecalis*.

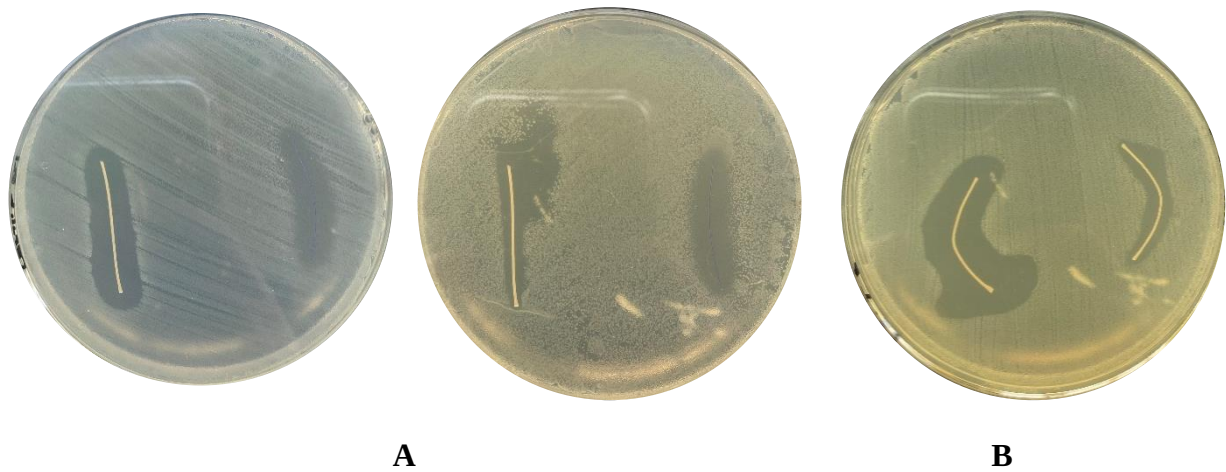


Imagen 5.6 Días de inhibición del 1al 2. Derecha: Vicryl plus Izquierda: Sutura sistema dual diacetato con acarreador (A). Dia 2 de duplicados de sistema dual (B).

5.7.1 Sensibilidad De *Candida albicans* ATCC 10231 Contra Sistema Dual De Diacetato De Clorhexidina Con Acarreador

Se realizó una prueba para verificar la capacidad de inhibir *C. albicans* con el sistema dual usando como referencia la sutura comercial con triclosán. Los resultados no mostraron una inhibición claramente visual (Imagen 5.7), no obstante, si había zonas de inhibición en las suturas duales (Tabla 5.9) y en sutura con triclosán no, lo cual es un resultado prometedor.

Tabla 5.9 Zonas de inhibición *C. albicans*

	Sistema dual diacetato con acarreador		Vicryl Plus
Dia 1	Zona de inhibición (mm)	Dia 1	Zona de inhibición (mm)
Sutura	4	Triclosán	0
Sutura 2	4		
Sutura 3	2		

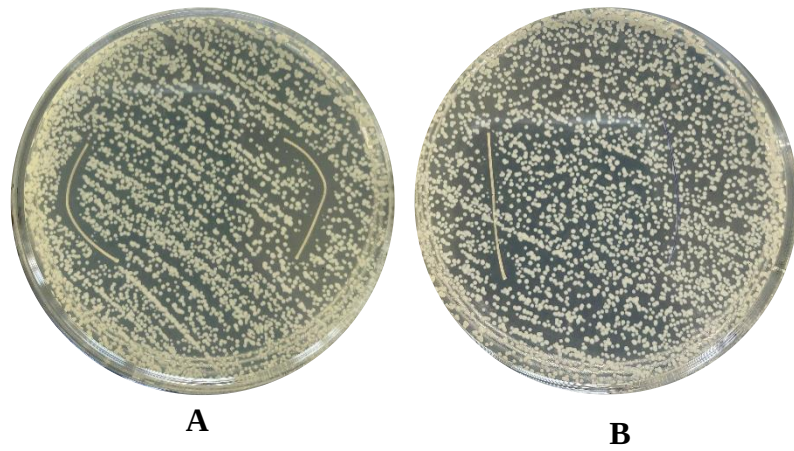


Imagen 5.7 Inhibición de suturas con sistema dual por triplicado (A, B) y sutura con triclosán (B) en parte derecha.

