



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Licenciatura en Ingeniería en Nanotecnología



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN COMPÓSITO QUITOSANO-
NEOMICINA PARA APLICACIONES EN REGENERACIÓN CUTÁNEA.**

Opción de titulación

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Yosafat Elías Gutiérrez Guerrero

Dirigido por:

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

SINODALES

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Presidente

Firma

Dra. Liliana Beatriz España Sánchez

Secretario

Firma

Dr. Carlos Guzmán Martínez

Vocal

Firma

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

Resumen.

El presente trabajo describe la síntesis y caracterización de una película compuesta por una mezcla de quitosano y neomicina con potenciales aplicaciones en el tratamiento de heridas e infecciones sobre la piel. En una primera fase, se desarrolló un procedimiento para la elaboración de las películas que fuera sencillo y conservar las propiedades regenerativas y antibióticas de sus constituyentes. Se realizó un análisis de Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR), que reveló que existía una interacción entre los grupos amino del quitosano y los grupos alcohol secundarios de la neomicina, interacción que interfiere con la formación de puentes de hidrogeno entre las cadenas de quitosano. Las imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido (SEM) mostraron que la adición de diferentes concentraciones de neomicina cambia significativamente la topografía de las películas, obteniéndose una superficie más rugosa cuanto menor sea la concentración de neomicina agregada, y viceversa. En los análisis de actividad antimicrobiana, los materiales probados demostraron eliminar con mayor eficiencia las cepas elegidas para este estudio, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, comparadas con los precursores del compósito. Los ensayos de Viabilidad Celular demostraron que el compósito no muestra efectos citotóxicos en los fibroblastos JB cutáneos y estos proliferan de manera regular en el compósito.

Abstract

The present work describes the synthesis and characterization of a film composed of a mixture of Chitosan and Neomycin with potential applications in the treatment of wounds and infections on the skin. To begin with, a procedure was developed for the elaboration of the films that was simple and conserved the regenerative and antibiotic properties of its constituents. Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis was performed, which revealed that there was an interaction between the amine groups of Chitosan and the secondary alcohol groups of Neomycin, an interaction that interferes with the formation of hydrogen bonds between the Chitosan chains. The images obtained by scanning electron microscopy (SEM) revealed that the addition of different concentrations of Neomycin drastically changes the topography of the films, obtaining a rougher surface at the lower concentration of Neomycin added, and vice versa. In the antimicrobial activity analyzes, the tested materials demonstrated to eliminate more efficiently the strains chosen for this study, *Staphylococcus Aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa*, compared to the precursors of the composite. The Cell Viability assays demonstrated that the composite does not show cytotoxic effects on cutaneous JB fibroblasts and these proliferate regularly in the composite.

Agradecimientos.

Agradezco a mi padre por haberme dado todo lo indispensable, y también lo que no necesariamente era indispensable, para poder estudiar mi carrera, eres tú la razón por la que he decidido ser ingeniero pues tu siempre me has enseñado que ser ingeniero es razón de orgullo. Jamás olvidare las palabras que me dijiste sobre lo que significa ser un ingeniero, palabras que me han guiado a hoy ser el segundo Ingeniero Gutierrez de la familia, "Un ingeniero, se las ingenia". Me has enseñado que el conocimiento es lo más valioso que uno puede conseguir, y en aras de esta enseñanza que me has legado, no me detendré en mi esfuerzo por amasar más conocimiento.

Agradezco a mi madre por apoyarme, cuidarme, alimentarme, curarme, protegerme, y bueno básicamente por asegurarse de que pudiera vivir lo suficiente como para poder cuidarme casi solo. Junto a mi madre he pasado muchas situaciones difíciles, principalmente enfermedades para ser honesto, y en mi larga tendencia a sufrir de enfermedades tú siempre has estado para cuidarme, y ahora que por fin termino mi carrera y apunto a irme lejos del nido en búsqueda de conocimiento, sé que tengo la fuerza para sobrevivir por mí mismo gracias a ti.

Agradezco al Doctor Elizalde, mi asesor de Tesis, mi maestro, mi guía en la universidad, un hombre que respeto profundamente por todo el conocimiento que posee y que ha compartido conmigo. No imagino literalmente a ningún otro Doctor capaz de tener tanta paciencia como usted ha debido tener conmigo, usted me recibió en su laboratorio teniendo yo una alta tendencia a cometer errores, a desafiar las reglas, y de vez en cuando, a incendiarme accidentalmente con la lampara de alcohol. Pero es gracias a su paciencia y su guía que ahora puedo decir, que ahora no representa un riesgo a la integridad de nadie mi presencia en un laboratorio. Más que solo un maestro, más que solo un asesor, es usted un gran amigo.

Agradezco a mis amigas Tonantzi y Yunnuen quienes me ayudaron constantemente cuando me atoraba mientras escribía mi tesis, cuando no sabía que más escribir, ellas me apoyaron y aconsejaron, me ayudaban a recuperar la inspiración y seguir escribiendo cuando ya no daba más mi cerebro.

Agradezco a la Dra. Liliana España Sánchez por su ayuda, apoyo, conocimiento y, sobre todo, paciencia para poder hacer las pruebas de actividad Antimicrobiana.

Agradezco al Dr. Rodrigo Velázquez Castillo por prestarme sus equipos de Rayos X y su reómetro, aun cuando los resultados no fueron favorables.

Agradezco a la Dra. Sandra Rivas Gandara por prestarme su conocimiento y sus equipos para la realización de las microscopias electrónicas de barrido.

Agradezco a la MC Aracely Mauricio, y el Dr. Gabriel Luna por realizar los análisis de espectro infrarrojo en su equipo.

Agradezco a la Dra. María José Rivas Arreola y a mi compañera Tonantzi Pérez Moreno por realizar los análisis de citotoxicidad.

Agradezco a la MC Luz Ma Avilés Arellano por prestarme su conocimiento y sus equipos de Difracción de Luz y Foto-acústica, aunque los resultados no fueron favorables.

1 ÍNDICE.

2	Introducción.....	5
3	Marco teórico.....	6
3.1	Piel.....	6
3.1.1	Lesiones comunes de la piel.....	7
3.1.2	Cicatrización.....	10
3.2	Biomateriales.....	11
3.2.1	Biomateriales para la piel.....	12
3.3	Quitina.....	12
3.3.1	Quitosano.....	13
3.4	Neomicina.....	18
3.4.1	Farmacología de la neomicina.....	18
4	Justificación.....	20
5	Hipótesis.....	21
6	Objetivos.....	21
6.1	Objetivo General.....	21
6.2	Objetivos particulares.....	21
7	Procedimiento experimental.....	22
7.1	Materiales.....	22
7.2	Síntesis del compuesto.....	22
7.2.1	Diagrama de flujo del procedimiento.....	23
7.3	Técnicas de caracterización.....	24
7.3.1	Espectrometría Infrarroja con la Transformada de Fourier (FTIR).....	24
7.3.2	Microscopio electrónico de Barrido (SEM).....	24
7.3.3	Análisis de Actividad Antimicrobiana.....	25
7.3.4	Análisis de Viabilidad Celular por ensayo MTT.....	26
8	Resultados.....	29
8.1	Análisis de FTIR.....	29
8.2	Análisis De Microscopio Electrónico de Barrido.....	32
8.3	Análisis de Actividad Antimicrobiana.....	38
8.4	Análisis de Viabilidad Celular.....	39
9	Conclusión.....	42
10	Bibliografía.....	43

2 INTRODUCCIÓN.

La piel es uno de los órganos más complejos e importantes del cuerpo; compone la primera barrera de defensa del sistema inmune, es la principal responsable de la regulación de la temperatura corporal, es el responsable del sentido del tacto.

Sin embargo, la piel es vulnerable y no es ajena a los ataques por parte de agentes patógenos, y al ser el órgano con mayor exposición al exterior del cuerpo, recibe continuamente daños, raspones, cortadas, golpes y enfermedades; aunque la piel tiene grandes capacidades regenerativas, se han buscado, a lo largo de la historia desarrollar métodos para ayudar a la recuperación/regeneración de esta de una forma eficiente desde el inicio de la medicina. El primer avance del que se tiene conocimiento en el tratamiento padecimientos de la piel fue el uso de plantas; que, aunque para los humanos de la prehistoria su efecto se debía a razones mágicas/espirituales, en realidad tenían sustancias que inhibían el crecimiento bacteriano o que fomentaban el proceso de cicatrización, lo que se veía reflejado en una recuperación rápida, así el hombre primitivo aprendió que triturando ciertas plantas y poniéndolas en las heridas podía evitar sufrir de una infección.

Ahora, en los tiempos modernos se ha dado el siguiente salto en el tratamiento de la piel, promover el proceso de regeneración cutánea mediante el uso de compuestos que fomentan el crecimiento de las células de la piel de manera más rápida y eficiente.

Por eso en este trabajo se abordará la generación de un compósito conformado por dos materiales, uno con propiedades bactericidas, y otro con propiedades regenerativas; por un lado, la neomicina, un antibiótico común usado ampliamente en el tratamiento de algunos tipos de dermatitis, y por el otro el quitosano; un biopolímero derivado de la quitina presente en los caparazones de insectos y crustáceos, con una comprobada capacidad regenerativa en animales.

3 MARCO TEÓRICO.

3.1 PIEL.

La piel y sus derivados; cabello, uñas, glándulas sebáceas y sudoríparas, conforman el sistema tegumentario, como se puede ver en la Ilustración 1. Las principales funciones de la piel son:

- La protección de los órganos internos: Protege al organismo de factores externos como bacterias, sustancias químicas y temperatura. Las secreciones de la piel pueden destruir bacterias y además contiene Melanina, que es un pigmento químico que sirve como defensa contra los rayos ultravioleta que pueden dañar las células de la piel.
- La regulación de la temperatura corporal: Mediante mecanismos como son la sudoración y la vasodilatación puede enfriar el organismo, y mantenerlo caliente mediante la vasoconstricción.¹

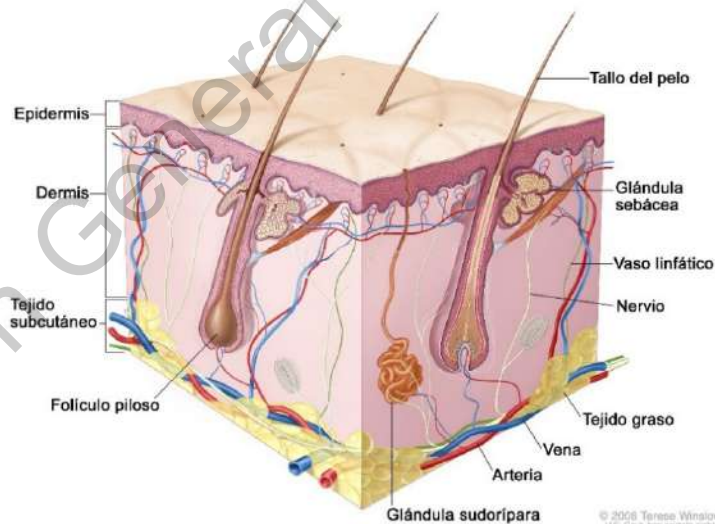


Ilustración 1: Capas de la piel.

La función de barrera cutánea se logra mediante capas de queratinocitos diferenciados que se fusionan en una lámina epidérmica estrechamente integrada. La capa dérmica inferior y más gruesa consiste en fibras de colágeno que, en su

superficie superior, forman una zona especializada de la membrana basal (BM) para la fijación segura de los queratinocitos a la dermis. La dermis está vascularizada y contiene receptores para el tacto, la temperatura y el dolor, así como los folículos pilosos y los conductos sudoríparos, este último revestido de queratinocitos que contribuyen a la regeneración epidérmica.²

La piel es uno de los órganos con mayor capacidad regenerativa, pues no solo es continuamente regenerada, el organismo todo el tiempo está preparando la siguiente capa de piel mientras la última capa de piel va siendo erosionada por el ambiente, además, el cuerpo es capaz de reparar cualquier excoriación, cortada o perforación que pueda recibir en diferentes circunstancias. En caso de que la piel reciba un daño menor, la piel sana que rodea la herida es capaz de contraerse para cerrar la herida, es por esto que muchas veces cuando la piel es perforada por una aguja delgada ni siquiera se aprecia sangrado, pues la piel se ha contraído para cerrar la herida rápidamente, en caso de recibir un daño mayor las plaquetas presentes en los vasos sanguíneos de la piel, células especializadas en cerrar rápidamente heridas mediante la coagulación, actuarán evitando la pérdida de sangre y la entrada de agentes externos al cuerpo; en caso de que la herida sea demasiado extensa el cuerpo mandará rápidamente más plaquetas a través del torrente sanguíneo para favorecer la coagulación de la sangre en la herida para detener el sangrado.^{3,4}

3.1.1 Lesiones comunes de la piel.

3.1.1.1 Heridas.

Las heridas son lesiones que tienen una solución de continuidad, apertura o ruptura de la dermis, y hay diferentes tipos, tales como:

- Heridas cortantes: Estas se caracterizan por tener bordes nítidos, suelen ser más largas que profundas.
- Heridas cortopunzantes: Estas se caracterizan por tener bordes nítidos con leve hemorragia perilesional, suelen presentar un solo ángulo agudo, tienden a ser más profundas que largas.

