

Segundo informe técnico

Resultados obtenidos durante la segunda etapa del proyecto 00000000252439

Imelda Olivas Armendáriz, Laura Elizabeth Valencia Gómez, Claudia Alejandra Rodríguez González, Santos Adriana Martel Estrada, Florinda Jiménez Vega

Resultados.

Películas poliméricas de O-Carboximetil quitosano y extracto de *Mimosa tenuiflora* (OCMC/Ext.), entrecruzadas con genipina

Se obtuvo una película delgada, con un alto grado de adherencia y soluble en agua a temperatura ambiente; la cual se muestra en la **Figura 1**.



Figura1. Película polimérica de O-Carboximetil quitosano y extracto de *Mimosa tenuiflora*, elaborada utilizando el método de evaporación de disolvente a temperatura ambiente.

Prueba de hinchamiento

En la **Figura 2**, se presenta la gráfica del porcentaje de hinchamiento de las películas poliméricas con diferentes películas de OCMC/Ext., después de 12 horas de exposición en solución de PBS 1X, en donde se observa el aumento del porcentaje de hinchamiento tras el paso del tiempo.

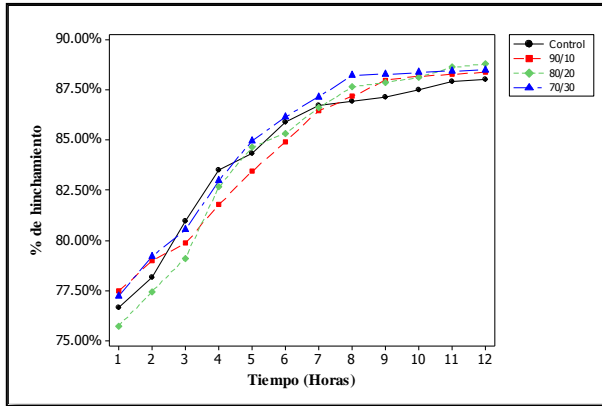


Figura 1. Representación gráfica del porcentaje de hinchamiento con respecto al peso a diferentes intervalos de tiempo de las películas de OCMC/Ext. y genipina como agente entrecruzante.

Cinética de degradación enzimática *in vitro*, determinación de la actividad enzimática de la lisozima sobre la red polimérica de O-Carboximetil quitosano y extracto de *Mimosa tenuiflora*

La pérdida de peso fue registrada mediante la toma del peso inicial de la muestra, y el final después de la exposición con la enzima. En la **Figura 4**, se observa la gráfica del porcentaje de pérdida de peso de las diferentes películas de OCMC/Ext. después de 24 horas de exposición a la enzima, apreciándose en todas las muestras una pérdida del alrededor del 50% en las primeras dos horas. Todas las muestras tuvieron un incremento en su porcentaje de pérdida hasta un 81% luego la hora 14, estabilizándose hasta el final de la prueba. No hubo una diferencia significativa entre las diferentes muestras de OCMC/Ext. en su porcentaje de pérdida de peso, por lo que sugiere que la incorporación del extracto en la red polimérica del OCMC no afecta en su propiedad de biodegradación mediada por la enzima lisozima.

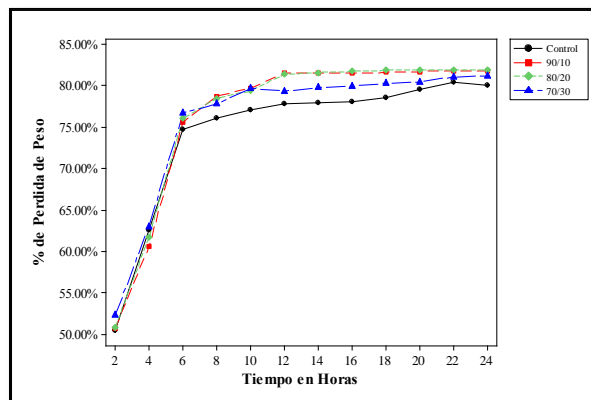


Figura 4. Representación gráfica del porcentaje de pérdida de peso de las películas de OCMC/Ext. (0, 10, 20 y 30%) durante 24 horas de degradación enzimática con lisozima.

Observación de la variación del espesor de las películas frente a la actividad enzimática de la lisozima

Al observar las películas en el microscopio de luz visible antes y después de su degradación, se apreció que el espesor de la película se disminuyó por la actividad hidrolítica de la lisozima en los enlaces β (1-4) del OCMC, disgregando la red polimérica de la película de OCMC entrecruzada químicamente con genipina, valores descritos en la **Tabla 1**. En la **Figura 5**, se observan las imágenes tomadas en el microscopio de las diferentes películas, antes de la degradación y después de 24 horas en exposición a la enzima lisozima. Como se observa en la tabla 3, la disminución del espesor de las diferentes muestras fue proporcional a la pérdida de peso descrita en la **Figura 20**.

Tabla 1. Espesor en μm de las películas de OCMC/Ext. antes y después de su degradación enzimática a diferentes intervalos de tiempo.

Muestra	Tiempo						
	0 hora	4 horas	8 horas	12 horas	16 horas	20 horas	24 horas
Control	635.54 \pm 3.66 a	155.98 \pm 3.05 a	112.41 \pm 2.26 a	104.23 \pm 1.45 a	70.91 \pm 1.99 a	69.34 \pm 2.22 a	67.43 \pm 2.19 a
OCMC/Ext.10%	637.28 \pm 1.44 a	158.03 \pm 3.50 a	114.44 \pm 2.09 a	101.23 \pm 2.87 a	71.21 \pm 2.75 a	69.12 \pm 1.60 a	69.12 \pm 1.41 a
OCMC/Ext.20%	634.26 \pm 3.70 a	157.23 \pm 1.67 a	112.71 \pm 2.95 a	105.55 \pm 2.01 a	71.91 \pm 3.23 a	70.11 \pm 2.71 a	68.32 \pm 2.29 a
OCMC/Ext.30%	629.8 \pm 3.88 a	163.60 \pm 1.75 a	110.32 \pm 1.23 a	102.33 \pm 3.02 a	72.42 \pm 1.55 a	67.23 \pm 1.33 a	65.56 \pm 1.84 a

Los valores se presentan como media con \pm desviación estándar. Las diferencias entre letras en una misma columna indican diferencias significativas (n=10, p<0.05).

En la elaboración de películas para el tratamiento de heridas cutáneas superficiales es importante estandarizar un espesor específico, debido a que esta característica física afecta directamente las propiedades de las películas como en su hinchamiento, biodegradación, propiedades mecánicas, antimicrobianas, entre otras. En varios estudios se ha encontrado que el espesor óptimo de estas películas ronda en 700 \pm 20 μm (Arevalo, *et al.*, 2010), rango alcanzado en todas de las muestras con los diferentes porcentajes de OCMC/Ext. sin

degradar.

Valoración del pH de la solución de PBS durante la degradación enzimática

El pH inicial de la solución amortiguadora con la enzima al empezar el análisis fue de 7.382, el cual empezó a bajar en todas las muestras de películas en las primeras horas de la prueba; como se puede observar en la **Figura 6**. Al incorporar el extracto a la película de OCMC, el pH tiende a disminuir más lentamente a comparación con la película control sin el extracto.

Figura 2. Representación gráfica de la variación del pH durante la degradación enzimática con lisozima de las películas de OCMC/Ext. con la enzima lisozima.

Cuando el OCMC está en la solución de PBS, sus grupos aminos empiezan a protonarse, provocando una disminución en el pH de la solución, esto se puede observar en todas las muestras a las primeras horas; de manera similar, al empezar su función la enzima contra los enlaces β (1-4) del OCMC, los productos de su degradación, generalmente oligosacáridos o monosacáridos, tienen a acidificar ligeramente la solución, provocando la disminución de pH. Las películas con extracto contienen AGPs, y se conoce que estas glucoproteínas poseen una carga parcial ligeramente negativa, por lo que pueden contrarrestar la disminución del pH de la solución al incorporarse a la solución de PBS mediante su liberación, detallada en la **Tabla 2**.

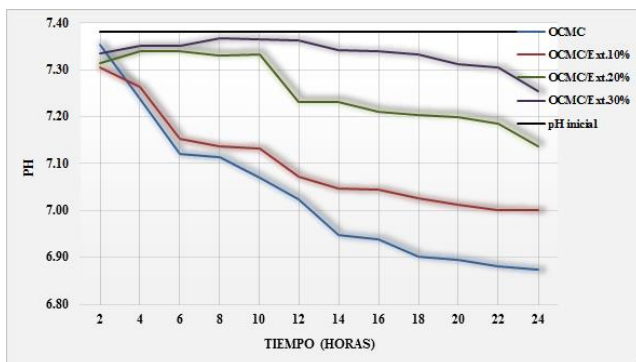


Tabla 2. Porcentajes de liberación de los arabinogalactanos presentes en las películas de OCMC/Ext., mediante la medición en UV-visible a 580 nm y 280 nm.

Muestra	% de liberación
OCMC/Ext.10%	51.90%

OCMC/Ext.20%	63.51%
OCMC/Ext.30%	70.92%

En consecuencia, el análisis de la degradación enzimática indica que las películas de OCMC con extracto de Mimosa son susceptibles a la acción hidrolítica de la enzima lisozima, condición ventajosa si se desea que la película se degrade de forma biológica en la herida en un tiempo de 24 horas.