5.8. Evaluación De Viabilidad Celular

Se evaluó la viabilidad celular de ambas suturas por método directo e indirecto. Con ambos métodos se realizó la lectura de la placa a 405, 450y 620 nm. Se consideró la lectura a 620 nm ya que es la longitud de onda más cercana a 570 nm usada comúnmente para el análisis de datos de los ensayos de MTT, sin embargo en estudios realizados con suturas han llegado a utilizar un selector de 405 nm para la lectura de la placa, esto se resalta debido a que el método directo donde se colocó 1 cm de sutura en los pocillos de la placa de 96 pocillos al analizar los datos a 620 nm los datos indican que no hay viabilidad celular, sin embargo al analizar los datos a 405 nm se puede observar que todas las suturas están por encima del 70% de viabilidad celular (Gráfico 5.23).

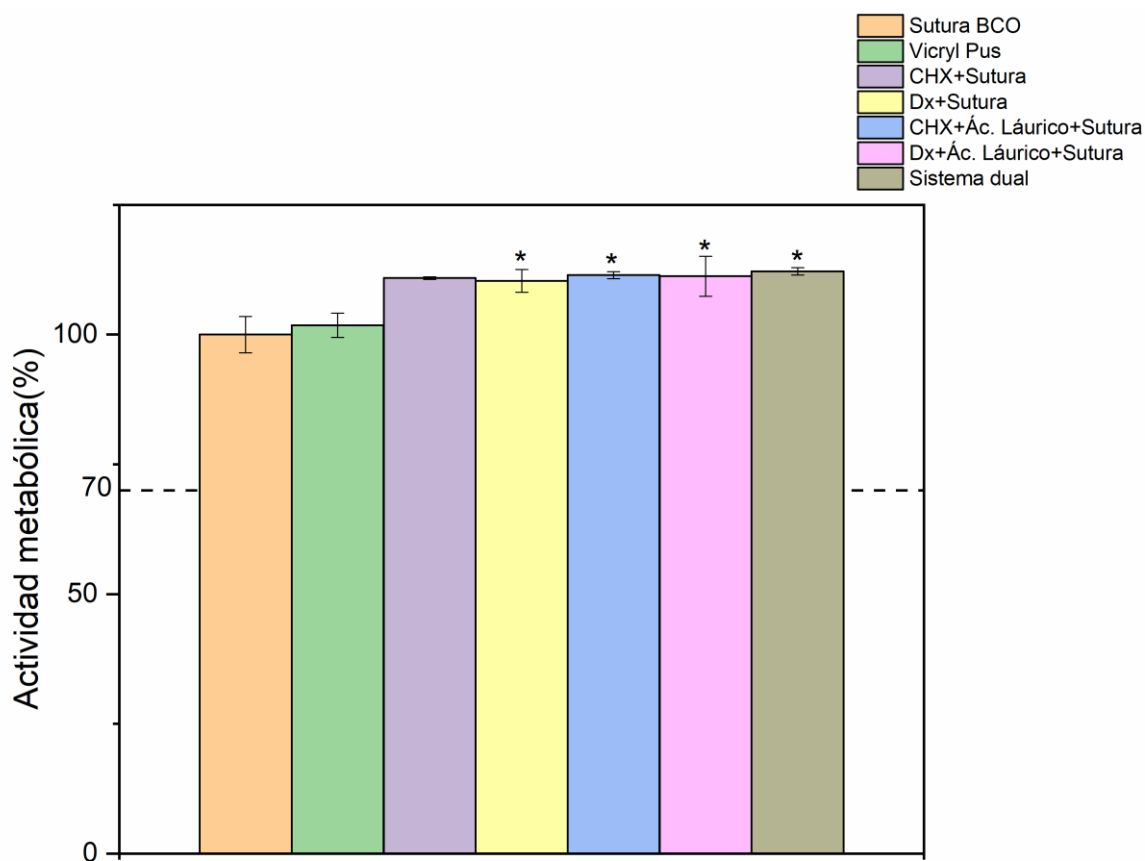


Gráfico 5.23 Actividad metabólica por método directo. El * por encima indica que las medias muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza comparadas con el control.