- Heridas punzantes: Estas suele presentarse como orificios redondeados o rectangulares, de bordes irregulares, tienen mayor hemorragia perilesional.
- Heridas corto-contundentes o laceración: Estas pueden tener puentes dérmicos, pueden tener bordes nítidos o irregulares, son profundas incluso comprometen hueso, de forma regular o irregular, los bordes pueden ser macerados, abrasivos o equimóticos, hemorragia perilesional de moderada a severa.⁵

3.1.1.2 Lesiones por fricción.

De este tipo de lesiones existen dos categorías:

- Abrasión: es una lesión donde las capas superficiales de la piel se levantan, pueden llegar a comprometer dermis, son anchas.
- Excoriación: es una lesión donde la epidermis se levanta, son lineales.⁵

3.1.1.3 Infecciones.

Una infección se define como la presencia y multiplicación de un agente patógeno en los tejidos del huésped. Desde un punto de vista microbiológico, se estudian de acuerdo con los agentes etiológicos responsables. Los principales agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas humanas corresponden a uno de los siguientes grupos:

- Priones: Son los agentes infecciosos más sencillos conocidos: una simple molécula de proteína. No contienen ácidos nucleicos ni información genética.
- Virus: Contienen proteínas y ácidos nucleicos, transportando la información genética para su propia replicación, para lo que utiliza la maquinaria celular.
- Bacterias: Recubiertos por una membrana celular y en algunas bacterias además por una pared celular. Son capaces de una replicación totalmente autónoma.
- Eucariontes: Presentan elevada complejidad celular con compartimentos subcelulares con funciones especializadas.⁶

Las manifestaciones cutáneas de una infección bacteriana pueden producirse por varios mecanismos fundamentales.

- Infección local primaria con replicación in situ de la bacteria, como impétigo.
- Exotoxinas circulantes: síndrome de la piel escaldada estafilocócica.
- Mecanismos inmunológicos, como vasculitis en infección estreptocócica.
- Afectación de la piel como parte de un cuadro sistémico: sepsis meningocócica.
- Manifestación de una coagulopatía intravascular diseminada, como ocurre también en la sepsis meningocócica o en algunas infecciones por *Rickettsia*.

Las infecciones de piel y partes blandas se definen según la localización de estas, independientemente del microorganismo que las produce, como se muestra en la Tabla 1.⁷

Tabla 1: Tipo de infección cutánea y de partes blandas según la localización.⁷

Tipo de infección	Bacteria causante	Localización
Impétigo	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	Epidermis
Ectima	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	Epidermis y Dermis
Foliculitis	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomona Aeruginosa</i>	Folículo piloso-superficial.
Forúnculo	<i>Staphylococcus aureus</i>	Folículo piloso-profundo.
Hidrosadenitis	Varias	Folículo pilosebáceo glándulas apocrinas.
Erisipela	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Dermis-TCS.
Celulitis	<i>Staphylococcus aureus</i>	Dermis-TCS (más profunda).

3.1.2 Cicatrización.

Hay dos tipos de cicatrización, de primera intención, que tiene lugar durante las primeras 12-24 horas después de haber sido cerrada la herida al aproximar sus bordes con suturas, cintas, etc., y de segunda intención, el cual se caracteriza porque no se alcanza a regenerar la arquitectura normal de la piel, debido a la pérdida extensiva de tejido por un trauma severo o quemadura, y cuyo tiempo de resolución dependerá de la gravedad del daño.⁸

El proceso de cicatrización puede resumirse en 3 fases: Fase inflamatoria, Fase Proliferativa y Fase de Maduración.⁴

3.1.2.1 Fase Inflamatoria.

En la fase inflamatoria, las bacterias y detritus son fagocitados y eliminados, y numerosos factores son puestos en marcha para causar la migración y división de las células que serán parte de la fase proliferativa. Inicialmente, se presenta coagulación para detener la hemorragia, y varios factores activados para atraer las células que fagocitan los detritus, las bacterias y el tejido dañado, y que además liberan factores que inician la fase proliferativa.⁴

3.1.2.2 Fase Proliferativa.

Es caracterizada por angiogénesis, deposición de colágeno, formación de tejido de granulación, epitelización y contracción de la herida. En la angiogénesis, nuevos vasos sanguíneos crecen a partir de las células endoteliales. En la formación de tejido de granulación y fibroplastia, los fibroblastos crecen y forman una nueva matriz extracelular por excretando colágeno y fibronectina. Alrededor de dos o tres días después de que se presenta la herida, los fibroblastos empiezan a ingresar a la herida, incluso antes de que la fase inflamatoria haya terminado completamente.⁴

3.1.2.3 Fase de Maduración.

En la maduración, el colágeno es realineado a lo largo de las líneas de tensión; las células que no se requieren más son removidas por apoptosis. La fase de maduración puede durar un año o más, dependiendo del tamaño de la herida y si esta fue cerrada o dejada abierta. Durante la maduración, el colágeno tipo III, que

es abundante durante la proliferación, se degrada y en cambio se deposita colágeno tipo I gradualmente, que es más resistente a la tensión. Así, la fuerza de tensión de la herida se incrementa a un 50% del tejido normal por los tres meses de la herida y al final alcanza una fuerza de tensión hasta un 80% del tejido normal. Como la actividad se reduce, la cicatriz entonces pierde su apariencia rojiza, ya que los vasos sanguíneos son removidos por apoptosis.⁴

3.2 BIOMATERIALES.

Un biomaterial está definido como una sustancia o conjunto de sustancias artificiales o naturales, que pueden ser usadas por un período de tiempo como parte de un sistema, el cual trata de curar, mejorar o reemplazar un órgano, un tejido o una función del cuerpo.⁹

Uno de los objetivos en el campo de los biomateriales es fabricar matrices que imiten la estructura y la función biológica de la matriz extracelular (ECM). La ECM es un conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido, y se han probado diferentes biomateriales como ECM basados en dos tipos principales de macromoléculas, glicosaminoglucuronanos y proteínas; como colágeno y fibronectina, que en conjunto forman una estructura densa de tejidos. Los andamios, los cuales son sustancias diseñadas para ser incorporadas o implantadas en organismos vivos para reemplazar o regenerar un tejido vivo, que son diseñados para la regeneración tisular y la cicatrización de heridas necesitan cumplir funciones estructurales, mecánicas y de promoción de la adhesión celular, para guiar los fenotipos celulares tales como la proliferación y la diferenciación. Además, la biocompatibilidad y la biodegradabilidad, con productos de degradación no tóxicos y no inflamatorios durante el reemplazo *in vivo* por componentes celulares de ECM son criterios clave.¹⁰

El uso de Biomateriales para resolver problemas médicos ha resultado en un avance significativo en el tratamiento de muchas enfermedades; mejorando los tratamientos existentes o tomando parte en nuevos tratamientos. En este sentido, los

biomateriales representan un aliado en el campo de la regeneración de tejidos, dando lugar a una rápida recuperación de la funcionalidad de los tejidos.

3.2.1 Biomateriales para la piel.

Un biomaterial que ha sido utilizado ampliamente en contacto con la piel es el polímero producido por el gusano de seda (*Bombyx mori*) se ha utilizado durante mucho tiempo en la industria textil y para suturas en aplicaciones médicas. La seda ha sido utilizada como un potencial biomaterial en la ingeniería de tejidos por sus varias propiedades que lo hacen adecuado para esta aplicación; como la adhesión celular, la citocompatibilidad, la biodegradabilidad, la resistencia mecánica y a la tracción mejorada.¹⁰

Otro ejemplo de un biomaterial usado ampliamente en la piel es el quitosano, polímero derivado de la quitina. Este biomaterial tiene una enorme facilidad de uso en aplicación tópica sobre heridas para favorecer la cicatrización, en forma de ungüentos y cremas, además de que tiene propiedades que son deseables en un producto destinado para su aplicación *in situ*, más adelante se ahondara sobre las propiedades y usos del quitosano. Un ejemplo de su uso lo da Baltodano *et al.* quien reporto que en un ungüento adicionado con quitosano obtuvo hasta un 79.28% mejor cicatrización respecto al control, evaluado por el método de fuerza de tensión, demostrando que el quitosano tiene un enorme efecto en el proceso de cicatrización.¹¹

3.3 QUITINA.

La quitina es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza, solo superada por la celulosa. Este biopolímero tiene una elevada tasa de regeneración natural, pues se estima que al menos 1×10^9 toneladas de quitina se sintetizan y degradan cada año en la biosfera. Este polisacárido conforma las estructuras celulares de hongos, bacterias, insectos, arácnidos, crustáceos, nemátodos y de organismos invertebrados, como anélidos, moluscos, cefalópodos, hemicordados, entre otros. La quitina pura es un sólido blanco, parcialmente cristalino, inodoro e insípido.

Las propiedades de la quitina varían, según el origen de producción y el método de preparación; es por esto por lo que se debe de perfeccionar para lograr las propiedades más adecuadas para distintos usos. La insolubilidad de la quitina en agua limita significativamente sus aplicaciones, en muchas situaciones es conveniente trabajar con algunos de sus derivados.¹²

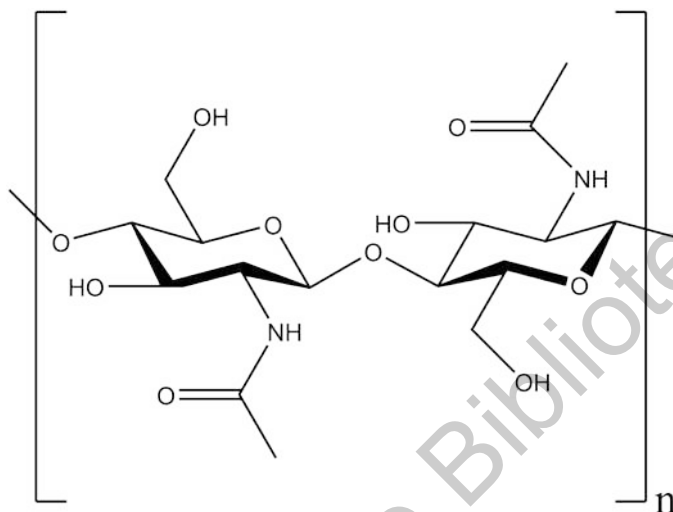


Ilustración 2: Estructura de la Quitina.¹¹

3.3.1 Quitosano.

El quitosano es un polímero biocompatible, biodegradable, no-tóxico y autoadhesivo que se obtiene mediante la desacetilación de la quitina, además, el quitosano es un buen hemostático, es hipocolesterolémico, posee actividad antimicrobiana, antiviral, antitumoral y antifúngica en condiciones específicas; su estructura se representa en la Ilustración 3. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y biológicas tiene una gran variedad de aplicaciones que abarcan diversas áreas del conocimiento tales como la medicina, la farmacéutica, la agricultura, el sector alimenticio y el sector textil entre otros.^{11,13,14}