Determinación de la actividad Antibacteriana con bacterias Gram + y Gram-

En la **Figura 7**, se observa la gráfica de porcentaje de la actividad antibacteriana de las diferentes películas de OCMC/Ext. a 1, 3, 5 y 24 horas, para la bacteria *M. lysodeikyticus*, donde se muestra un aumento conforme el tiempo de la actividad antibacteriana en todas las muestras. En la primera y tercera hora se logra apreciar una diferencia significativa entre la película de OCMC control sin extracto y las películas con extracto, observando que al aumentar la concentración de extracto en la película aumenta la actividad antibacteriana. Luego de veinticuatro horas, todas las películas llegaron entre un 16 a 18% de actividad sin diferencias significativas entre ellas.

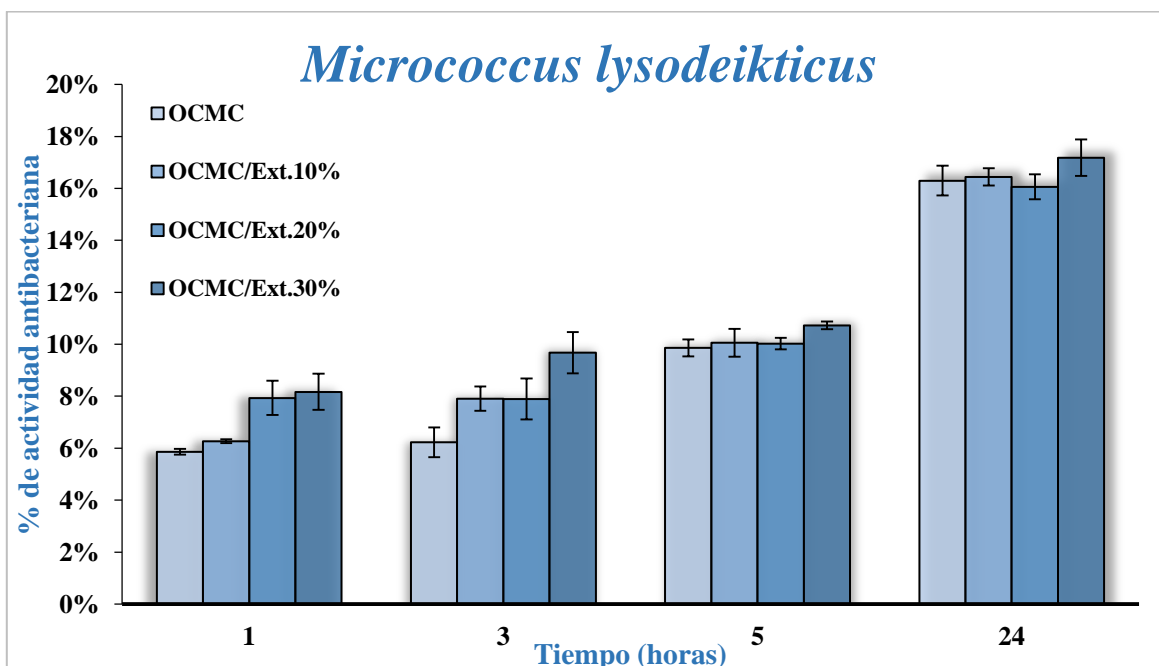


Figura 7. Representación gráfica de la actividad antibacteriana de las diferentes películas de OCMC/Ext. de Mimosa a 1, 3, 5 y 24 horas de exposición con la bacteria *M. lysodeikticus*.

La bacteria *M. lysodeikticus*, también llamada *Micrococcus luteus*, es una bacteria Gram positiva, posee una morfología de esférica y con una agrupación en tétradas; es una especie aerobia obligada, y por lo general, es encontrada en la tierra, polvo, agua y aire, además de formar parte de la flora bacteriana de la piel en la mayoría de los mamíferos. Al ser una Gram positiva, la *M. lysodeikticus* posee una gruesa pared celular, la cual le da su mayor mecanismo de resistencia contra sustancias antibacterianas. El extracto utilizado para la elaboración de las películas contiene alcaloides, moléculas que pueden interrumpir la pared bacteriana de peptidoglucanos provocando una lisis celular, aumentando de la actividad antibacteriana de las películas con extracto en comparación de la película control en las primeras horas de exposición. Sin embargo, este efecto tiende a disminuir conforme el paso del tiempo, observando que, luego de 5 horas, las películas con extracto tienen una actividad similar que la del control.

En la **Figura 8**, se observa la gráfica de la actividad antibacteriana de las diferentes películas de OCMC/Ext. frente a la bacteria *E. coli*, en donde se observa que, en la primera, tercera y quinta hora, las muestras con extracto tienen una mayor actividad que la muestra control. Luego de veinticuatro horas, todas las películas muestran una actividad similar, de entre 22 a 24%.

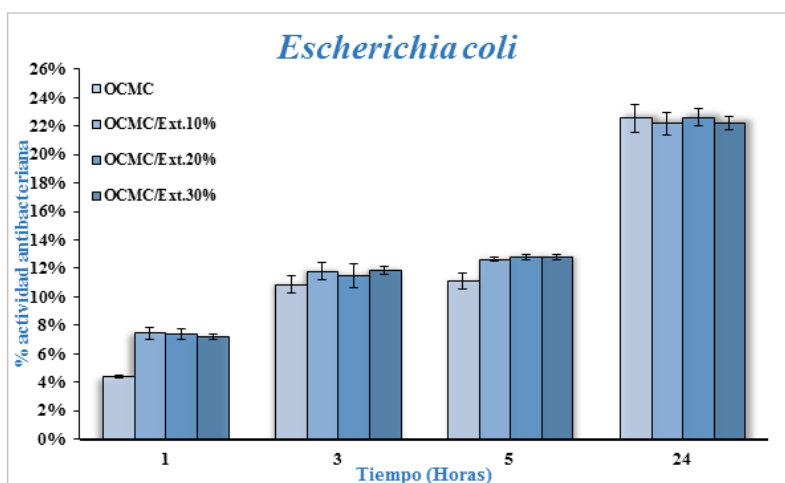


Figura8. Representación gráfica de la actividad antibacteriana de las diferentes películas de OCMC/Ext. de Mimosa a 1, 3, 5 y 24 horas de exposición con la bacteria *E. coli*.

La *E. coli*, es una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos de los animales y en aguas residuales. Es un bacilo anaerobio facultativo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, además de poseer movimiento al tener flagelos peritricos. Al ser una bacteria Gram negativa, posee dos membranas lipídicas en las que se localiza entre ambas una fina pared de peptidoglicano, las cuales le dan protección contra antibióticos y agentes antibacteriales. Sin embargo, las películas de OCMC con o sin extracto, presentaron una actividad antibacteriana contra la *E. coli* desde la primera hora de exposición, observándose que el extracto aumenta de manera significativa la actividad antibacteriana de las películas en las primeras 5 horas. Luego de 24 horas, se observa que la película control de OCMC se iguala con las películas con extracto, teniendo una actividad similar.

Al comparar ambos resultados, se observa que las películas tienen una mayor actividad frente la bacteria *E. coli* al final de la prueba, por lo que se puede afirmar que las todas las películas presentan una mayor actividad antibacterial ante bacterias Gram – que con bacterias Gram +. Finalmente, se observa que la incorporación del extracto a la película de OCMC aumenta de manera temporal su actividad contra ambas bacterias. Esto posiblemente es debido a que, en las primeras horas, el extracto se libera de la película hacia el medio donde se encuentra la bacteria, realizando una lisis celular al interrumpir la pared o membrana bacteriana. Posteriormente, con el paso del tiempo el extracto liberado pierde su función y solo es la película de OCMC la que cumple con la función antibacterial en la película.

Caracterización física y térmica

Prueba de tensión

En la **Tabla 3**, se muestran los valores obtenidos de la prueba de tensión para las películas a diferentes concentraciones de OCMC/Ext., los valores del módulo de Young obtenidos están relacionados con los resultados de porcentaje de elongación, esto significa que la película con un menor un menor módulo de Young requiere una menor fuerza para ser

deformada, por lo tanto tiene un mayor porcentaje a la elongación. El OCMC al ser un derivado soluble en agua, sus propiedades mecánicas de las películas se modifican en comparación con las películas su precursor el quitosano, las cuales tienen a tener un porcentaje de elongación bajo y un módulo de Young mucho mayor, en comparación de las películas de OCMC (Ma, *et al.*, 2016; Shariatinia y Fazli, 2015). De manera similar, la incorporación de moléculas entre las cadenas del polímero, en este caso los AGPs, pueden bajar la resistencia a la tensión al interrumpir el ordenamiento de la estructura de las películas, disminuyendo la homogeneidad de las cadenas del polímero; sin embargo, dichas moléculas pueden aumentar el porcentaje de elongación sí se distribuyen de manera uniforme a lo largo de la matriz polimérica, no obstante no se encontraron diferencias significativas en el módulo de Young y en la resistencia a la tensión entre las diferentes películas, lo que sugiere que la incorporación del extracto en la red polimérica de OCMC y genipina no se ve afectada en sus propiedades mecánicas por los AGPs (Ma, *et al.*, 2016).