A pesar de que los resultados analizados de esta forma parecían prometedores se decidió hacerlo por método indirecto a 620 nm ya que era el más cercano a 570 nm ya que la mayoría de los artículos donde se trabaja con suturas recubiertas siguen esta metodología. Con el método de elución de la sutura colocando 100 μ L directo al pocillo se trató de ver si el fármaco liberado de la sutura podía ser perjudicial para las células y en caso de que fuera así se añadió un experimento extra donde se diluyó la elución a un 50% con medio DMEM para

verificar que en caso de que tuviéramos concentraciones muy altas ver si al disminuirla podríamos tener mejor viabilidad. El método con 100% de elución mostró que más del 70% las suturas con clorhexidina sola y clorhexidina con ácido láurico obtuvieron los porcentajes de actividad metabólica más bajo excluyendo el sistema dual lo que nos indica que posiblemente sea clorhexidina la responsable de disminuir la actividad celular en mayor parte que dexametasona (Gráfico 5.24).

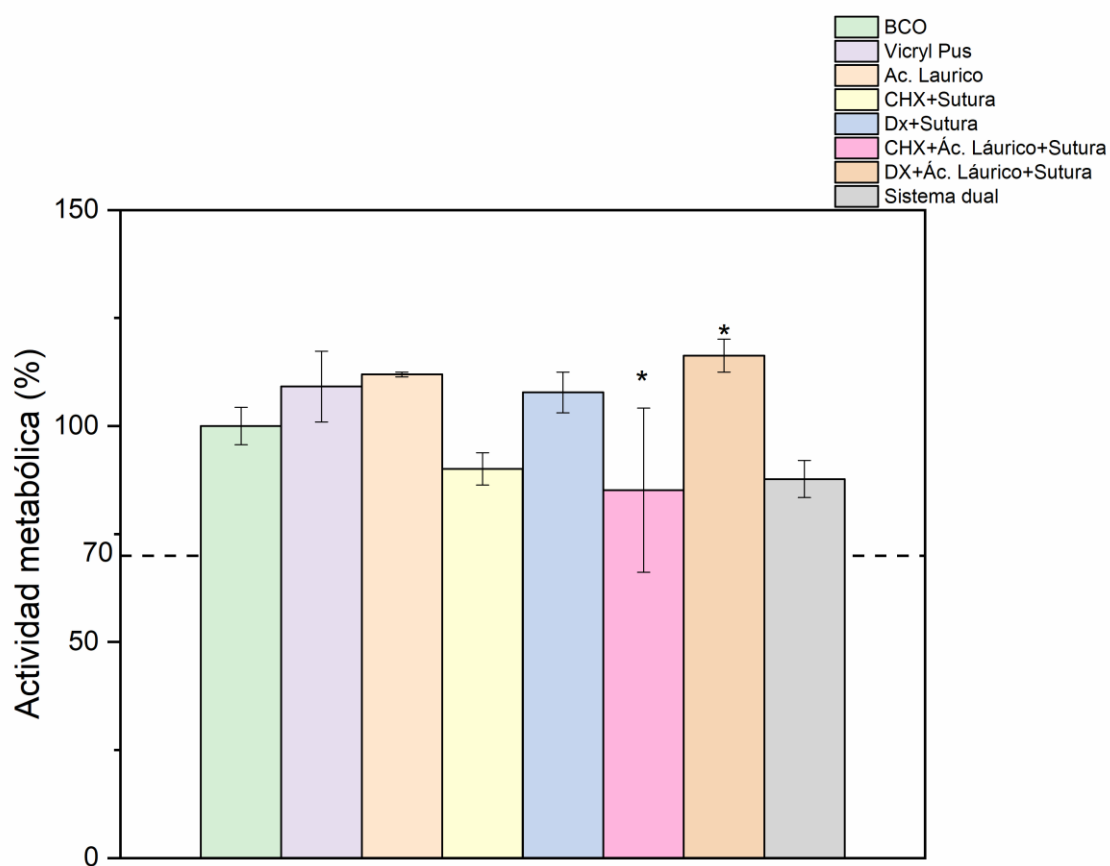


Gráfico 5.24 Actividad metabólica por método indirecto 100% de elución. El * por encima indica que las medias muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza comparadas con el control.