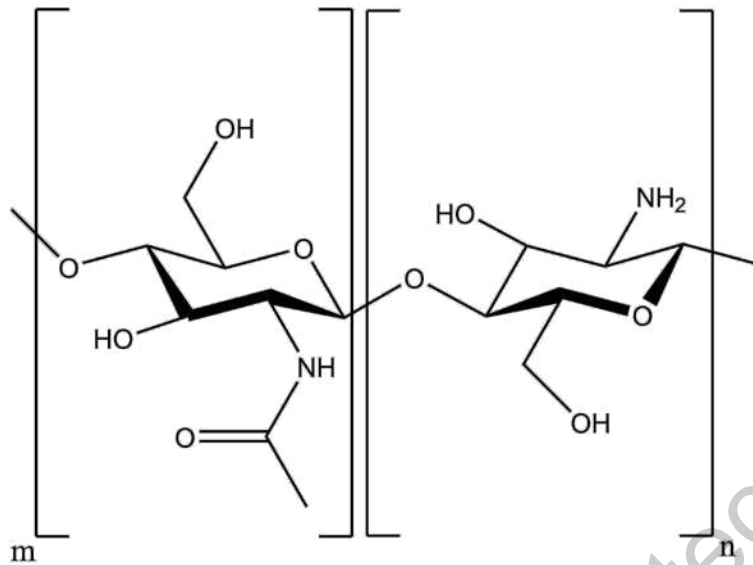


Ilustración 3: Estructura del quitosano; n es el monómero desacetilado y m el monómero acetilado.¹²

El quitosano es degradado por la lisozima y la lipasa, y los productos de la degradación enzimática del quitosano no son tóxicos, además, presenta actividad cicatrizante y se ha sugerido que el mecanismo por el cual ejerce esta acción es mediante la activación de neutrófilos y macrófagos, la migración de polimorfonucleares y células mononucleares, acelerando la regeneración de tejido conectivo y angiogénesis.¹¹

El quitosano es insoluble en cualquier disolvente que no sea una solución ácida acuosa. Esto se debe a la fuerte unión intermolecular de hidrógeno entre los grupos amino e hidroxilo de los monómeros de glucosa y amina que llevaría a su alto grado de cristalinidad polimérica. Aunque en algunos informes sólo los enlaces de hidrógeno intermoleculares se tienen en cuenta para la estructura cristalina rígida del quitosano, tanto los enlaces de hidrógeno intermoleculares como los intramoleculares son responsables de esta estructura rígida, como se muestra en la Ilustración 4.¹⁵

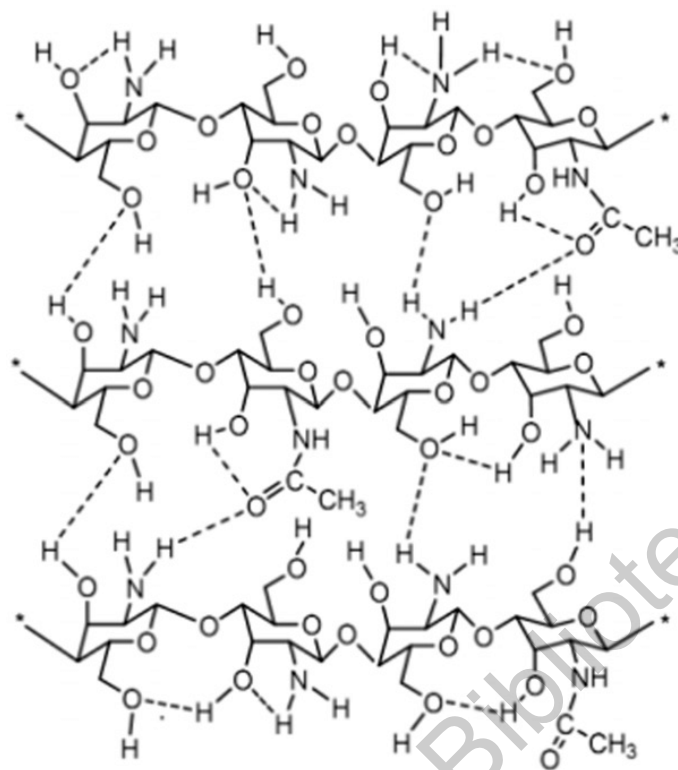


Ilustración 4: Esquema de los puentes de hidrogeno intermoleculares e intramoleculares en el quitosano.¹⁵

3.3.1.1 Propiedades Antifúngicas.

Las propiedades antifúngicas del quitosano dependen completamente de las condiciones de este; concentración, peso molecular, pH del medio y grado de desacetilación del quitosano. Un mayor peso molecular de la molécula resulta en una mayor cantidad de especies de hongos inhibidos por este. “Por otra parte, existen algunos hongos que contienen quitosano como principal componente, tal es el caso de los *Zygomycetos*, que son vulnerables al quitosano. La inhibición del crecimiento es debido a los grupos aminos protonados a pH 5.6 de la quitosano y esto puede formar complejos polielectrolitos con los grupos acídicos y básicos de la superficie celular creando desórdenes, pero también ha sido encontrado que existe cierto requerimiento mínimo de tamaño molecular para poder mostrar actividad antifúngica in vitro.”¹⁶ En cuanto al grado de desacetilación del quitosano, se ha demostrado que para ciertos hongos; *Phytophthora parasítica*, *Aspergillus niger*, a menor grado de desacetilación existía una mayor inhibición en el crecimiento de los hongos.

3.3.1.2 Actividad Antiviral

La actividad antiviral del quitosano depende del grado de polimerización, del grado de desacetilación, de la carga positiva y el carácter de las modificaciones químicas de la molécula. Los posibles mecanismos de supresión de la infección viral por el quitosano son aún discutidos.¹⁷

3.3.1.3 Efecto antimicrobiano del quitosano.

El efecto antimicrobiano del quitosano ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, todavía no ha sido dilucidado por completo el mecanismo de acción antimicrobiano de este biopolímero, aunque existen muchas teorías al respecto. El efecto antimicrobiano del quitosano es influenciado por cuatro factores:

1. Microorganismos: Especie y fase de desarrollo.
2. Propiedades del quitosano: peso molecular, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante.
3. Estado físico del quitosano: Líquido (Coloidal) o sólido (película).
4. Factores ambientales: pH, temperatura y tiempo.¹⁸

Uno de los principales mecanismos bajo el cual se teoriza que el quitosano ejerce su efecto antimicrobiano, está basado en la presencia de los grupos amino protonados a pH inferior a 6.3, el cual interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, generando un rompimiento, o lisis, de estas estructuras que lleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares.¹⁹⁻²¹

El quitosano tiene propiedad quelante, lo que permite que este biopolímero se pueda ligar selectivamente a metales presentes en las estructuras externas de los microorganismos, inhibiendo así la producción de toxinas.²² También se ha reportado que el quitosano puede inhibir enzimas debido a la interacción quitosano-ADN que altera la síntesis de ARN mensajero.²³

A pesar de las teorías anteriormente explicadas, la eficiencia de los efectos del quitosano en bacterias Grampositivas o Gramnegativas es algo controvertida. Algunos autores afirman que el quitosano generalmente muestra un efecto más

fuerte en las bacterias Grampositivas (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaris*, etc.) que en las Gramnegativas (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, etc.). Por el contrario, se ha demostrado que la hidrofilia de las bacterias Gramnegativas es significativamente mayor que la de las Grampositivas, lo que debería hacerlas más sensibles al quitosano. Este hecho se ha confirmado en varios experimentos in vitro, entre los que, las bacterias Gramnegativas parecen ser muy sensibles al quitosano y muestran mayores cambios morfológicos durante el tratamiento que las bacterias Grampositivas.²⁴

3.3.1.4 Aplicaciones del Quitosano en conjunto con un antibiótico.

Ya que el quitosano tiene una actividad antimicrobiana propia no existen muchos intentos de mezclar el quitosano con otro componente con propiedades antimicrobianas, sin embargo, algunos autores han mezclado el quitosano con un antibiótico. Merlusca *et al.* sintetizaron películas de Quitosano-PVA cargadas con neomicina para ser usadas como un dispositivo de liberación controlada. Lograron cargar las películas con neomicina, y determinaron que la neomicina interactuaba con su compuesto Quitosano-PVA por medio de puentes de hidrogeno. Evaluaron la actividad antimicrobiana por medio de método de difusión de disco sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, reportando tener mejores resultados sobre *Staphylococcus aureus* aunque no significativamente superiores.²⁵

Supriya *et al.* sintetizaron nanopartículas de quitosano cargadas de neomicina, igualmente, con el propósito de generar un sistema de liberación controlada para la neomicina. Lograron crear nanopartículas que tenían la capacidad de liberar de forma controlada neomicina. Los análisis de actividad antimicrobiana llevados a cabo sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, demostraron que se tenía un efecto antimicrobiano ligeramente superior sobre *Escherichia coli*, aunque este efecto tampoco fue significativamente superior.²⁶

3.4 NEOMICINA.

La neomicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos y tiene una actividad bactericida. Este se usa para prevenir o tratar las infecciones de la piel provocadas por bacterias y diversas infecciones en otras partes del cuerpo humano. La neomicina no es eficaz contra las infecciones virales, provocadas por herpes o por bacterias anaerobias y viene normalmente envasada en forma de crema o ungüento para aplicarla sobre la piel. La neomicina es hidrosoluble y más activa a pH alcalino.²⁷

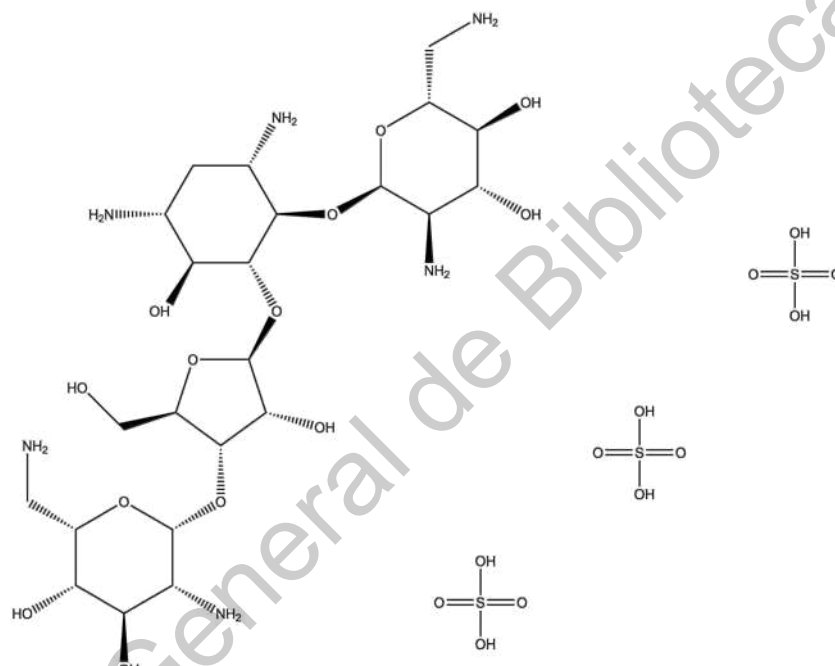


Ilustración 5: Estructura química del Trisulfato de neomicina.²⁸

3.4.1 Farmacología de la neomicina.

La neomicina es un antibiótico aminoglucósido, activo principalmente contra diversos tipos de bacterias Gramnegativas, aunque también tiene actividad en contra de algunas bacterias Grampositivas como *Staphylococcus aureus*; sin embargo, no presenta actividad contra *Pseudomonas*. El mecanismo bajo el cual la neomicina ejerce su efecto antibiótico empieza cuando atraviesa la membrana celular bacteriana mediante transporte activo y se une a un receptor específico proteico en la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, interfiriendo con un complejo de iniciación entre el ARNm y la subunidad 30S con lo que inhibe la

síntesis de proteína. Puede darse una lectura incorrecta del ADN, y de esta forma se producen las proteínas no funcionales; los polirribosomas se separan y no son capaces de sintetizar proteínas. Los aminoglucósidos, grupo al cual pertenece la neomicina, son bactericidas, mientras que la mayoría de los demás antibióticos que interfieren con la síntesis de proteínas son bacteriostáticos.²⁹

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4 JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades de la piel y el tejido subcutáneo general alrededor de 5000 muertes al año en los Estados Unidos y 2800 muertes al año en México, siendo estos dos países el primero y segundo lugar en muertes por este tipo de enfermedades en la OCDE. Las muertes generadas por este tipo de enfermedades son por lo general resultados de una infección menor que al no ser tratada de forma correcta deriva en una infección en una porción mayor del tejido, dificultando su tratamiento y llevando a la muerte.