Tabla 3. Propiedades mecánicas de las películas poliméricas de OCMC/Ext., obtenidas mediante una prueba de tensión.

Muestra	Espesor (mm)	Resistencia a la tensión (MPa)	Porcentaje de elongación (%)	Módulo de Young (MPa)
OCMC	0.635±0.36 a	0.181 ± 0.043 a	41.65 ± 0.40 a	5.57 ± 0.54 a
OCMC/Ext.10%	0.637±0.34 a	0.185 ± 0.054 a	42.19 ± 0.70 a	5.97 ± 0.52 a
OCMC/Ext.20%	0.634±0.34 a	0.216± 0.076 a	42.43 ± 1.06 a	5.54 ± 0.64 a
OCMC/Ext.30%	0.629±0.38 a	0.171±0.043 a	42.13 ± 0.61 a	5.02 ± 0.54 a

Los valores se presentan como media con \pm desviación estándar. Las diferencias entre letras en una misma columna indican diferencias significativas (n=3, p<0.05).

Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó con el fin de estudiar los cambios promovidos por el efecto de la temperatura y el contenido del extracto de *Mimosa tenuiflora* en las películas. Los termogramas de TGA obtenidos, observados en la **Figura 9**, muestran el comportamiento de la estabilidad ante la degradación térmica de las películas de OCMC con o sin extracto. Por otro lado, las temperaturas de degradación inicial (Td), pérdida de peso en cada etapa (%W), y el porcentaje de residuo final de la prueba se presentan en la **Tabla 4**.

De manera general, las películas de OCMC con o sin extracto presentaron una pérdida de peso en tres pasos, de la misma manera que se ha observado en estudios previos en películas de quitosano (Z. Shen, D.P. Kamdem, 2015; H. Celebi, A. Kurt, 2015). Sin embargo, todas las películas de OCMC presentaron un cuarto paso de pérdida de peso después de los 600°C. La primera pérdida de peso presentada en temperaturas de degradación iniciales de 78 a 80°C, se debe a la evaporación del agua residual, obtenida durante el proceso de elaboración de las películas. Se encontró que las películas de OCMC/Ext. al 10% y 20% tuvieron una pérdida de peso menor en este primer paso. Esto pudo ser debido a que contenían una menor cantidad de agua que las OCMCy OCMC/Ext.30%.

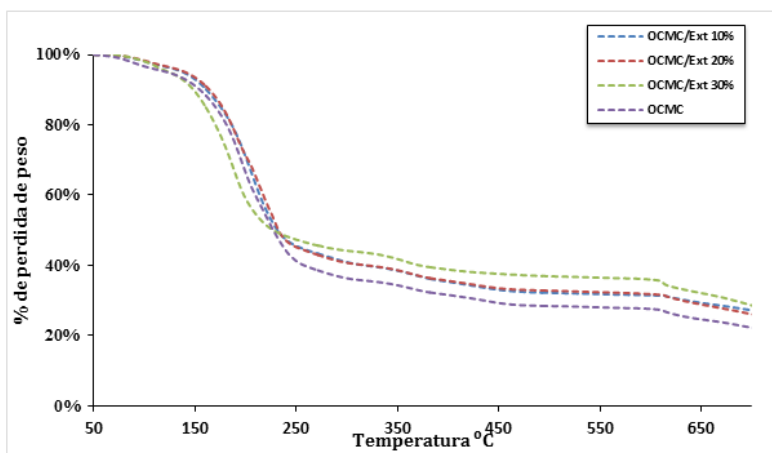


Figura 93. Termogramas de la película control y de las películas de OCMC/Ext.

Tabla 4. Temperatura inicial de degradación (Td), diferencia de pérdida de peso (Δw) y residuo final, de las películas de OCMC control y con los diferentes porcentajes de extracto de *Mimosa tenuiflora*.

Muestra	$\Delta 1$		$\Delta 2$		$\Delta 3$		$\Delta 4$		Residuo (%)
	Td°C	$\Delta w\%$	Td°C	$\Delta w\%$	Td°C	$\Delta w\%$	Td°C	$\Delta w\%$	
Control	78.8	3	136.5	1	340.6	6	609.8	7	22.26
		6.63		57.67		8.30		5.13	
OCMC/Ext. 10%	79.6	5	134.8	3	341.2	1	612.0	6	
		4.90		54.44		8.79		5.30	
OCMC/Ext. 20%	79.8	1	134.9	1	341.2	5	612.2	1	26.11
		4.83		54.42		8.81		5.61	
OCMC/Ext. 30%	79.8	5	132.3	3	341.8	7	612.3	3	28.65
		7.35		50.71		4.99		7.23	

$\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ y $\Delta 4$ representan la primera, segunda, tercera y cuarta etapa de pérdida de peso de cada película.

La segunda etapa de pérdida de peso, con temperaturas iniciales de 132 a 137 °C, corresponde al inicio de la degradación del polímero, en donde las fracciones del polímero de bajo peso molecular se degradan y el agua estructural en la red polimérica de la película se evapora. Es en esta etapa cuando se pierde la mayor cantidad de peso en todas las películas, siendo la película de OCMC con una mayor pérdida de peso con un 57.67%; mientras que las películas de OCMC/Ext. 10% y 20% obtuvieron una pérdida alrededor de 54% y la película de OCMC/Ext. experimento un 50.71% de pérdida, lo que indica que el aumento de la concentración del extracto disminuye la pérdida de peso de las películas en esta segunda etapa.

La tercera etapa, con una temperatura inicial de degradación de 340 a 342 °C, se asocia a un proceso complejo de deshidratación de los anillos de la cadena polimérica del OCMC, además de una descomposición y despolimerización del polímero. De nueva cuenta, fue la película de OCMC/Ext.30% la que obtuvo un menor porcentaje de pérdida de peso, con un 4.99%, a comparación de las demás películas, las cuales rondaron en 8% de pérdida de peso.

El cuarto descenso de peso, observado a temperaturas iniciales de degradación de 612 a 620 °C, el cual posiblemente se deba a una última degradación del polímero, resultado de la descomposición del producto carbonizado, bajando el peso de todas las muestras en esta última etapa. Al final de la prueba, se observa que el porcentaje de residuo fue mayor para las películas con extracto, el cual ronda entre 26 a 29%, mientras que la película control obtuvo un 22.26%. Esto indica que la película control sin extracto fue más susceptible a la degradación térmica al final de la prueba, y que, después de la segunda etapa de pérdida de peso fue la película de OCMC/Ext.30% la que fue más estable ante el aumento de la temperatura.

Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido

En la **Figura 10**, se muestran los DSC de las diferentes películas de OCMC/Ext., donde todas las películas muestran un pico endotérmico en entre 50 y 130 °C, relacionado con la evaporación del disolvente retenido en la película, en este caso el disolvente utilizado fue el agua, la cual es retenida por la red polimérica del OCMC y la genipina. El siguiente pico observado en las películas se encuentra entre las temperaturas de 290 °C a 325 °C, y se atribuye a la descomposición del polímero al ser un proceso exotérmico.

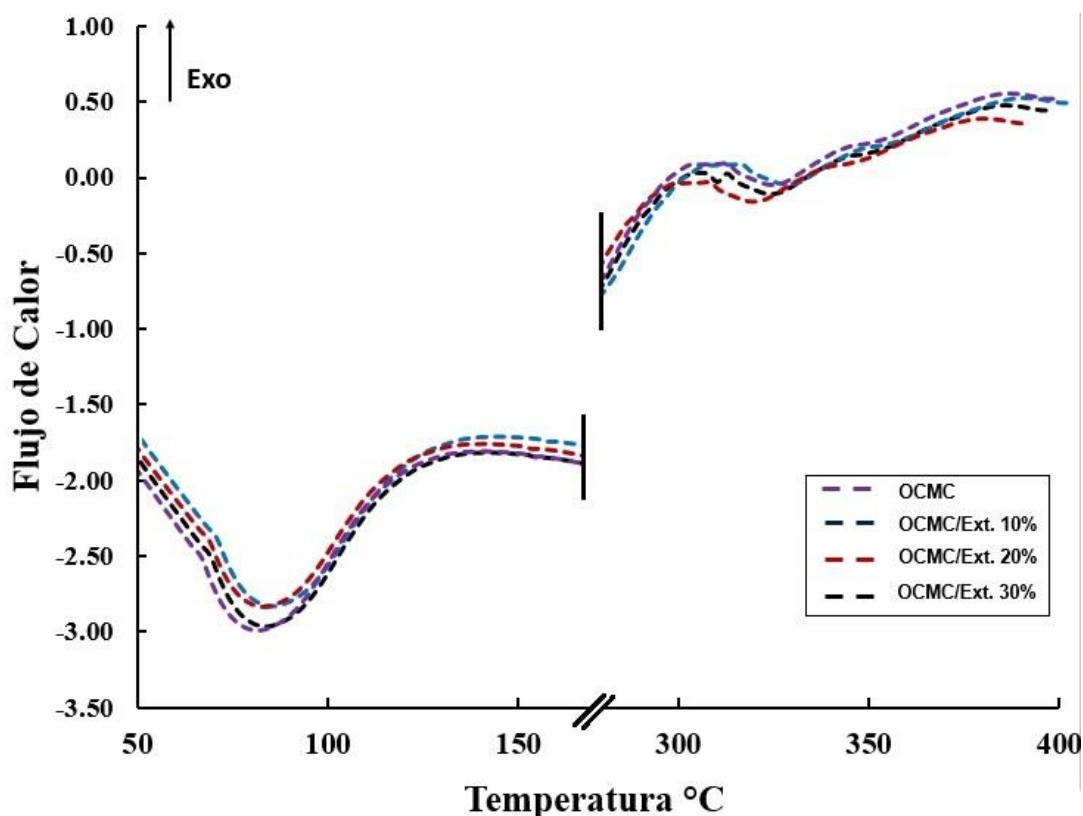


Figura 40. Curvas de DSC para las diferentes películas de OCMC/Ext.