Con el método indirecto al 50:50 se obtuvo mayor porcentaje de actividad metabólica como se esperaba, en este caso el menor porcentaje fue de clorhexidina por si sola en la sutura (Gráfico 5.25).

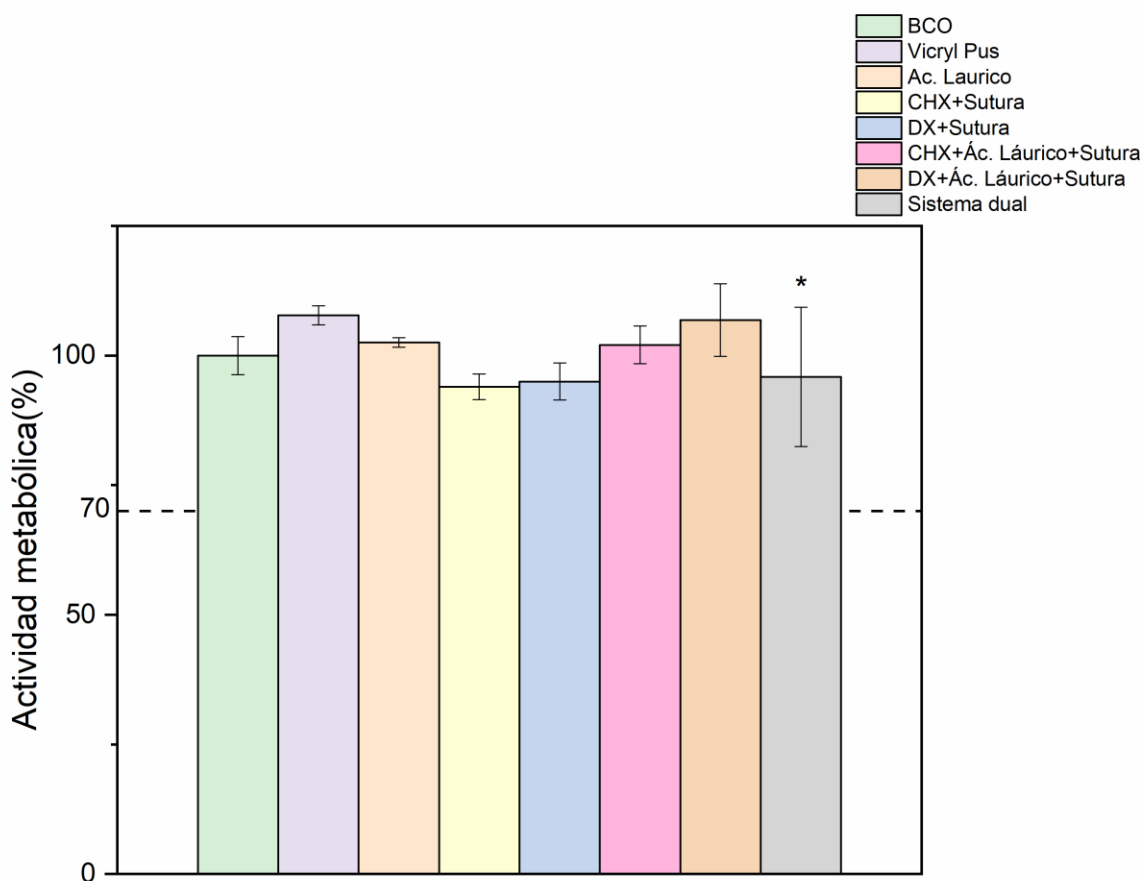


Gráfico 5.25 Actividad metabólica por método indirecto 50:50. El * por encima indica que la medias muestra diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza comparada con el control.