La piel, al ser el órgano más expuesto del cuerpo, resulta vulnerable a recibir daños debido a cortes, laceraciones e infecciones. Actualmente los tratamientos utilizados para remediar estos ataques que sufre la piel se limitan a limpiar las heridas con abundante agua y a veces desinfectar la zona utilizando alguna sustancia como sería alcohol etílico o agua oxigenada, y después esperar a que la herida sane por sí misma. Sin embargo, este procedimiento solamente contempla una infección en el momento en que se genera la herida, y no contempla que por diferentes situaciones durante el proceso de cicatrización podría darse una infección. Además, por lo general, no se utiliza nada para acelerar el proceso de cicatrización. Por esto, se propone la creación de un compósito de Quitosano-Neomicina, para crear una barrera adicional que proteja las heridas durante el proceso de cicatrización, que fomente este proceso al mismo tiempo que evita que bacterias que pudieran generar una futura infección proliferen en el área afectada.

5 HIPÓTESIS.

La síntesis del biomaterial compósito, Quitosano-Neomicina, permitirá reducir la carga bacteriana, habitual en infecciones cutáneas, y promover la proliferación celular del mismo tejido.

6 OBJETIVOS.

6.1 OBJETIVO GENERAL.

Sintetizar un compósito base quitosano con un antibiótico, que tenga la capacidad de reducir la carga bacteriana, y que a su vez permita la regeneración del tejido cutáneo.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Desarrollar un método para la incorporación de la neomicina al quitosano sin que este modifique las propiedades antibióticas y regenerativas de los precursores.
- Caracterizar fisicoquímicamente los materiales obtenidos mediante el uso de espectroscopia infrarroja y microscopia electrónica de barrido.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del compósito frente a bacterias Gramnegativas y Grampositivas.
- Evaluar la viabilidad y citotoxicidad de los materiales obtenidos mediante el cultivo de fibroblastos *in vitro*.

7 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

7.1 MATERIALES.

Para la elaboración del compósito se empleó quitosano de medio peso molecular (CAS: 9012-76-4), de la marca Sigma-Aldrich, con grado de desacetilación 75-85% y peso molecular 190-310kDa; Trisulfato de neomicina (CAS: 1405-10-3) de la marca Sigma-Aldrich; para a preparación de la solución de Ácido Acético 0.4M se utilizó Ácido Acético Glaciar (CAS: 64-19-7) de la marca J.T. Baker; para la preparación de la solución 5%w de Hidróxido de Sodio se utilizó Hidróxido de Sodio en escamas (CAS: 1310-73-2) de la marca J.T. Baker.

7.2 SÍNTESIS DEL COMPÓSITO.

1. Se pesó el soluto para preparar la solución con una relación 9:1 de quitosano medio peso molecular y de Trisulfato de neomicina.
2. Se disolvió el soluto en ácido acético 0.4M agregando primero el Trisulfato de neomicina y después el quitosano para formar una solución de concentración 20mg/mL de soluto.
3. Se agitó por 12 horas hasta que todo el quitosano se disuelva completamente.
4. La solución resultante tenía un pH ácido de 3.5 ± 0.2 , por lo cual se agregó gota a gota una solución de hidróxido de sodio al 5%w, con agitación vigorosa, hasta alcanzar un pH de 6.4 ± 0.1 . Una vez alcanzado el pH requerido se dejó reposar la solución 24 horas con agitación moderada, y se confirmó el pH. Se dejó la solución 24 horas con agitación media, y se confirmó que el pH es adecuado.
5. Se vertió la solución en una caja de Petri para realizar la película por el método de Casting, con ayuda de un horno de convección durante 8 horas a 60 °C.

7.2.1 Diagrama de flujo del procedimiento.

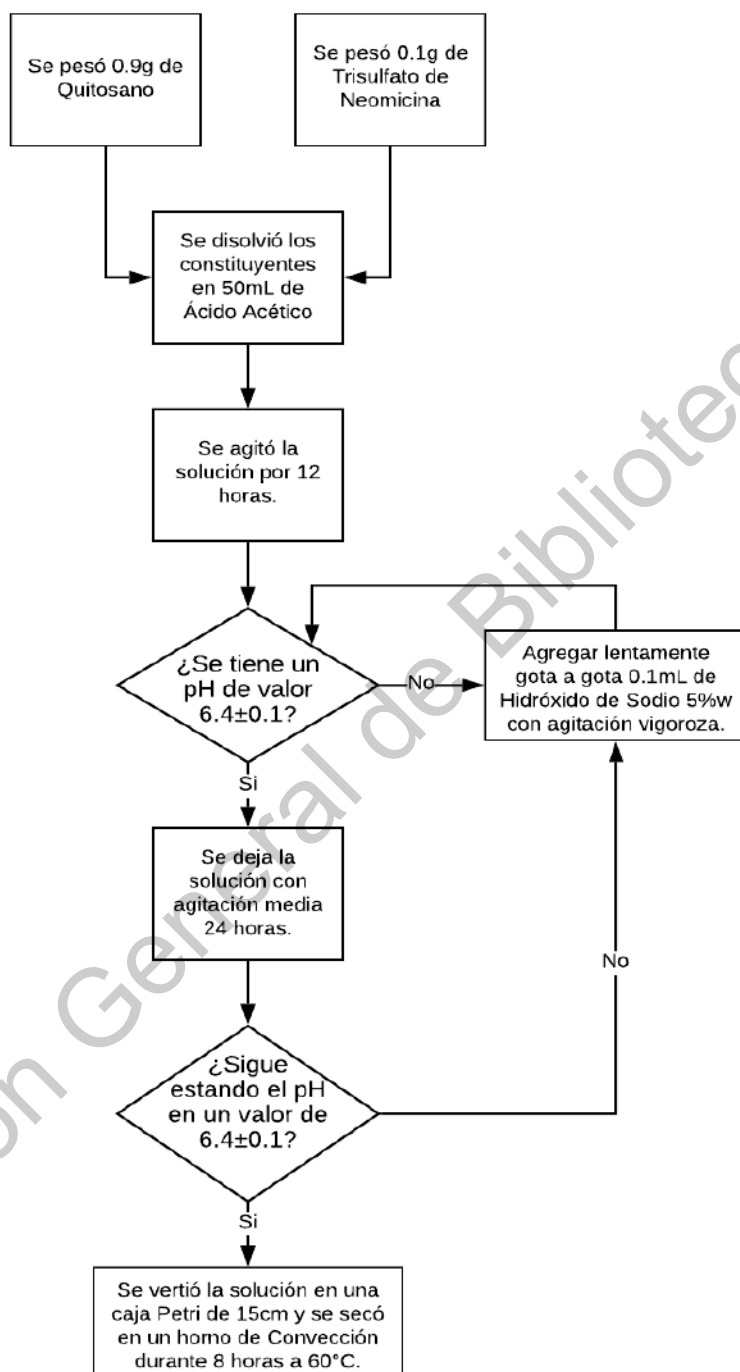


Ilustración 6: Diagrama de flujo de procedimiento para la síntesis de películas de Quitosano-Neomicina.

7.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.

7.3.1 Espectrometría Infrarroja con la Transformada de Fourier (FTIR).

Para el análisis FTIR del compuesto de quitosano y neomicina, se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer GX, modelo Spectrum One, en el modo de Reflectancia Totalmente Atenuada (ATR) con punta de Diamante, en un rango de 4000 a 650 cm^{-1} , se hicieron 24 barridos y se obtuvo 4 cm^{-1} de resolución. Las muestras sometidas a este análisis fueron: una película de control compuesta solamente por quitosano, una muestra pura del trisulfato de neomicina en polvo y a tres películas con concentraciones 10%w, 20%w y 30%w de neomicina.

La Espectrometría Infrarroja con la Transformada de Fourier (FTIR) es un método que estudia la absorción o emisión de energía que irradia un material en el rango del Infrarrojo (550 a 4000 cm^{-1}). Esta técnica se utiliza para la identificación y caracterización de distintos compuestos, en donde nos proporciona información acerca de los grupos funcionales presentes. La técnica consiste en irradiar la muestra a analizar con radiación infrarroja, esta es absorbida por el analito, lo cual provoca una vibración molecular característica para cada grupo funcional.

7.3.2 Microscopio electrónico de Barrido (SEM).

Con el Microscopio electrónico de Barrido se pueden obtener imágenes de una muestra en escala de micrómetros a nanómetros. La muestra es bombardeada con un haz de electrones que sondea la superficie del material. La interacción de los electrones en la muestra se producen señales superficiales como electrones secundarios, electrones retrodispersos y otros fotones. Las señales son captadas por detectores que interpretan estas y traducen esta información como una imagen. Mediante este tipo de análisis se pueden obtener información topográfica, morfológica, cristalográfica del material entre otras.

El análisis de las películas del compuesto de Quitosano-Neomicina se realizó en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM6010LA a un voltaje de trabajo de 5kV, a diferentes aumentos.

7.3.3 Análisis de Actividad Antimicrobiana.

La evaluación antimicrobiana se realizó bajo la norma ASTM E2149- Evaluación antimicrobiana de superficies poliméricas, empleando como control de crecimiento microbiano una película de polipropileno isotáctico, un blanco de quitosano y con muestras de los compósitos de quitosano con un 10, 20 y 30%w de neomicina. Las películas fueron lavadas con agua destilada hasta que el agua utilizada para lavarlas llego a un pH de 7, esto para evitar que el pH tomara papel en el efecto Antimicrobiano de las muestras. Del blanco y de todas las muestras se recortaron cuadrados de 1x1cm para hacer el análisis siguiendo el siguiente procedimiento:

A. Esterilización de muestras y cámara húmeda

1. Colocar dentro de una caja Petri una muestra en la parte central. Preparar muestras y control para t=0 y t=3 horas.
2. Colocar el portaobjetos al centro de la caja, cortar semi círculos de papel filtro y colocarlos en cada lado del portaobjetos.
3. Colocar a un lado de la muestra un cobre objetos para programar esterilización con UV.
4. Dejar en luz UV durante 30 minutos.
5. Al iniciar el experimento, colocar 500 μ L de agua destilada estéril a cada papel filtro para generar la cámara húmeda dentro de la caja Petri.

B. Evaluación antimicrobiana de muestras

1. Colocar en la superficie de las películas 25 μ l de la suspensión de bacterias 5×10^6 , poner el cubreobjetos encima de la muestra con bacterias asegurándose que quede cubierto por completo y que el cubreobjetos se adhiera a la superficie de la muestra.
2. Incubar muestras a 37° C, a diferentes tiempos (0 y 3 horas).
3. Pasado cada tiempo, retirar papel filtro de cada cámara.
4. Colocar 5 ml de PBS/Tween en la caja Petri y agitar durante 5 min a 88 rpm, hay que asegurar que se desprenda por completo las películas del cubreobjetos.

5. Tomar 100 µl de la solución de lavado y colocarlos en una caja con agar. Estriar con perlas de vidrio estériles.
6. Incubar cajas a 37° C durante 14 horas.
7. Hacer el conteo de las colonias, tomando el control como el 100 % de crecimiento para realizar el cálculo de % de inhibición.

7.3.4 Análisis de Viabilidad Celular por ensayo MTT.

Este análisis se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazán, que es un compuesto de color azul, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

7.3.4.1 *Cultivo celular.*

Se extrajeron los tubos criógenos del supercongelador para transferir las células a un tubo Falcón y centrifugar la solución a 1000 rpm por 10 min, posteriormente se retiró el sobrenadante para recuperar el pellet, al cual se agregaron 3 ml de medio de cultivo (DMEM-F12) suplementado con suero bovino; después de resuspender la solución para separar la monocapa de células formadas, se agregaron dentro de un frasco T y se dejaron incubar a 37°C en oscuro.

Cuando se ve confluencia de células en el Frasco T, se retiró el medio de cultivo por precipitación y posteriormente se realizaron dos lavados de 2 ml de medio de cultivo cada uno para retirar los residuos del suero de bovino. Después de retirar el medio de cultivo del segundo lavado se agregó 1 ml de Tripsina y se dejaron incubar por 5 min a 37 °C o hasta que se vea como se desprenden las células del Frasco. Pasado el tiempo se agregaron 1.5 ml de medio suplementado para inactivar a la enzima (se resuspendió la solución para asegurar la inactivación), en seguida se centrifugo a 1000 rpm por 10 min. Se retiro el sobrenadante para después agregar 6 ml de medio suplementado, se resuspendió la solución y finalmente se agregaron 3 ml en cada nuevo Frasco T para dejarlos incubar a 37°C.