Se puede apreciar que existen pequeñas diferencias entre las curvas de DSC de las películas, encontrando que se necesitó aportar más energía térmica en las películas de OCMC y OCMC/Ext. 30% para producir la evaporación de disolvente, lo que indica que fueron las películas con mayor contenido de agua en su red. En cuanto al pico exotérmico, se encontró que la temperatura de degradación se modifica con la incorporación del extracto, provocando que se corra hacia la derecha, encontrando temperaturas del pico exotérmico más altas para las películas de OCMC/Ext.

Análisis químico de las películas mediante FT-IR sometidas a la degradación térmica

De manera general, la degradación térmica de los polímeros es un fenómeno complejo y difícil de analizar, el cual involucra un sinnúmero de tipos de reacciones químicas. Las macromoléculas orgánicas son estables solamente por debajo de ciertos límites de temperatura, y se sobrepasa esa temperatura, las moléculas empiezan a descomponerse en fragmentos más pequeños como radicales libres, iones, moléculas gaseosas, etc. Esto es

debido a que los enlaces covalentes son vencidos por el calor suministrado al polímero. La descomposición térmica de un polímero puede ocurrir de muchas maneras, dando como resultado la pérdida de los plastificantes y de los grupos laterales; también puede existir una reacción en presencia de oxígeno o puede presentarse un reacomodo menos estable de la cadena polimérica original. En resumen, la pirolisis es un proceso en los polímeros que consiste en reacciones de escisión de la cadena polimérica para formar fragmentos de bajo peso molecular y gases, y en reacciones de condensación para formar polímeros de carbono. Las reacciones de escisión ocurren en temperaturas inferiores a 500°C, y las segundas surgen a partir de sobrepasar dicha temperatura.

En las **Figuras 11, 12, 13 y 14** se presentan los FT-IR obtenidos de las películas de OCMC con las diferentes concentraciones de extracto de *Mimosa tenuiflora* antes de la prueba y en las diferentes etapas de degradación térmica, donde las muestras se calentaron en presencia de aire hasta la temperatura final de cada etapa. En los espectrogramas mostrados en las figuras se pueden apreciar las señales características de las especies presentes en las muestras durante la prueba. Mediante el análisis de los espectros de las películas antes de la degradación térmica, se encontró que todas las muestras presentan una intensificación de la banda en la región 1403 cm^{-1} , específica para el grupo $-\text{COO}-$. Asimismo, la presencia de una banda entre 3602 a 2066 cm^{-1} indica la presencia de grupos OH en el material; además, las bandas obtenidas en la región 2922 cm^{-1} y 2889 cm^{-1} evidencia la presencia de grupos $-\text{CH}_2$ (simétrica y asimétrica); la señal encontrada en 1608 cm^{-1} se asigna al grupo $-\text{NH}_2$ y las señales en 1304 y 1040 cm^{-1} para los grupos CH_3 y C-O respectivamente, confirmando la estructura química básica de la cadena del polímero (Ardelean y col., 2009; Subhash y col., 2012; Ge y Luo, 2005). Al exponer las muestras a un aumento de temperatura hasta alcanzar cada una de las etapas de degradación se puede observar una aparición de señales y desvanecimiento de otras en todas las muestras, las cuales se enlistan en la **Tabla 5**.

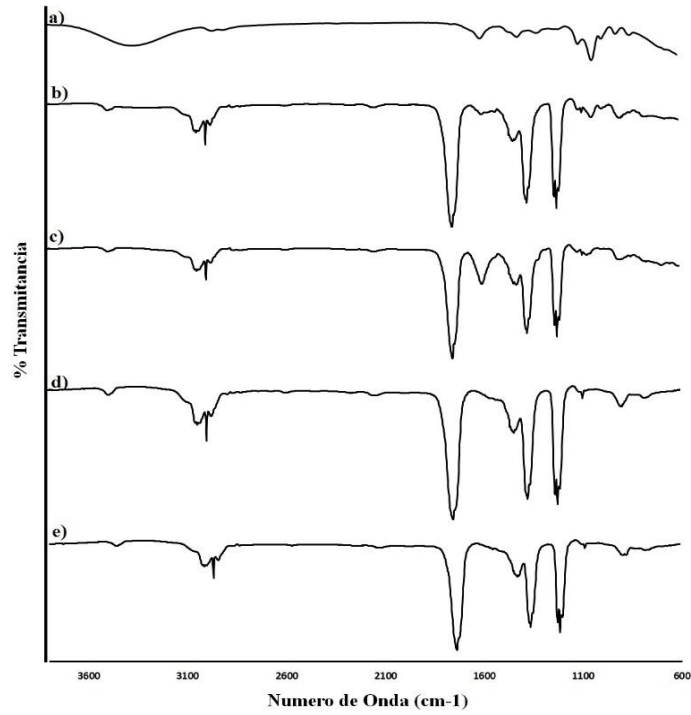


Figura 11. Espectros de la película OCMC tratada a diferentes temperaturas: a) sin tratamiento, b) 140°C, c) 360°C d) 465°C y e) 615°C.

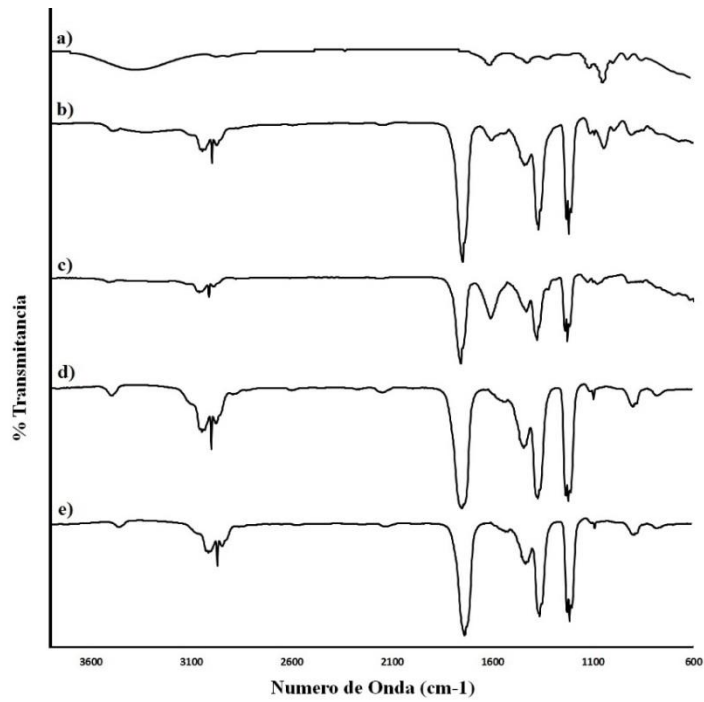


Figura12. Espectros de la película OCMC/Ext.10% a tratada a diferentes temperaturas: a) sin tratamiento, b) 140°C, c) 360°C d) 465°C y e) 615°C.

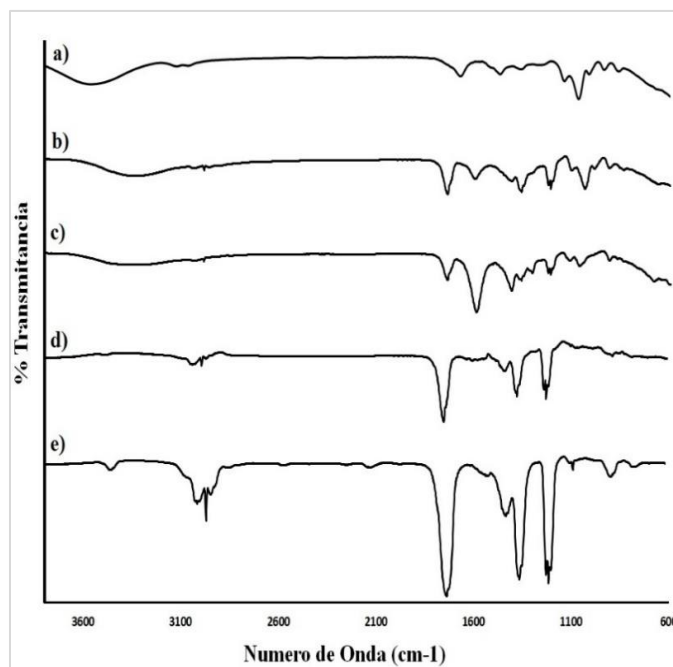


Figura13. Espectros de la película OCMC/Ext.20% a tratada a diferentes temperaturas: a) sin tratamiento, b)140°C, c) 360°C d) 465°C y e) 615°C.