Capítulo 6. Conclusión

Se comprobó que la sutura si puede ser recubierta con el sistema dual por medio de recubrimiento por inmersión utilizando ácido láurico como acarreador, obteniendo condiciones de temperatura y de oscilación adecuadas para un recubrimiento óptimo, así como el método de secado que nos ayuda a mantener la mayor parte del fármaco impregnado en la sutura y no se pierda por absorción por alguna otra superficie con la que está en contacto la sutura durante el proceso. Se comprobó la presencia de ambos fármacos recubriendo la sutura al realizar un análisis cualitativo por método de espectroscopia de infrarrojo y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) así como se comprobó la liberación simultánea de ambos fármacos cuantificándolos también por CLAR. Se obtuvo una concentración promedio de 28 µg de diacetato de clorhexidina y 13 µg acetato de dexametasona por cuantificación con CLAR la cual demostró ser suficiente para inhibir los microorganismos Gram positivos y negativos, así como una inhibición menor en una levadura (*C. albicans*). El hecho de que la sutura con recubrimiento dual pudiera inhibir microorganismos que la sutura comercial no, son resultados prometedores para que sea un sistema que pueda beneficiar en reducir las infecciones del sitio quirúrgico, ya que las concentraciones fueron suficientes para inhibir los microorganismos en el test de sensibilidad con una considerable zona de inhibición. Se obtuvieron buenos resultados de viabilidad celular empleado el método indirecto el cual demostró que las suturas con el sistema dual presentan mayor actividad metabólica que incluso clorhexidina por si sola y son potenciales para aplicaciones en cirugía general como la sutura Vicryl que tiene amplias aplicaciones en diferentes tipos de cirugías ya que no se comprometió la estructura mecánica de la sutura

por el proceso de cargado al cual fue sometida, y presenta una fuerza tensil de 76 Newtons, que se encuentra dentro del límite mínimo para suturas absorbibles para el cierre en heridas lo que la hace aún más factible para poder replicar este recubrimiento en otros tipos de suturas multifilamento absorbibles como seda o poliéster.

Es necesario realizar pruebas para evaluar su actividad antiinflamatoria sin embargo comprobamos que existe dexametasona liberada en la prueba *in vitro* lo cual nos indica posible actividad antiinflamatoria. Las características ya mencionadas hacen al recubrimiento viable para ser un sistema de liberación con sistema dual antiinflamatorio y antimicrobial.

Capítulo 7. Bibliografía

- Ahuja, Satinder, and M. W. Dong. 2005. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Elsevier Academic Press.
- Alyami, F., N. Fernandez, M. A. Koyle, and J. P. Salle. 2019. “Keloid Formation after Pediatric Male Genital Surgeries: An Uncommon and Difficult Problem to Manage.” *Journal of Pediatric Urology* 15(1): 48.e1-48.e8.
- Anderson, James M. 2008. “Foreign Body Reaction to Biometarials.” *Semin Immunol.* 20(2): 86–100.
- Atole, Dipali M., and Hrishikesh H. Rajput. 2018. “Ultraviolet Spectroscopy and Its Pharmaceutical Applications- A Brief Review.” *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 11(2): 59–66.
- Attin, Thomas et al. 2008. “A New Method for Chlorhexidine (CHX) Determination: CHX Release after Application of Differently Concentrated CHX-Containing Preparations on Artificial Fissures.” *Clinical Oral Investigations* 12(3): 189–96.
[/pmc/articles/PMC3085775/](#) (May 27, 2021).
- Bedoux, Gilles et al. 2012. “Occurrence and Toxicity of Antimicrobial Triclosan and By-Products in the Environment.” *Environmental Science and Pollution Research* 19(4): 1044–65.
- Bowler, P. G., B. I. Duerden, and D. G. Armstrong. 2001. “Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management.” *Clinical Microbiology Reviews*

14(2): 244–69.

Caro Aragonés, M.A. Molina Castell. 2012. “Material de Sutura En La Farmacia

Hospitalaria.” *El Farmacéutico Hospitales* 199: 5–17.

https://gruposedetrabajo.sefh.es/gps/images/stories/publicaciones/articulo_suturas_farmacaceutico_hospitales.pdf.

Cekici, Ali, Alpdogan Kantarci, Hatice Hasturk, and Thomas E. Van Dyke. 2014.

“Inflammatory and Immune Pathways in the Pathogenesis of Periodontal Disease.”

Periodontology 2000 64(1): 57–80.

Champeau, Mathilde, Jean Michel Thomassin, Thierry Tassaing, and Christine Jérôme.

2017. “Current Manufacturing Processes of Drug-Eluting Sutures.” *Expert Opinion on*

Drug Delivery 14(11): 1293–1303. <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2017.1289173>.

CLSI. 2015. *M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.

Dahimiwal, S. M. et al. 2013. “A Review on High Performance Liquid Chromatography.”

International Journal of Pharmaceutical Research 5(3): 1–6.