7.3.4.2 *Lavado de películas.*

Primero se cortó cada una de las películas del compósito Quitosano-Neomicina y PVA en pequeños pedazos (alrededor de 0.5 cm²), y se lavaron con medio de cultivo y antibiótico al 1 % (gentamicina), hasta que el cambio de color del medio no fuera evidente, a un pH aproximado de 7.4.

7.3.4.3 *Montaje de las películas en las placas de cultivo.*

En una placa de 24 pozos se colocaron dos experimentos por triplicado de cada material, posteriormente se colocó en luz UV por 10 min de cada lado de la placa para asegurar la muerte de bacterias y hongos.

Pasado el tiempo se colocó en cada pozo 100 µl de la suspensión celular obtenida de un Frasco T y 500 µl de medio de cultivo suplementado con suero de bovino y antibiótico para después dejarlas incubar por el tiempo al que se requiera realizar la medida; para este caso fue de 24, 92, 164 y 216 h.

7.3.4.4 *Prueba MTT.*

De todos los pozos a analizar se retiró el medio completo, para posteriormente agregar 10 µl de una solución de MTT, del Kit para determinación de crecimiento celular MTT, y 90 µl de medio de cultivo. Se deja incubar por 4 h a 37°C en ausencia de luz, posteriormente se retiró la solución cuidadosamente para no destruir la película. Una vez realizado esto se agregaron 100 µl de isopropanol (solvente del MTT) agitando suavemente para asegurar la salida del MTT de la mitocondria de cada célula o garantizar la disolución de los cristales de Formazan MTT. Finalmente se retiró la solución de cada pozo, y se llevó a cabo la medición de la absorbancia espectrofotométrica en un lector de microplacas ELISA a una longitud de onda de 595 nm y 655 nm. Por último, se obtuvo la viabilidad celular mediante la ecuación de porcentaje de viabilidad celular.

$$\%Viabilidad = \frac{Células\ vivas}{Células\ totales}$$

7.3.4.5 Conteo de células por hemocitómetro

Se preparo una solución 1:1 de una suspensión celular en medio completo y azul de tripano, con un volumen final de 200 μ l. Posteriormente con cuidado se colocaron 10 μ l de cada extremo de la cámara de Neubauer y se procedió a realizar el conteo de los 4 cuadrantes de la cámara para fines de compararlos en promedio con el cuadrante del centro. El conteo debe realizarse 5 veces para obtener promedios válidos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8 RESULTADOS.

8.1 ANÁLISIS DE FTIR.

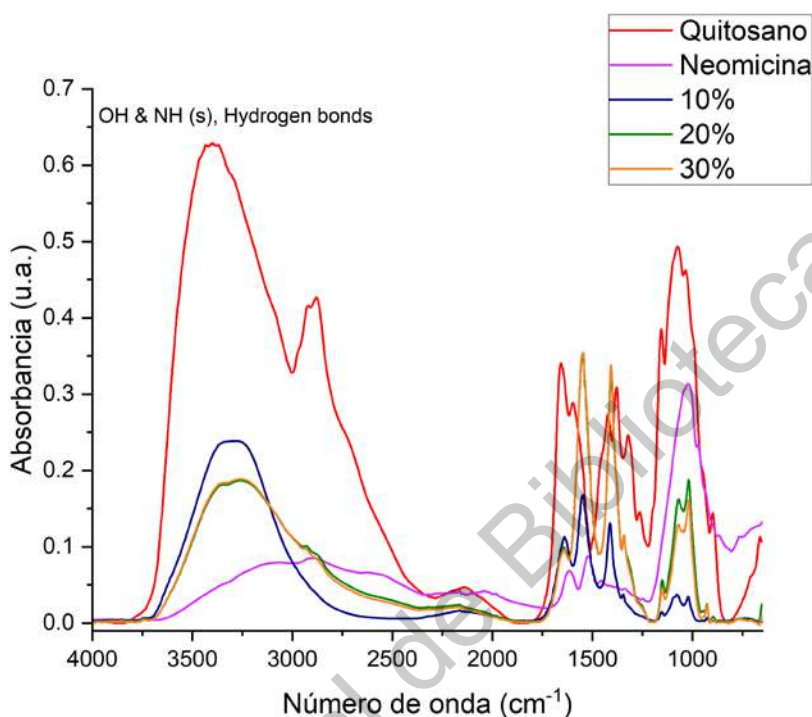


Figura 1: Resultados de análisis FTIR del quitosano (Rojo), de la neomicina (Violeta), del compósito con un 10%w (Azul marino), un 20%w (Verde Olivo) y un 30%w (Naranja) de neomicina.

Los resultados obtenidos por medio del análisis del espectro infrarrojo, que se pueden observar en la Figura 1, revelan que la banda característica de los puentes de hidrogeno es notablemente más pequeña, esto implicaría que hay una reducción en la abundancia de interacciones de tipo puente de hidrogeno en los compósitos Quitosano-Neomicina a comparación con los existentes en una película compuesta completamente de quitosano.

Con el propósito de facilitar el análisis de los espectros IR, se marcaron las bandas características del quitosano (Figura 2). Las bandas en 2916 y 2879 cm⁻¹ son características de vibraciones de tipo “Stretching” simétrico y asimétrico respectivamente en CH₂, estas bandas son características de los polisacáridos. Las bandas en 1657 y 1320 cm⁻¹ características de vibraciones de tipo “Stretching” en

$C = O$ y $C - N$ respectivamente, son prueba de la presencia de grupos cetona y amina secundaria presentes en los monómeros no desacetilados del quitosano. La banda en 1596 cm^{-1} delata una vibración tipo “Rocking” en aminas primarias (NH_2). Las bandas en 1420 y 1379 cm^{-1} corresponden vibraciones de tipo “Scissoring” en grupos CH_2 y CH_3 respectivamente. La banda en 1158 cm^{-1} se debe a vibraciones de tipo “Stretching” en los $C - O$ presentes dentro de la estructura cíclica del quitosano. Las bandas en 1072 y 1033 cm^{-1} se deben a vibraciones tipo “Stretching” asimétricas y simétricas en los puentes $C - O - C$ que unen los anillos del quitosano, bandas que también están presentes en el espectro IR de la neomicina. Por último, el pico en 898 cm^{-1} se les atribuye a vibraciones tipo “Bending” en $C - H$ fuera de los anillos de monosacáridos.³⁰

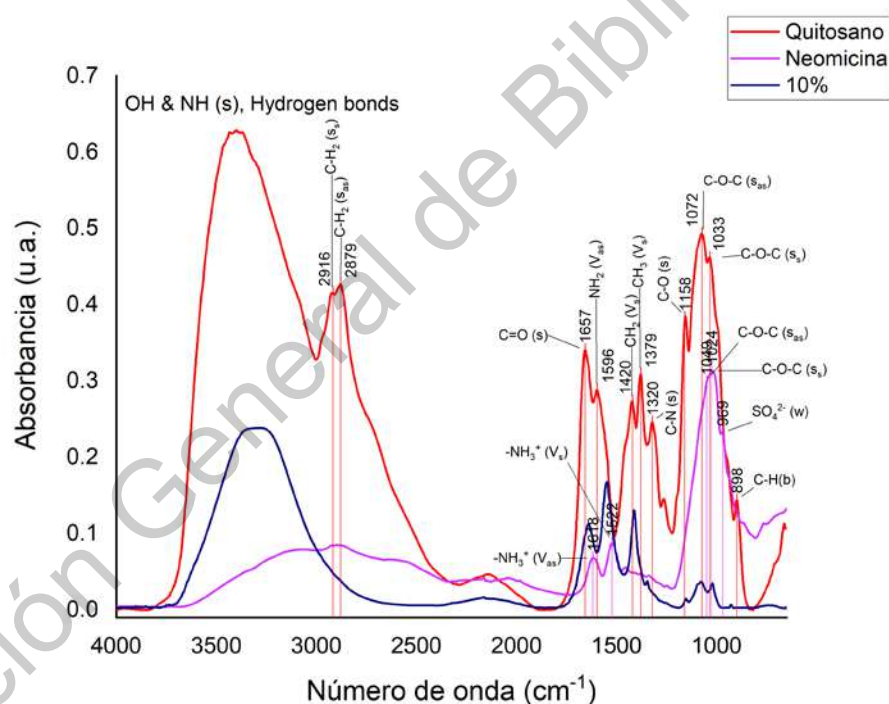


Figura 2: Resultados de análisis de FTIR de quitosano (Rojo), neomicina (Violeta) y del Compósito Quitosano-neomicina 10%w (Azul marino).

En la neomicina además de las bandas correspondientes a los puentes $C - O - C$ que unen los anillos, se observan otras tres bandas importantes (Figura 2). Por un lado, están las bandas en 1612 y 1522 cm^{-1} que delatan vibraciones de tipo

“Rocking” y “Scissoring” respectivamente en aminas primarias protonadas (NH_3^+), y la banda en 969 cm^{-1} señala vibraciones tipo “Wagging” en sulfatos (SO_4^{2-}).³¹

En un acercamiento a la zona donde se encuentran prácticamente todas las bandas; ente 1800 y 800 cm^{-1} (Figura 3), se puede observar mejor las bandas del compuesto de quitosano con un 10%w de neomicina. La primera banda, en 1639 cm^{-1} delata la presencia de vibraciones de tipo “Stretching” en $C = O$ de los grupos cetona de los monómeros no desacetilados del quitosano. La segunda banda en 1550 cm^{-1} , característica de vibraciones de tipo “Rocking” en grupos amina primaria (NH_2), sin embargo, esta banda presenta un desplazamiento de 46 cm^{-1} hacia la derecha, esto implica que existe una interacción intermolecular de una molécula diferente del quitosano con los grupos amina, probablemente los grupos del quitosano. Las bandas en 1412 y 1346 cm^{-1} individualmente se podría concluir que son bandas que se han visto interferidas, siendo desplazadas y disminuidas, sin embargo, en conjunto delatan una vibración tipo “Bending” en $C - H$ de un alcohol secundario, grupos que son abundantes de la molécula de la neomicina. Por último, las bandas en 1153 , 1076 y 1021 cm^{-1} corresponden claramente a las bandas del quitosano para las vibraciones “Stretching” de $C - O$ dentro de los anillos de monosacáridos, y a las bandas tanto del quitosano como de la neomicina para vibraciones “Stretching” asimétricas y simétricas en los puentes $C - O - C$, respectivamente.³¹

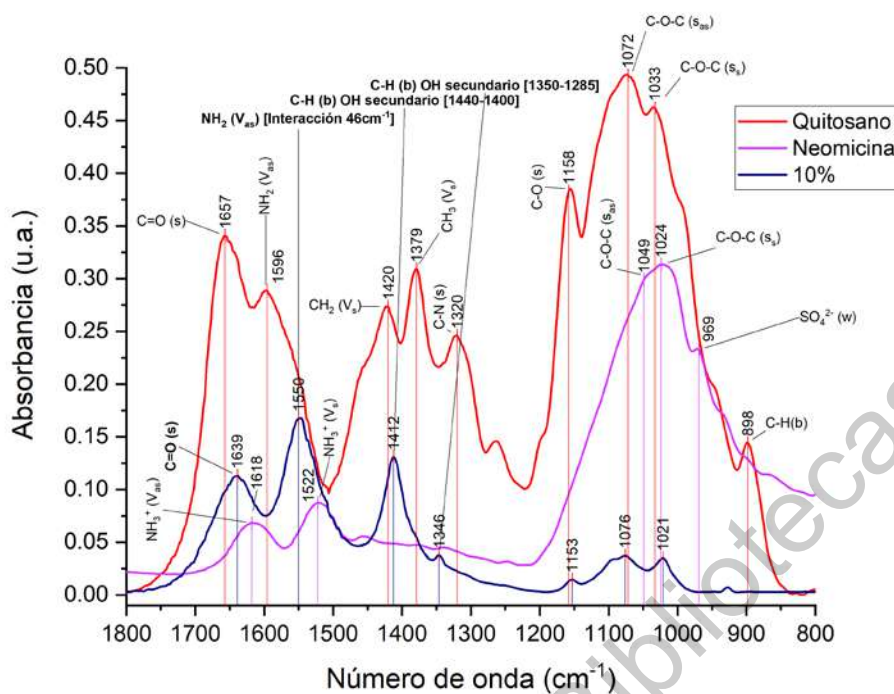


Figura 3: Análisis de espectro FTIR; acercamiento de 1800 a 800 cm^{-1} .