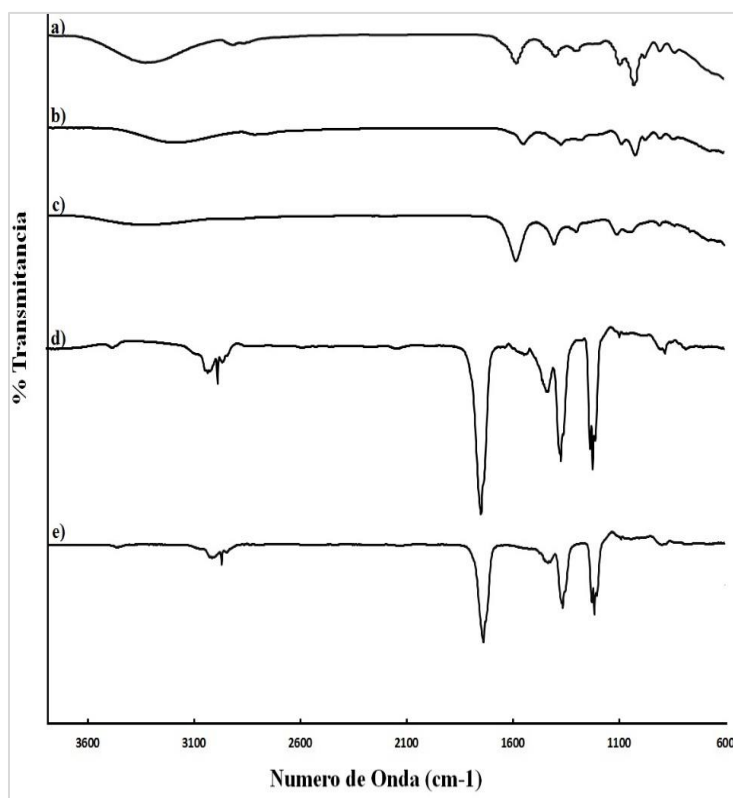


Figura14. Espectros de la película OCMC/Ext.30% a tratada a diferentes temperaturas: a) sin tratamiento, b)140°C, c) 360°C d) 465°C y e) 615°C.

Tabla 5. Señales encontradas en las etapas de degradación térmica y grupos funcionales de las películas de OCMC/Ext.

Muestra	Etapas	Longitud de onda (cm-1)	Grupo funcional
OCMC	Sin tratamiento	1040, 1304,1403, 1608, 2889-2922, 3602-2066	C-O, CH ₃ , COOH, NH ₂ , CH ₂ , OH
	1 er etapa	2927-2868, 1739, 1594, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O, NH ₂ ,CH ₂ , CH, C-C
	2da etapa	2927, 2868, 1739, 1594, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O, NH ₂ ,CH ₂ , CH, C-C
	3era etapa	2927, 2868, 1739, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O,CH ₂ , CH, C-C
OCMC/Ext. 10%	Sin tratamiento	1040, 1304,1403, 1608, 2889-2922, 3602-2066	C-O, CH ₃ , COOH, NH ₂ , CH ₂ , OH
	1 er etapa	2927-2868, 1739, 1594, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O, NH ₂ ,CH ₂ , CH, C-C
	2da etapa	2927-2868, 1739, 1594, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O, NH ₂ ,CH ₂ , CH, C-C
	3era etapa	2927-2868, 1739, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O,CH ₂ , CH, C-C
OCMC/Ext. 20%	Sin tratamiento	1040, 1304,1403, 1608, 2889-2922, 3602-2066	C-O, CH ₃ , COOH, NH ₂ ,CH ₂ , OH
	1 er etapa	1739, 1594, 1440, 1365, 1216	C=O, NH ₂ , CH ₂ , CH,C-C
	2da etapa	1739, 1594, 1440, 1365, 1216	C=O, NH ₂ , CH ₂ , CH,C-C
	3era etapa	2927-2868, 1739, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O,CH ₂ , CH, C-C
OCMC/Ext. 30%	Sin tratamiento	1040, 1304,1403, 1608, 2889-2922, 3602-2066	C-O, CH ₃ , COOH, NH ₂ ,CH ₂ , OH
	1 er etapa	1040, 1304,1403, 1608, 2889-2922, 3602-2066	C-O, CH ₃ , COOH, NH ₂ ,CH ₂ , OH
	2da etapa	1594, 1440, 1365, 1216	NH ₂ , CH ₂ , CH, C-C
	3era etapa	2927, 2868, 1739, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O,CH ₂ , CH, C-C
	4ta etapa	2927, 2868, 1739, 1440, 1365, 1216	CH ₃ , C=O,CH ₂ , CH, C-C

Se puede observar en la tabla 5 que la degradación térmica de las películas en presencia de aire provoca una pérdida considerable de las moléculas características del polímero OCMC, como son los grupos NH₂, COOH y OH, y provocando el surgimiento de otros grupos como: C=O, C-C y CH. Algunos autores reportan que en las primeras etapas de la degradación en los materiales elaborados de quitosano o de sus derivados los grupos que son eliminados inicialmente son el agua residual, y los grupos aminos e hidroxilos (Sánchez y col., 2015; Chen y col., 2016; Kim y col., 2016), lo que confirma los resultados obtenidos en nuestro análisis.

Hablando de los grupos que aparecen durante la degradación térmica, se puede observar que la atmosfera empleada durante la prueba interactúa directamente con el polímero, provocando la producción del C=O desde la primera etapa de degradación para las películas de OCMC, OCMC/Ext.10%, OCMC/Ext.20%; y para la película de OCMC/Ext.30% se presentó hasta la segunda etapa. También, se puede apreciar una disminución considerable en el avance de la degradación térmica en las películas con una mayor cantidad de extracto de *Mimosa tenuiflora*, ya que en la película OCMC/Ext. 30% se aprecia que en su primera

etapa de degradación térmica la película mantiene las señales de los grupos característicos de OCMC, atrasando aparición de los grupos C=O, C-C y CH, y la desaparición de los grupos NH₂, COOH, OH; complementando los resultados obtenidos en el análisis de TGA, donde la película de OCMC/Ext.30% fue más estable al aumento de temperatura, en comparación de la película de OCMC, la cual obtuvo una mayor pérdida de peso al final de la prueba, siendo más susceptible al aumento de la temperatura.

Determinación del carácter hidrofílico de la superficie de las películas

Los valores de ángulo de contacto obtenidos de la película OCMC control sin extracto se muestran en la **Tabla 6**, donde (t) es el tiempo de la medición después de la deposición de la gota en segundos, CA(M) es la media del ángulo de contacto, CA(L) es el ángulo de contacto del lado izquierdo y el CA(R) es el ángulo de contacto del lado derecho de la gota. Luego de aproximadamente 6 segundos la gota fue absorbida por completo por la superficie de la película, como se observa en la **Figura 15**, lo que demuestra el carácter hidrófilo inmediato de la película.

En este trabajo, la incorporación de un grupo carboximetil a la cadena principal del quitosano, induce el aumento del carácter hidrófilo del material. Como se sabe, debido a las cargas positivas de sus moléculas, el quitosano interactúa fuertemente con las membranas celulares mediante fuerzas electrostáticas, propiedad útil en varias aplicaciones biomédicas. Sin embargo, el quitosano es una molécula que solo es soluble en pH ácidos, lo que lo vuelve parcialmente hidrofílico, limitando en gran medida su interacción con el agua (Ferreira y col., 2016; A.E. Wiacek y col., 2016). Al incorporar la molécula de carboximetil (CH₂COOH) al quitosano, las películas elaboradas con OCMC adquieren un mayor carácter hidrofílico que las elaboradas con su precursor.