De, D E Noviembre, Paule Kieny, Subdirectora General, and Estados Unidos. 2016. “OMS

| La OMS Recomendación 29 Formas de Detener Las Infecciones Quirúrgicas y Evitar

Microorganismos Multirresistentes.” *Who*: 12–14.

Farrill, Gregorio Zubieta O et al. 2016. “Uso de Antibióticos Preoperatorios y

Postoperatorios En El Departamento de Cirugía General de Un Hospital Privado y

Comparación Con Las Guías Actuales de Manejo Antimicrobiano.” (1).

- von Fraunhofer, J. A., R. J. Storey, and B. J. Masterson. 1988. "Tensile Properties of Suture Materials." *Biomaterials* 9(4): 324–27.
- "FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR) | Thermo Fisher Scientific - MX." <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html> (January 4, 2021).
- Grela, Ewa, Joanna Kozłowska, and Agnieszka Grabowiecka. 2018. "Current Methodology of MTT Assay in Bacteria – A Review." *Acta Histochemica* 120(4): 303–11.
- Guo, S., and L. A. DiPietro. 2010. "Critical Review in Oral Biology & Medicine: Factors Affecting Wound Healing." *Journal of Dental Research* 89(3): 219–29.
- Hayes, A Wallace, and Claire L Kruger. 2014. "Hayes ' Principles Methods of Toxicology Hayes ' Principles Methods of Toxicology."
- Herrera, Marco Luis. 1999. "Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana: Metodología de Laboratorio." *Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera* 34: 33–41. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010 (November 30, 2020).
- "Human Metabolome Database: Showing Metabocard for Dexamethasone (HMDB0015364)." <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0015364> (February 28, 2020).
- Jun, K. I. et al. 2019. "Chlorhexidine Sensitivity in Staphylococci Isolated from Patients with Central Line-Associated Bloodstream Infection." *Journal of Hospital Infection* 103(3): 276–79. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670119303020>

(February 17, 2020).

Kalarikkal, Nandakumar et al. 2017. “Polymer Sutures for Simultaneous Wound Healing and Drug Delivery – A Review.” *International Journal of Pharmaceutics* 524(1–2): 454–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.041>.

Keerthisinghe, Tharushi P., Luong N. Nguyen, Eilhann E. Kwon, and Seungdae Oh. 2019. “Antiseptic Chlorhexidine in Activated Sludge: Biosorption, Antimicrobial Susceptibility, and Alteration of Community Structure.” *Journal of Environmental Management* 237: 629–35.

Kehlet, Henrik, Troels S Jensen, Cliff J Woolf, and Marie Centre. 2006. “Persistent Postsurgical Pain: Risk Factors and Prevention.” 367.

Llombart M., Joglar, C., Delgado, T & Cirilo, A. 2004. “Estrategias Generales de La Farmacomodulación.” In *Introducción a La Química Terapéutica*, ed. Diaz de Santos. Madrid, 119–26.
<https://books.google.com.mx/books?id=BiK5BgAAQBAJ&pg=PA124&lpg=PA124&dq=polimero+profarmaco&source=bl&ots=eyMoBDI4Qi&sig=ACfU3U2AdOWNyBITgi5YhlnPt-cIwweYIw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjEoPiChP7gAhWRjp4KHStCCwUQ6AEwAnoECACQAQ#v=onepage&q&f=false>.

Maged, Ahmed M. et al. 2018. “Comparison of Local and Intra Venous Dexamethasone on Post Operative Pain and Recovery after Caesarean Section. A Randomized Controlled Trial.” *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 57(3): 346–50.

Mahajan, Supriya D. et al. 2012. 509 Methods in Enzymology *Nanoparticle-Mediated*