En conjunto estos resultados implicarían que los grupos alcohol secundario de la neomicina podrían estar interactuando con los grupos amina del quitosano, probablemente por medio de puentes de hidrogeno. Esto además con la caída en la presencia de puentes de hidrogeno en comparación con la muestra compuesta completamente de quitosano llevaría a la conclusión de que la neomicina al interactuar por medio de sus propios puentes de hidrogeno con las cadenas de quitosano está obstruyendo a las cadenas de formar puentes de hidrogeno con las otras cadenas de quitosano.

8.2 ANÁLISIS DE MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.

Para determinar como la presencia de neomicina altera la Morfología superficial de las películas se realizó un análisis con un Microscopio electrónico de Barrido (SEM) de películas con una concentración 10%w, 20%w y 30%w de neomicina.

En la Imagen 1 se puede observar una muestra de Trisulfato de neomicina en polvo. Esta imagen nos muestra que el Trisulfato de neomicina se conglera formando estructuras principalmente esféricas.

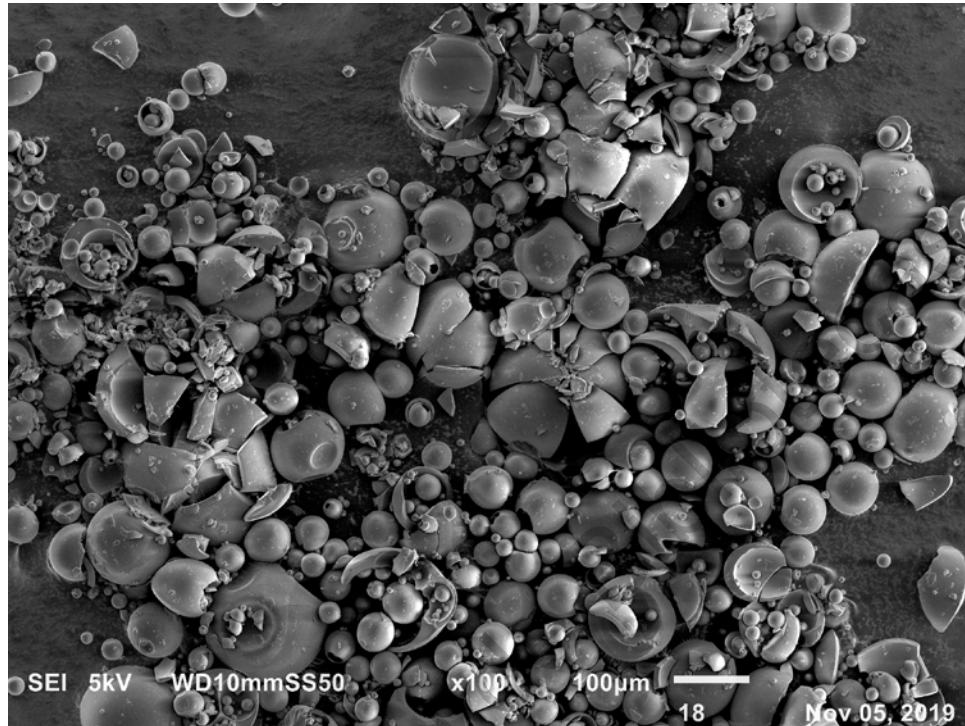


Imagen 1: Imagen de Trisulfato de neomicina en polvo, aumento x100.

La Imagen 2, que corresponde a una muestra del compuesto con un 10%w de neomicina muestra una superficie rugosa, que posee dos tipos de rugosidades, por un lado, se observan estructuras redondas que sobresalen de la superficie y por otro lado en la superficie de la película se observaron pequeñas estructuras que en un acercamiento mayor (Imagen 4) mostraban una estructura fibrosa desorganizada, lamentablemente no se logró obtener imágenes suficientemente buenas de estas estructuras para poder ser observadas adecuadamente ya que existe una limitación en el aumento y la nitidez que se puede conseguir en un Microscopio Electrónico en una muestra orgánica, ya que para conseguir mayor nitidez se debe aumentar la energía del haz de electrones y para conseguir un mayor aumento, se debe enfocar el haz área menor, lo que inevitablemente daña la muestra.³²

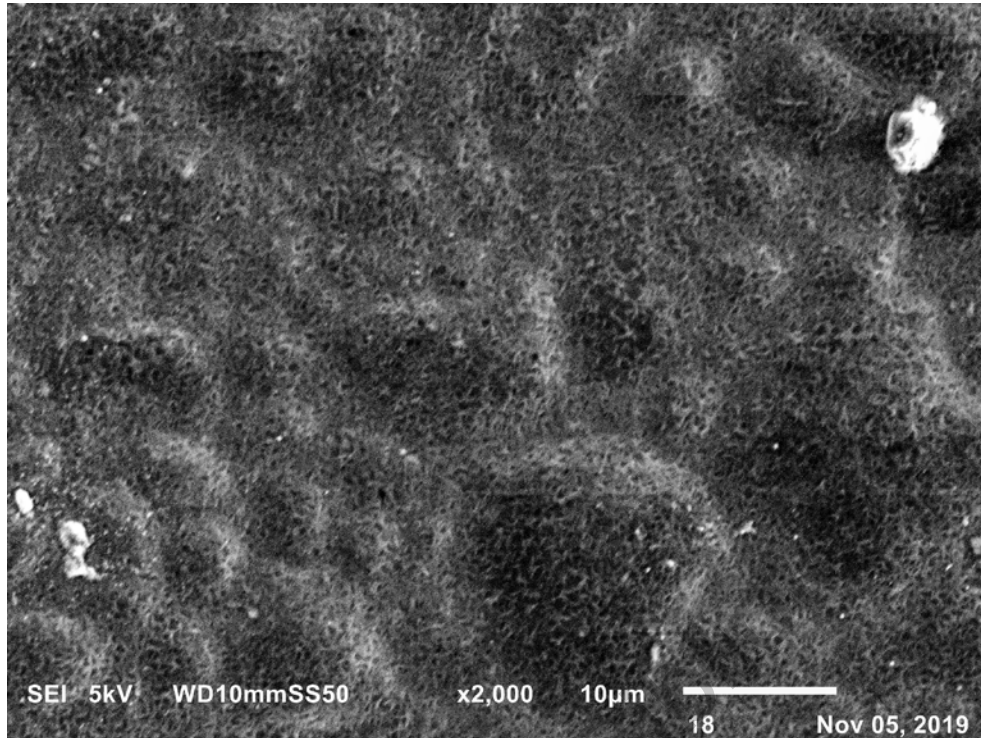


Imagen 2: Imagen de muestra de compuesto Qitosano-Neomicina 10%w, aumento x2000.

En la Imagen 3, la cual tiene un mayor aumento, se pudieron observar conglomeraciones con forma esférica, presumiblemente de neomicina. Las conglomeraciones esféricas tenían en promedio $3\mu\text{m}$ de diámetro, con una excepción de una con un diámetro muy inferior, de $1.2\mu\text{m}$. Estas conglomeraciones indicarían que la neomicina continúa aglomerándose en forma de esferas aun en presencia de quitosano, por lo que podría concluirse que las formaciones redondas que sobresalen en la superficie se tratarían de conglomeraciones de neomicina que se han formado en el interior de la película.

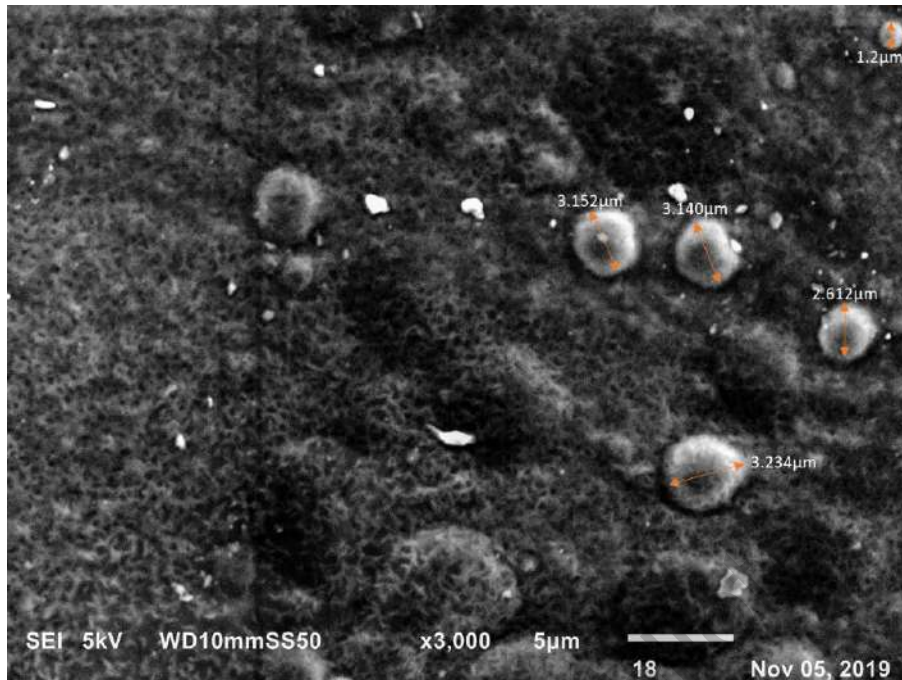


Imagen 3: Imagen de SEM de compuesto 10%w de neomicina, aumento x3000.

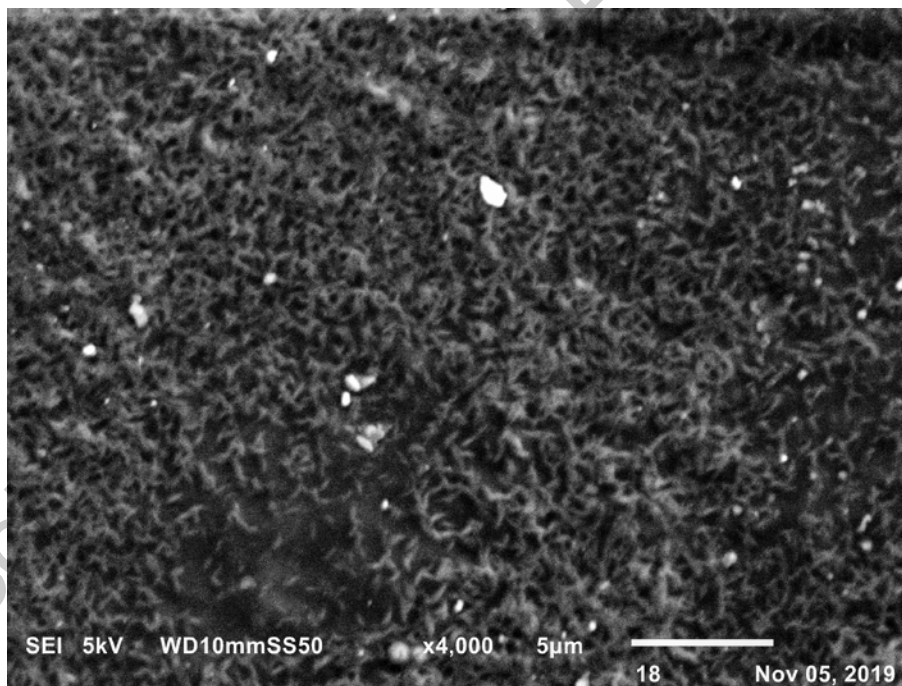


Imagen 4: Imagen de SEM de compuesto 10%w de neomicina, aumento x4000.

En la muestra correspondiente al compuesto con un 20%w de neomicina (Imagen 5), se observó una superficie rugosa, pero de características diferentes a las del compuesto con un 10%w de neomicina, en lugar de obtenerse dos diferentes formas

de rugosidad, solamente se observó una. La superficie de la película mostraba múltiples formaciones redondas que sobresalían de la superficie, las cuales muestran una forma más circular en comparación con las que se observaron en la muestra anterior, además de ser más numerosas.