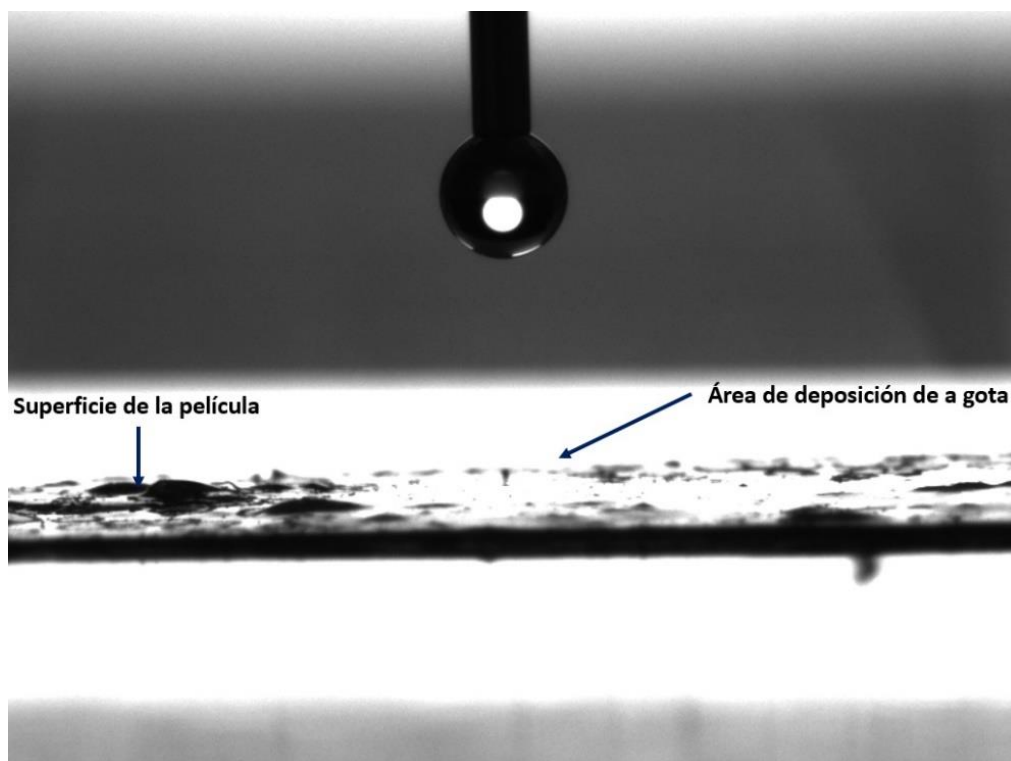


Figura15. Imagen tomada durante la prueba de ángulo de contacto, después de 6 segundos del depósito de la gota en la superficie de la película control de OCMC.

Tabla 6. Mediciones del ángulo de contacto con gota de agua, para la película control de OCMC.

t [s]	CA(M) [°]	CA(L) [°]	CA(R) [°]
1.3066	90.3	90.3	90.3
2.0406	38.4 ±5.74	32.6	44.6
2.5186	9.2	9.2	9.2
3.2566	7.9	7.9	7.9
3.3986	2.9 ± 0.09	3	2.8
3.4766	2.8 ± 0.14	2.7	3
3.5546	2.6 ±0.14	2.8	2.5
3.6326	2.3 ± 0.22	2.5	2.1
3.7106	2.3 ± 0.13	2.4	2.2
4.1787	2.1 ± 0.36	2.5	1.7
5.8953	1.8 ± 1.72	3.5	0.1

Las mediciones las películas de OCMC con extracto se hicieron de manera análoga, obteniendo resultados muy similares a los de la película control (**Figura 16**). El ángulo de contacto de la gota de agua se midió en la superficie superior de todas películas, las cuales no se vieron afectadas por la incorporación o el aumento del extracto en su composición,

comportándose de manera muy similar durante la prueba, lo que comprueba el carácter hidrofílico inmediato de todas las películas de OCMC/Ext.

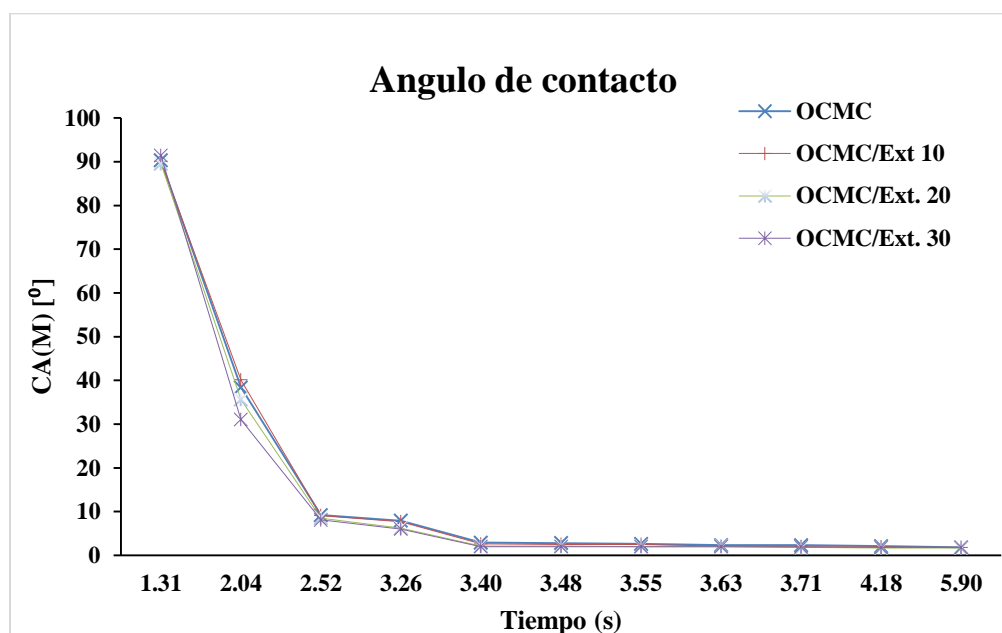


Figura16. Evolución temporal del ángulo de contacto medio CA(M) de una gota de agua para los diferentes tipos de películas.

Caracterización biológica

Evaluación de la adhesión y proliferación celular

Las células del tejido conectivo por lo general se adhieren al entrar en contacto con una superficie adecuada para su crecimiento, este proceso está dado por las proteínas de adhesión, en donde la calidad de la adhesión celular depende directamente de la morfología, la proliferación y la diferenciación de las células. Por lo tanto, es necesario evaluar los efectos de las diferentes películas de OCMC/Ext. en la morfología de los fibroblastos 3T3 a diferentes intervalos de tiempo una vez afectuada una siembra de 50000 células en cada muestra.

En la **Figura 17**, se observa las imágenes con un aumento de 10x del control positivo (pozos sin película), en donde se logra apreciar la proliferación y el cambio de morfológico de los fibroblastos en intervalos de tiempo de 2, 6, 8 y 24 horas. Se puede observar luego de 24 horas que los fibroblastos del control positivo empiezan a presentar una morfología

características de estas células, con un núcleo ovoide y pálido, y el citoplasma se extiende irregularmente alrededor del núcleo formando prolongaciones y conexiones con otras células.

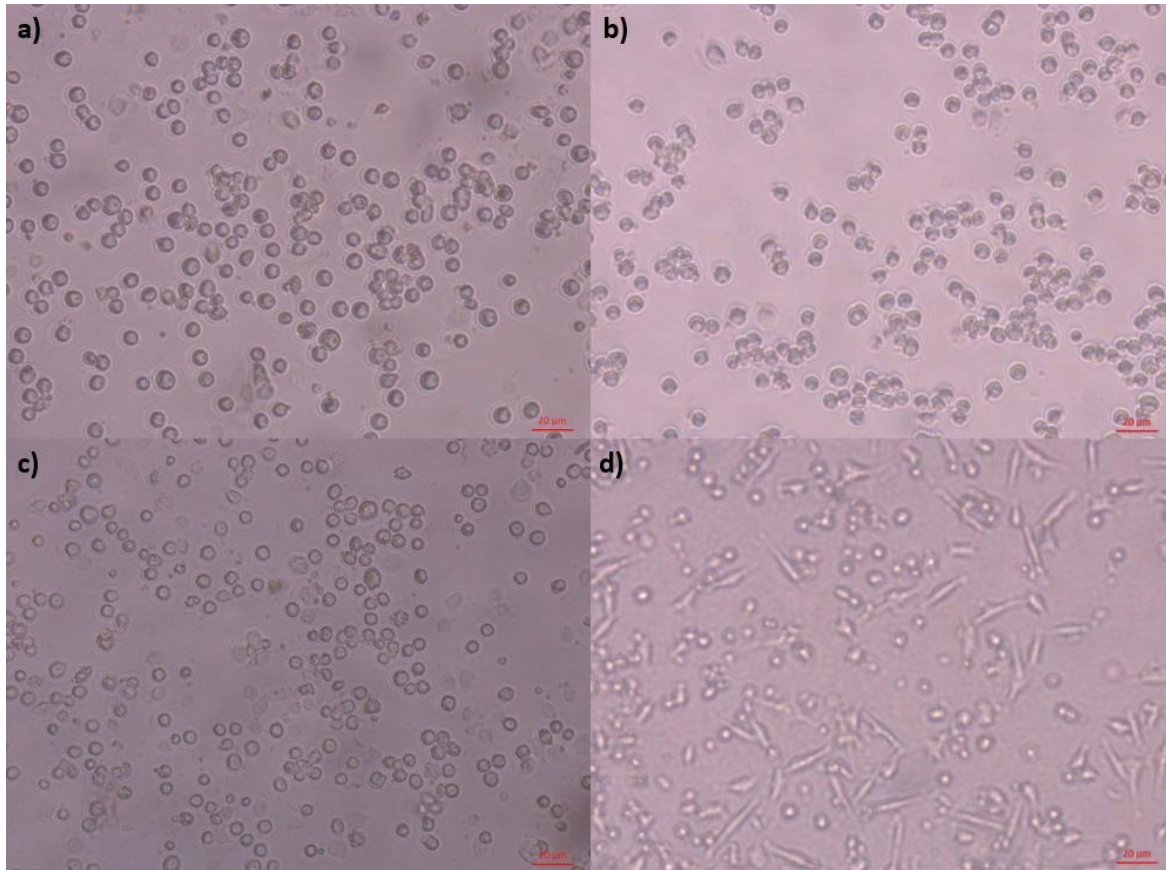


Figura17. Visualización al microscopio de fibroblastos 3T3 utilizados como controles positivos (pozo sin muestra) a los a) 2, b) 6, c) 8 y d) 24 horas de incubación observadas a 10x.