- Targeted Delivery of Antiretrovirals to the Brain*. 1st ed. Elsevier Inc.
- <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00003-4>.
- Maitz, M.F. 2015. “Applications of Synthetic Polymers in Clinical Medicine.” *Biosurface and Biotribology* 1(3): 161–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>.
- Mana, Thriveen Sankar Chittoor et al. 2019. “Preliminary Analysis of the Antimicrobial Activity of a Postoperative Wound Dressing Containing Chlorhexidine Gluconate against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in an in Vivo Porcine Incisional Wound Model.” *American Journal of Infection Control* 47(9): 1048–52.
- Müllertz, Anette, Yvonne Perrie, and Thomas Rades. 2016. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*. Springer.
- Nam, Ki Young, and Chul Jae Lee. 2012. “Characterization of Silver Nanoparticles Incorporated Acrylic-Based Tissue Conditioner with Antimicrobial Effect and Cytocompatibility.” In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*, Elsevier Inc., 283–95.
- Obermeier, Andreas et al. 2014. “Novel High Efficient Coatings for Anti-Microbial Surgical Sutures Using Chlorhexidine in Fatty Acid Slow-Release Carrier Systems.” *PLoS ONE* 9(7).
- Osorio, M et al. 2017. “Biomedical Applications of Polymeric Biomaterials.” *Dyna* 84(201): 241–52. <http://dx.doi.org/10.15446/dyna.v84n201.60466>.
- Perkampus, Heinz-Helmut. 1992. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. Springer Berlin Heidelberg.
- Rishabha, Malviya, Bansal V, Pal O.P., and Sharma P.K. 1995. “HIGH PERFORMANCE

LIQUID CHROMATOGRAPHY: A SHORT REVIEW.” *Journal of Global Pharma Technology* (May): 23–30.

Rose, Jessica, and Faiz Tuma. 2020. StatPearls *Sutures And Needles*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30969713> (February 27, 2020).

Sánchez Rojas, F., and C. Bosch Ojeda. 2009. “Recent Development in Derivative Ultraviolet/Visible Absorption Spectrophotometry: 2004-2008. A Review.” *Analytica Chimica Acta* 635(1): 22–44.

Şen, Özlem, Melis Emanet, and Mustafa Çulha. 2016. “Biocompatibility Evaluation of Boron Nitride Nanotubes.” *Boron Nitride Nanotubes in Nanomedicine*: 41–58.

Sevene, Esperança. 2003. *A Guide to Detecting and Reporting Adverse Drug Reactions*.

Shi, Chao, Jianyu Zhu, and Degang Yang. 2017. “The Pivotal Role of Inflammation in Scar/Keloid Formation after Acne.” *Dermato-Endocrinology* 9(1): e1448327.

Smith, Brian C. 2011. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press.

“Sutura VICRYL® (Poliglactina 910) Recubierta | Ethicon Latin America, Spanish.”
<https://www.ethicon.com/latam/es/productos/cierre-de-heridas/suturas-absorbibles/sutura-vicryl> (November 19, 2019).

Tecnoquímicas. “Mononografía Duo-Decadron.”
<https://www.tqfarma.com/literaturas/duodecadron/monografia.pdf> (April 6, 2021).

Upadhyay S U, Patel V B, Patel A A, Upadhyay U M, Patel N M, Sachin Singh, and Pramod. 2012. “SIMULTANEOUS ESTIMATION OF CHLORHEXIDINE AND

- TRIAMCINOLONE BY HPLC.” *Pharma Science Monitor* (3): 2085–2104.
- Vel, Sonsoles. 2014. “Diseño y Desarrollo de Una Novedosa Estrategia Profármaco Basada En La Enzima DPPIV/CD26.” *Anales de Química* 26: 195–203.
- Weiner-Lastinger, Lindsey M. et al. 2020. “Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Adult Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017.” *Infection Control & Hospital Epidemiology* 41(1): 1–18.
- Wu, Wen Sheng et al. 2006. “Dexamethasone Induction of Keloid Regression through Effective Suppression of VEGF Expression and Keloid Fibroblast Proliferation.” *Journal of Investigative Dermatology* 126(6): 1264–71.
- Zaballos, P et al. 2001. “Los Queloides y Las Cicatrices Hipertróficas.” *Med Integr* 38(9): 385–89.
- Zhang, Yizhi et al. 2019. “Chlorhexidine Exposure of Clinical *Klebsiella Pneumoniae* Strains Leads to Acquired Resistance to This Disinfectant and to Colistin.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 53(6): 864–67.
- Zhou, Jun et al. 2013. “In Vivo Evaluation of Medical Device-Associated Inflammation Using a Macrophage-Specific Positron Emission Tomography (PET) Imaging Probe.”

Capítulo 8. Anexos

8.1. Anexo I Rectas De Calibración