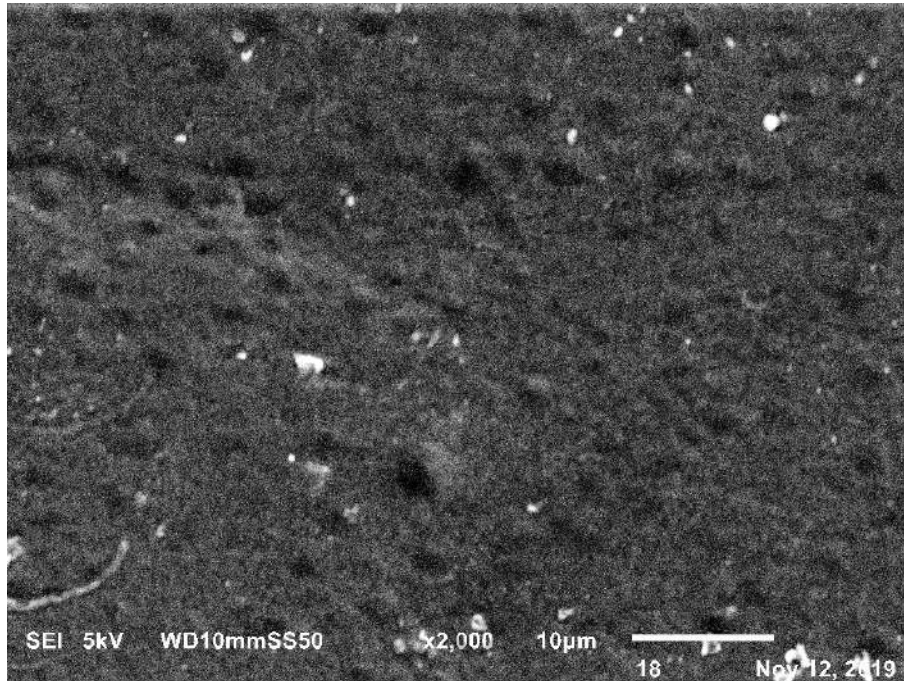


Imagen 5: Imagen de SEM de compuesto 20%w de neomicina, aumento x2000.

Tomando un pequeño muestreo de las formaciones esféricas cuya silueta redondeada se distinguía mejor en las imágenes (Imagen 6), en promedio las rugosidades esféricas tenían un diámetro de $2.165\mu\text{m}$. La presencia de más rugosidades esféricas confirmaría la hipótesis anteriormente propuesta, las protuberancias esféricas son generadas por la presencia de conglomeraciones esféricas de neomicina que se formaron debajo de la superficie de la solución de quitosano a medida que esta se secaba y quedaron atrapadas entre el quitosano presente en la superficie y el quitosano debajo de las conglomeraciones. Por esto a mayor concentración de neomicina, más conglomeraciones se presentan en la superficie de la solución. Por otro lado, no se observó la superficie conformada por “fibras”, como fue en el caso del compuesto con 10%w de neomicina.

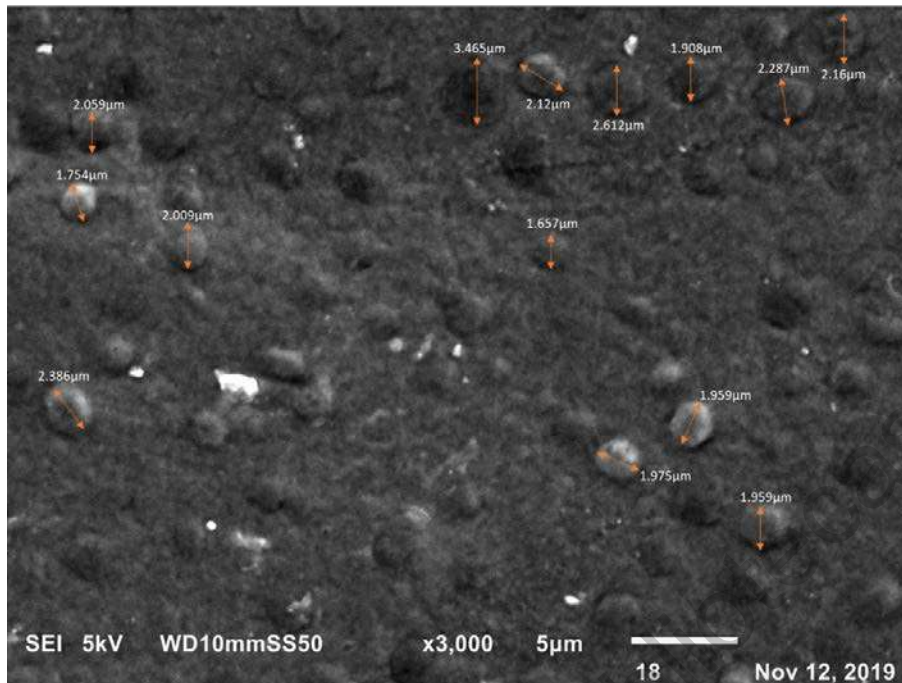


Imagen 6: Imagen de SEM de compuesto 20%w de neomicina, aumento x3000.

Finalmente, en la muestra del compuesto con un 30%w de neomicina (Imagen 7) se observó principalmente una superficie considerablemente más lisa que en los casos anteriores. Adicionalmente se observó otro cambio significativo de la morfología superficial en la ausencia de protuberancias, y la abundancia, por otro lado, de concavidades. Esto posiblemente se debe a cambios en la tensión superficial de la solución debido a la interferencia de la neomicina en la formación de puentes de hidrogeno entre las cadenas de quitosano, llevando a que en lugar de que las esferas queden atrapadas entre la capa superior y la inferior de quitosano, las esferas rompan la tensión superficial de la solución a medida que se seca, y queden expuestas, y ya que estas esferas son frágiles, se romperían o simplemente se desprenderían de la superficie dejando en su lugar una concavidad. Se puede observar además que las concavidades no son del todo esféricas, por lo que es de suponer que las orillas de las concavidades al ser desocupadas de la neomicina se contraen.

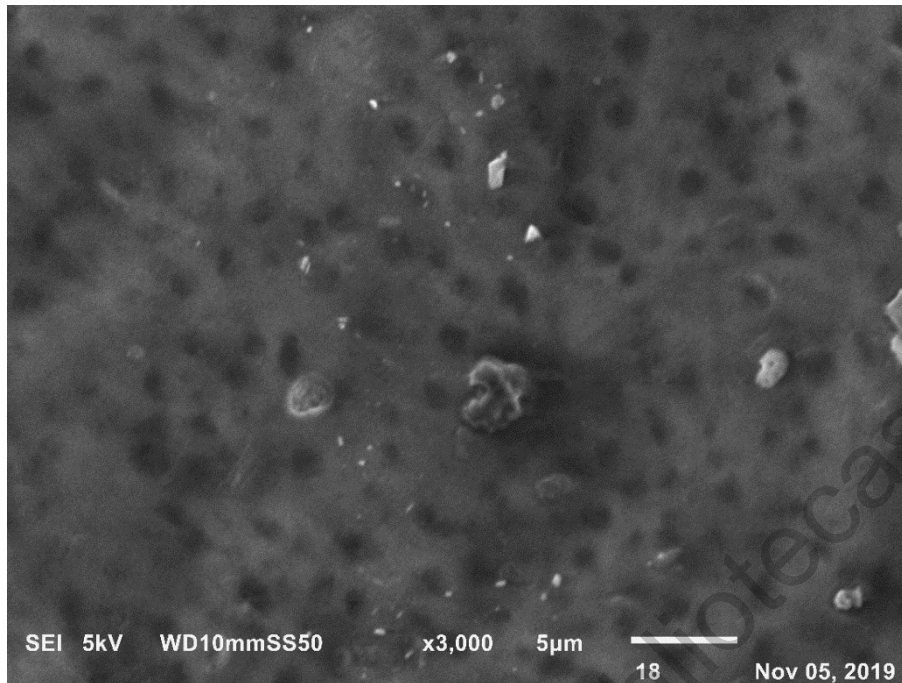


Imagen 7: Imagen de SEM de compuesto 30%w de neomicina, aumento x3000.

8.3 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Los resultados de las pruebas (Figura 4) indican que el quitosano por si solo tiene efectos Antimicrobianos tanto en bacterias Grampositivas (*Staphylococcus Aureus*) como en Gramnegativas (*Pseudomonas Aeruginosa*), sin embargo, los resultados

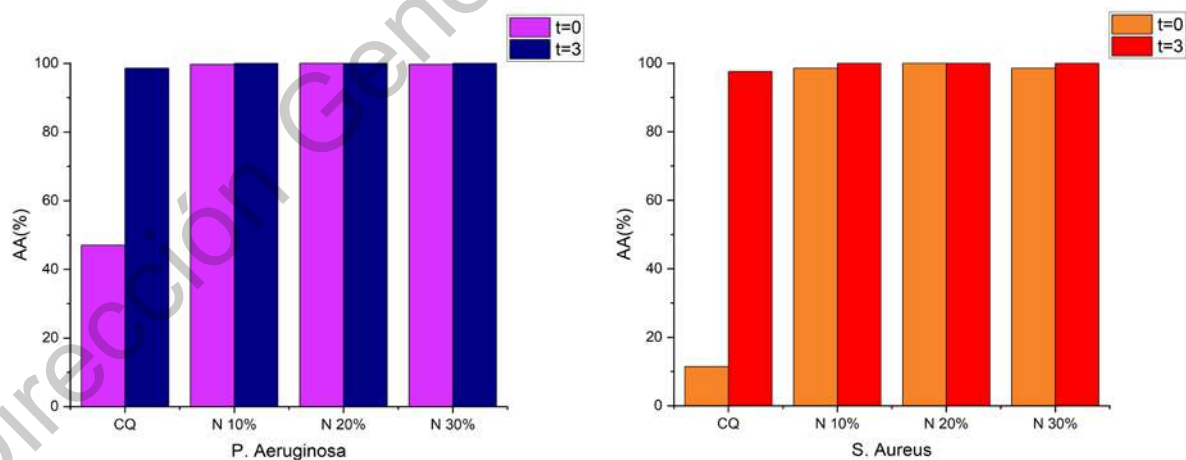


Figura 4: Resultados de la Prueba de Actividad Antimicrobiana con *Pseudomonas Aeruginosa* (Gramnegativa) y con *Staphylococcus Aureus* (Grampositiva).

a tiempo 0 para el blanco de quitosano demuestran que las bacterias Gramnegativas fueron más susceptibles a la presencia del quitosano que las Grampositivas. Esto es un indicio del mecanismo de acción bajo el cual el quitosano

está ejerciendo su efecto antimicrobiano. El quitosano tiene 3 diferentes mecanismos de acción que se han propuesto en la literatura, y aunque no se ha sugerido, es claro que los diferentes resultados que se han obtenido apuntan a que los 3 mecanismos son correctos y dependiendo; de las características del quitosano utilizado y de las condiciones en las que se ponga a prueba, será el mecanismo que predomine. En este caso, el mecanismo bajo el cual el quitosano ejercería el efecto es por medio de la interacción entre los grupos amino de los monómeros desacetilados de la cadena con las cargas negativas en la pared celular, generando lisis en la pared celular. Esto se puede deducir ya que se ha demostrado que la hidrofilia de las bacterias Gramnegativas es significativamente mayor que la de las Grampositivas, volviéndolas más susceptibles a este mecanismo de acción.³³

Las muestras con neomicina (Figura 4) mostraron todos resultados similares, la erradicación total de las bacterias independientemente de su carácter Grampositivo o negativo, o del tiempo que fueron expuestas. La neomicina tiene una mayor eficacia contra bacterias generalmente Gramnegativas, sin embargo, la neomicina también tiene actividad antibiótica contra algunas bacterias Grampositivas, entre ellas el *Staphylococcus aureus*, esto explicaría por qué las muestras con neomicina presentaron un efecto antimicrobiano notablemente superior al que obtuvo el control de quitosano contra esta bacteria. Por otro lado, ya que tanto el quitosano como la neomicina tienen un efecto especialmente bueno contra bacterias Gramnegativas, se puede deducir que ambos actuaron en conjunto contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* causando la eliminación total de estas.

8.4 ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR.