En la **Figura 18**, se presentan las imágenes de las células sembradas sobre la película de OCMC durante un periodo de incubación de 2, 6, 8 y 24 horas. De manera similar, las células presentan una morfología típica después de las 24 horas de incubación, aunque se logran observar un mayor número de células con prolongaciones citoplasmáticas que el control positivo. En las películas de OCMC/Ext. 10% y OCMC/Ext. 20% (**Figuras 19 y 20**), se logra observar una tendencia similar a la película de OCMC, aunque la cantidad de células observadas después de 24 horas es mayor. En las películas de OCMC/Ext. 30% (**Figura 20**), se logra apreciar un ligero cambio de la morfología en las células a partir de la hora 6 de incubación, observando como los fibroblastos empiezan a extender su citoplasma,

para la hora 8 de siembra, las prolongaciones son mucho mas largas y las células empiezan a tener la morfología característica de los fibroblastos activos. Después de las 24 de incubación, los fibroblastos en la película de OCMC/Ext. 30% están adheridas por completo al material, formando uniones entre células, además el número de células por campo es mucho mayor a comparación de las demás muestras.

Al observar las células sembradas en las películas después de 24 horas de incubación con un aumento mayor a 40X (**Figura 22**), se logra apreciar más claramente la morfología celular y las conexiones formadas entre células. Observando que los fibroblastos sembrados en las películas de OCMC/Ext. 20% y 30%, presentan más uniones que en las películas de OCMC y OCMC/Ext. 10%, por lo que esta activación del cambio de la morfología se le puede atribuir a la presencia del extracto contenido en la película.

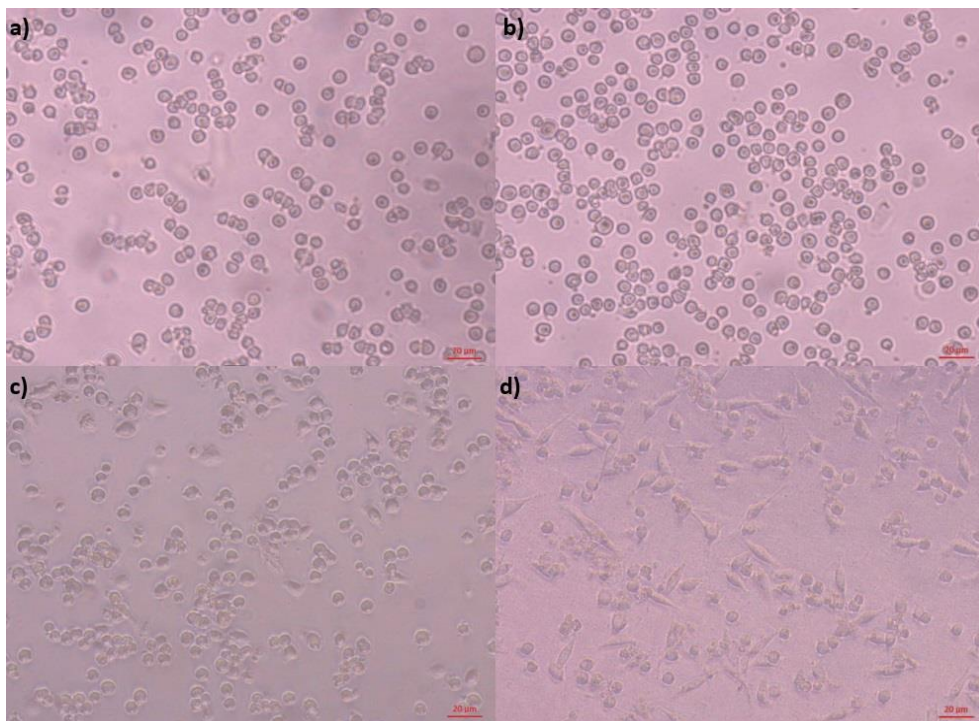


Figura 18. Visualización al microscopio de fibroblastos 3T3 sembrados en la película OCMC a los a) 2, b) 6, c) 8 y d) 24 horas de incubación observadas a 10x.

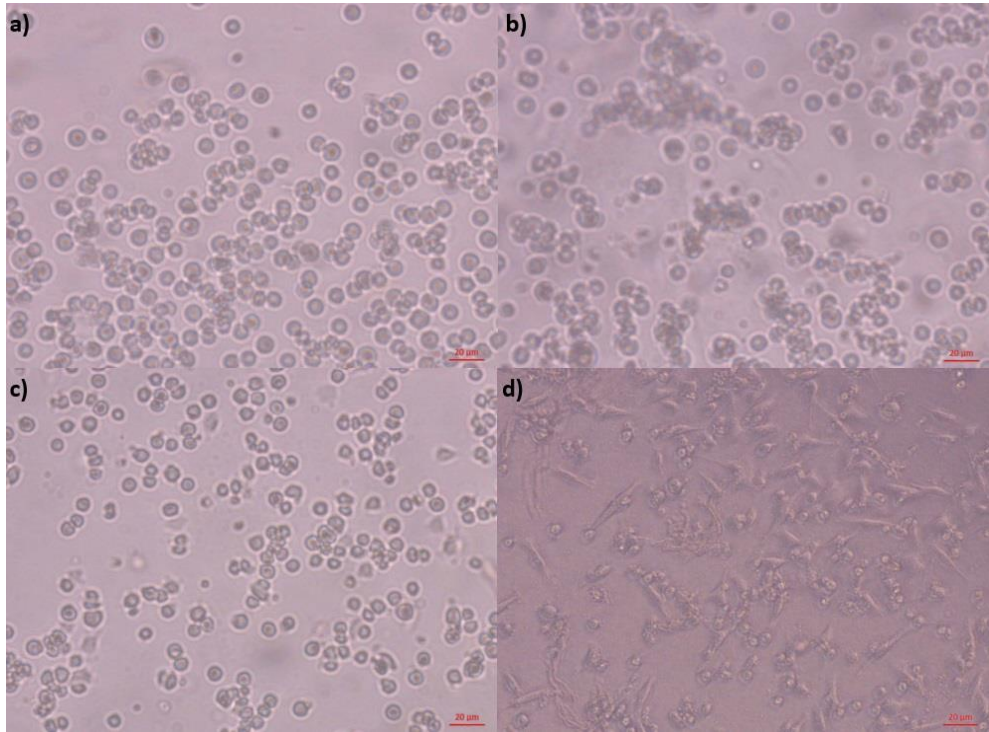


Figura 195. Visualización al microscopio de fibroblastos 3T3 sembrados en la película OCMC/Ext. 10% a los a) 2, b) 6, c) 8 y d) 24 horas de incubación observadas a 10x.

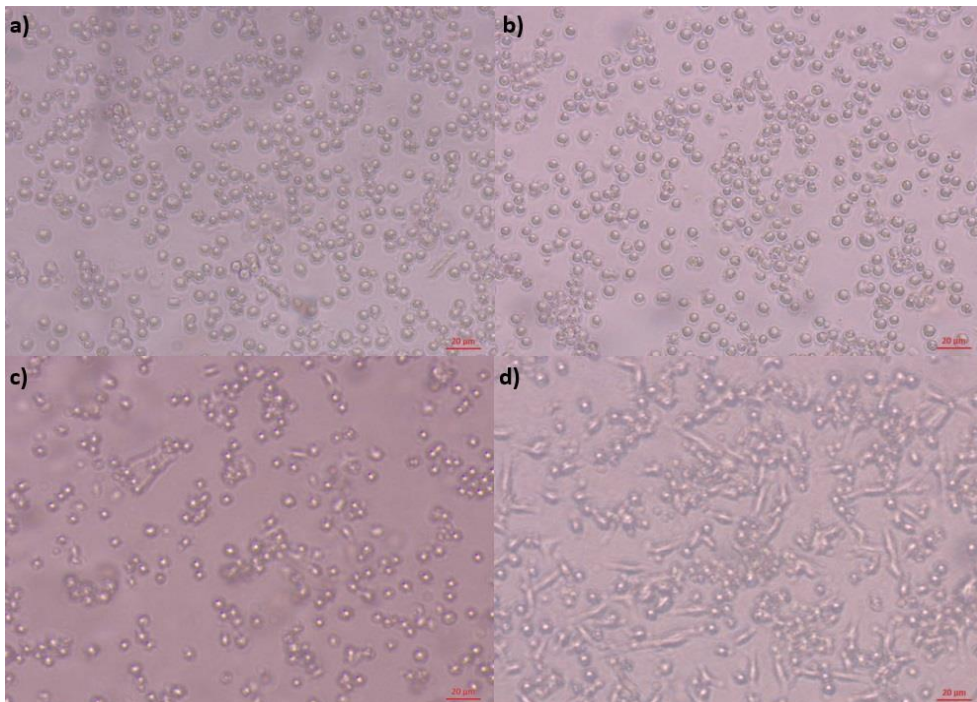


Figura 206. Visualización al microscopio de fibroblastos 3T3 sembrados en la película OCMC/Ext. 20% a los a) 2, b) 6, c) 8 y d) 24 horas de incubación observadas a 10x.