El ensayo MTT fue realizado con fibroblastos cutáneos línea JB sobre un control de quitosano y sobre un compósito de quitosano con 10%w de neomicina, además de un blanco para usar como referencia. Los fibroblastos forman parte importante del proceso de coagulación y de cicatrización por lo que la adhesión y supervivencia de estos en el compósito es crucial para establecer su practicidad.

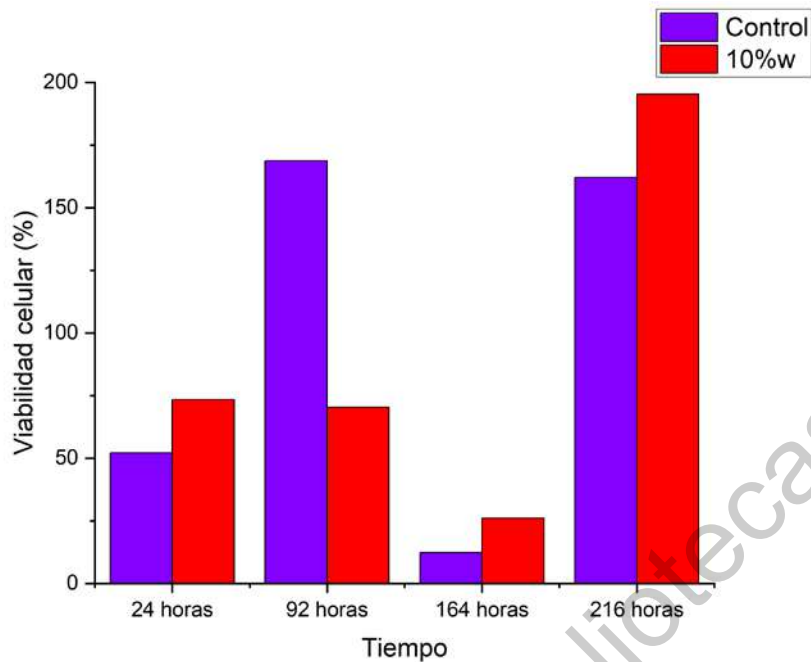


Figura 5: Resultados de Ensayo MTT en porcentaje de viabilidad respecto del blanco.

Los resultados (Figura 5) demuestran que los fibroblastos pueden proliferar en el compósito. Esto es especialmente interesante en tiempo 24 horas y 216 horas (9 días), pues los fibroblastos producen fibrina durante el proceso de coagulación para ayudar a tener la hemorragia, además participan en la fase de proliferación durante el proceso de cicatrización de una herida, produciendo fibronectina y colágeno para formar una nueva matriz extracelular. En 24 horas se observó que el compósito tenía un efecto superior al control de quitosano, esto es importante ya que implica que la presencia de un Antibiótico como es la neomicina no solo no ejerce un efecto citotóxico sobre las células que proliferan en el compósito, si no que ejerce un efecto positivo en su crecimiento. Con base a las ISO 10993 donde se destaca la clasificación de citotoxicidad con base a el porcentaje de viabilidad celular: 100-75%: No citotóxico, 74-50%: Ligeramente citotóxico, 49-25%: Moderadamente citotóxicos, 24-0%: Extremadamente citotóxico³⁴, podemos afirmar que a 24 horas se consideraría el efecto del Control de quitosano “Ligeramente citotóxico”, mientras que el compósito Quitosano-Neomicina sería considerado “No citotóxico”.

A 92 horas se observó una proliferación superior en el quitosano que, en el compuesto, seguida de una caída en la proliferación de ambas muestras a 164 horas a un nivel que se consideraría citotóxico. Esto puede ser explicado debido a que los fibroblastos solo crecen en monocapa, por lo que existe una competencia en el pozo de la placa por espacio para crecer, esto genera que la proliferación de los fibroblastos caiga en un momento dado, y los fibroblastos empiecen a morir, y, cuando los fibroblastos mueren dejan espacio disponible para que los fibroblastos que aún tienen capacidad reproductiva empiecen nuevamente a proliferar. Esto se confirma cuando se puede observar que en las muestras a 216 horas los fibroblastos muestran nuevamente una proliferación elevada, siendo tanto en el control de quitosano como en el compuesto Quitosano-Neomicina, superior a la proliferación en el blanco, sin embargo, se puede observar que en este punto en el que la proliferación de fibroblastos aumenta nuevamente, el compuesto de neomicina se muestra nuevamente superior al control de quitosano en alrededor de un 30%.

9 CONCLUSIÓN.

El procedimiento desarrollado en este trabajo demostró ser sencillo y efectivo en la síntesis de compósitos de Quitosano-Neomicina, además, de que no afectó negativamente las propiedades de los precursores para una futura aplicación médica.

Se determinó adecuadamente las interacciones intermoleculares que se presentan al mezclar quitosano con neomicina, pues se concluyó que la neomicina interactúa por medio de sus grupos hidroxilos secundarios con los grupos amino del quitosano, interfiriendo así con la formación de puentes de hidrogeno entre las cadenas del quitosano.

Las imágenes obtenidas por medio de un Microscopio Electrónico de Barrido demostraron que es posible modificar la morfología superficial de las películas de quitosano simplemente agregando neomicina, además de que se pueden obtener diferentes resultados sobre la superficie de las películas variando el porcentaje de neomicina que se le adiciona a las soluciones de las cuales se hacen las películas; pudiendo obtenerse micro rugosidades conformadas por diferentes estructuras, o reduciéndose la presencia de rugosidades en la superficie al aumentar significativamente la concentración de neomicina.

Los análisis de Actividad Antimicrobiana revelaron que existe un efecto sinérgico entre el quitosano y la neomicina que potencia los efectos del compósito formado por estos dos componentes tanto contra bacterias Gramnegativas, como contra bacterias Grampositivas, resultando en una total eliminación de la presencia de bacterias en las muestras del compósito incluso a tiempo 0.

Por último, los análisis de viabilidad celular demostraron que la película no tiene un efecto citotóxico sobre las células, y estas pueden proliferar en presencia del compósito incluso a un nivel superior a la proliferación que se tiene en el quitosano, el cual está ya comprobado que tiene propiedades regenerativas.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Yousef H, Sharma S. *Anatomy , Skin (Integument), Epidermis.*; 2017.
2. MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Mater Today.* 2008;11(5):26-35. doi:10.1016/S1369-7021(08)70087-7
3. Senet P. *Fisiología de La Cicatrización Cutánea.* Vol 42. Elsevier; 2008. doi:10.1016/s1761-2896(08)70356-x
4. Buitrago Jaramillo J. *Biología De Las Heridas Y El Proceso De Cicatrización.*; 2019.
<http://blog.utp.edu.co/cirugia/files/2011/07/biologiadelasheridasyelprocesodecicatrizaciondocumento.pdf>
5. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. *Reglamento Técnico Para El Abordaje Integral de Lesiones En Clínica Forense.*; 2010. <http://www.medicinalegal.gov.co/documents/48758/78081/R6.pdf/694176ec-e044-4266-a9d1-61543adc343c>
6. García Palomo JD, Agüero Balbín J, Parra Blanco JA, Santos Benito MF. Infectious diseases: Concept, classification, general and specific aspects of infections. Criteria for infectious disease suspicion. Complementary diagnostic tests. Indication criteria. *Medicine (Baltimore).* 2010;10(49):3251-3264. doi:10.1016/S0304-5412(10)70027-5
7. Saavedra Lozano J, Santos Sebastián M, González F, Hernández Sampelayo Matos T, Navarro Gómez ML. Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos. In: *Enfermedades Infecciosas Pediátricas.* Vol 5. ; 2016:159-175. <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/piel.pdf>
8. Valencia Basto C. CICATRIZACIÓN: PROCESO DE REPARACIÓN TISULAR. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS. *Investig Andin.* 2010;12(20):85-98.
9. Hollinger JO. *An Introduction to Biomaterials.*; 2011. doi:10.1201/b11561
10. Darshan GH, Kong D, Gautrot J, Vootla S. Physico-chemical characterization of *Antheraea mylitta* silk mats for wound healing applications. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-11. doi:10.1038/s41598-017-10531-7
11. Baltodano Torres LC, Yaipen Chicoma JE, Fuertes Ruitón CM. Obtención, caracterización y diseño de una forma farmacéutica semisólida (ungüento) a base de quitosano con efecto cicatrizante. 2006;37(6).
12. Á. Ramírez M, T. Rodríguez A, Alfonso L, Peniche C. La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola. *Biotechnol Apl.* 2010;27(0):262-269.
13. García Paz F de M. Efecto Antitumoral de la IL-12 en un Modelo Murino de Cáncer Cervicouterino VPH 16 Positivo Mediante Micropartículas de Chitosán

en spray con aplicación Tópica. Published online 2013.

14. Zhu YH, Yang CZ, Kirsch WM. Agente hemostático para uso tópico e interno. Published online 2012:1-37.
15. Mahmoudzadeh Sedigh M, Fassihi A, Emami J, Davies NM, Dorkoosh F. Physicochemical, pharmaceutical and biological approaches toward designing optimized and efficient hydrophobically modified chitosan-based polymeric micelles as a nanocarrier system for targeted delivery of anticancer drugs. *J Drug Target*. 2013;21(8):693-709. doi:10.3109/1061186X.2013.824455
16. Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebato MA, Rivero-González D, Bosquez-Molina E, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S. Propiedades Químico-Estructurales Y Actividad Biológica De La Quitosana. *Rev Chapingo Ser Hortic*. 2009;15(3):307-317.
17. Chirkov SN, Il'ina A V., Surgucheva NA, et al. Effect of Chitosan on systemic viral infection and some defense responses in potato plants. *Russ J Plant Physiol*. 2001;48(6):774-779. doi:10.1023/A:1012508625017
18. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010;144(1):51-63. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012
19. Chen CS, Liao WY, Tsai GJ. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *J Food Prot*. 1998;61(9):1124-1128. doi:10.4315/0362-028X-61.9.1124
20. Shahidi F, Kamil Vidana Arachchi J, Jeon YJ. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci Technol*. 1999;10(2):37-51. doi:10.1016/S0924-2244(99)00017-5
21. Rabea EI, Badawy MET, Stevens C V., Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1457-1465. doi:10.1021/bm034130m
22. Cuero RG, Osuji G, Washington A. N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: Role of zinc. *Biotechnol Lett*. 1991;13(6):441-444. doi:10.1007/BF01030998
23. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial Action of Chitosan. *Food Biotechnol*. 1992;6(3):257-272. doi:10.1080/08905439209549838
24. C. Goy R, De Britto D, B. G. Assis O. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros*. 2009;19(3):241-247. doi:10.1590/S0104-14282009000300013
25. Merlusca IP, Matiut DS, Lisa G, et al. Preparation and characterization of chitosan-poly(vinyl alcohol)-neomycin sulfate films. *Polym Bull*. 2018;75(9):3971-3986. doi:10.1007/s00289-017-2246-1
26. Supriya A, Sundaraseelan J, Srinivas Murthy B, Bindu Priya M. Formulation

and Invitro Characterization of Neomycin Loaded Chitosan Nanoparticles. *Acta Sci Pharm Sci*. 2018;2(2):34-40.

27. The American Society of Health-System Pharmacists. Neomicina tópica. Published 2017. <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682274-es.html>
28. National Center for Biotechnology Information. Neomycin sulfate. PubChem Compound Summary for CID 24978553. Published 2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neomycin-sulfate>
29. Cue Brugueras M. Neomicina. Published 2010. <http://www.infomed.cu>
30. Fernandes Queiroz M, Teodisio Melo KR, Araujo Sabry D, Lanzi Sasaki G, Oliveira Rocha HA. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Mar Drugs*. 2015;13(1):141-158. doi:10.3390/md13010141
31. Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, 3rd Edition.*; 2004.
32. Park JB, Kim YJ, Kim SM, et al. Non-destructive electron microscopy imaging and analysis of biological samples with graphene coating. *2D Mater*. 2016;3(4). doi:10.1088/2053-1583/3/4/045004
33. Chung YC, Su YP, Chen CC, et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25(7):932-936.
34. Garcia Contreras R, Acosta Torres L, Arenas Arrocena C, Rodríguez Torres P, Universidad Nacional Autónoma de México. *Manual Para La Enseñanza Práctica Del ENSAYO MTT PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS.*; 2019.