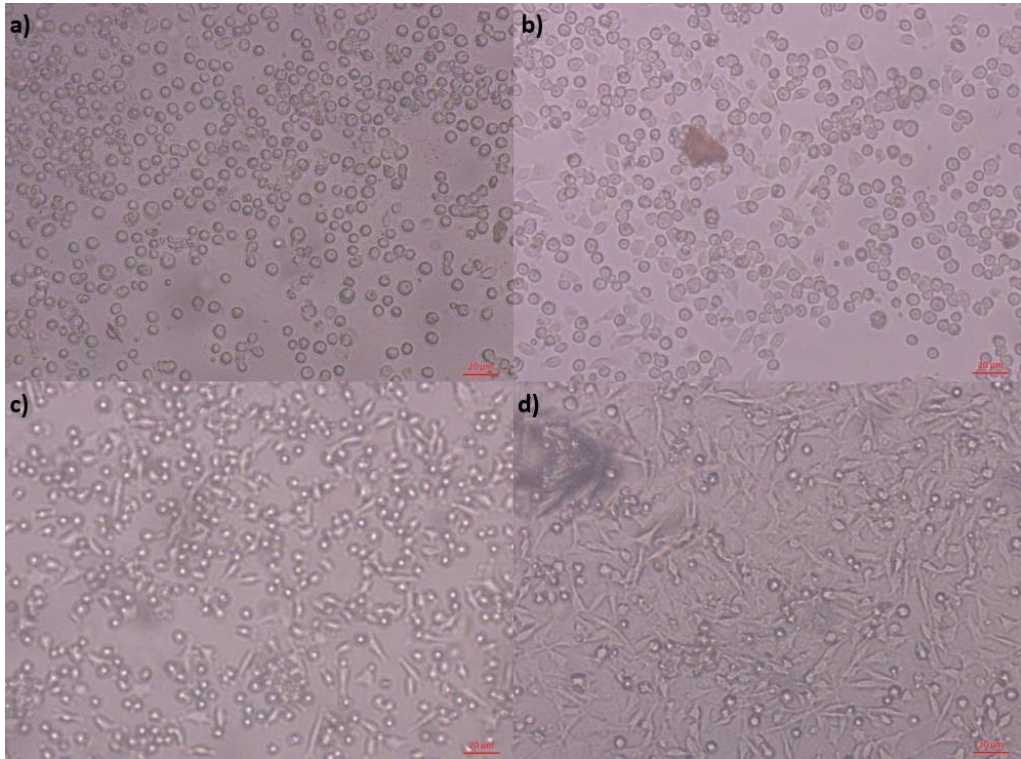


Figura21. Visualización al microscopio de fibroblastos 3T3 sembrados en la película OCMC/Ext. 30% a los a) 2, b) 6, c) 8 y d) 24 horas de incubación observadas a 10x.

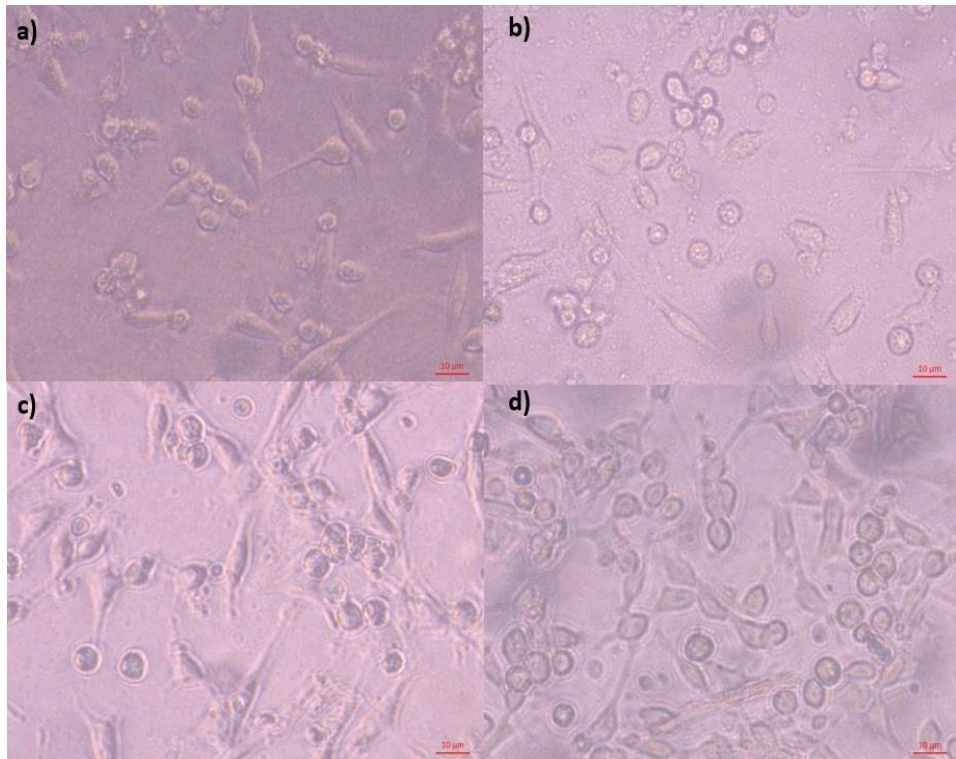


Figura 227. Imágenes tomadas a 40X después de 24 horas de siembra, a) película control, b) película OCMC/Ext. 10%, c) película OCMC/Ext 20%, d) película OCMC/Ext 30%.

Al realizar el recuento total de células por área (0.030 mm^2) de los diferentes experimentos (**Figura 23**), se encontró que el control positivo tiene un incremento gradual del número de células conforme aumenta el tiempo de incubación. En las primeras 2 horas de incubación, todos los experimentos mostraron la misma tendencia, sin encontrar diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, al incrementar el tiempo de incubación a 6 horas los experimentos de OCMC/Ext. 20% y 30% empiezan a tener un mayor número de células por área que los experimentos del control positivo, OCMC y OCMC/Ext. 10%, y esa tendencia se mantiene para las 8 horas de incubación. Luego de 24 horas de incubación, se observa que los experimentos con películas con extractos tienden a acelerar la proliferación de los fibroblastos en comparación que el control positivo, y que el aumento del contenido de extracto en la película incrementa, de manera significativa, el número de células por área; lo que demuestra que la propiedad de proliferación del extracto ante este tipo de células.

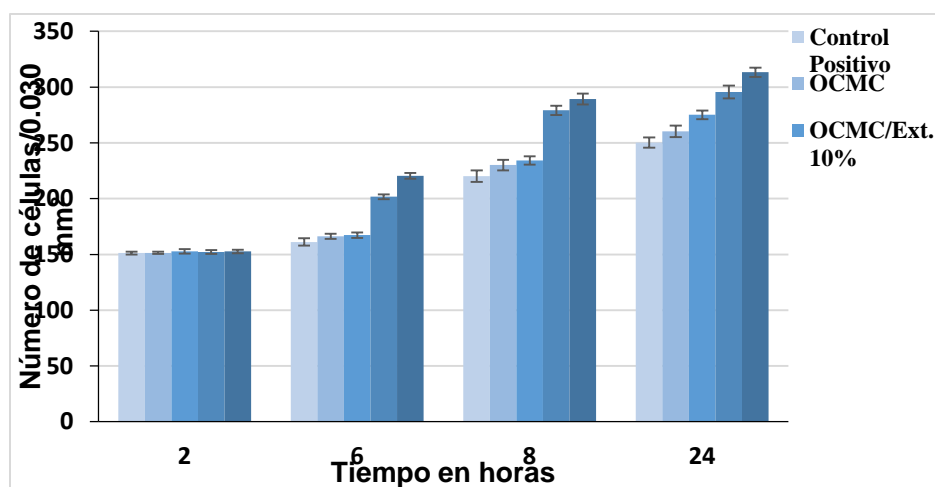


Figura23. Número de células por área del control positivo y de las películas OCMC/Ext.

Visualización de la adhesión y morfología celular mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina

En este trabajo, se realizó una tinción con los colorantes Hematoxilina y eosina para la observación morfológica de los fibroblastos sembrados en las películas de OCMC con diferentes concentraciones del extracto de *Mimosa tenuiflora* después de 24 horas de incubación. En la **Figura 24**, se muestran las imágenes tomadas después de la tinción, observándose el citoplasma celular de un color rosa característico de la tinción con eosina,

mientras que el núcleo toma una tonalidad rosa/morado, diferenciándose perfectamente el contorno de la membrana citoplasmática y el contorno de núcleo de las células dianas. Al comparar las imágenes obtenidas de la observación microscópica de los fibroblastos sembrados en las películas y del control positivo una vez teñidos, se encontró que el número de células por campo fue mucho mayor en los pozos con película en comparación del pozo del control positivo, además de que las células sembradas en las películas tienen una morfología más alargada y con una mayor interacción célula-célula; además, se comprobó que la adición de extracto de *Mimosa tenuiflora* en la película mejora la adhesión y la confluencia celular en de los fibroblastos sembrados en el material; confirmando los resultados obtenidos de proliferación mediante el conteo de células por área.

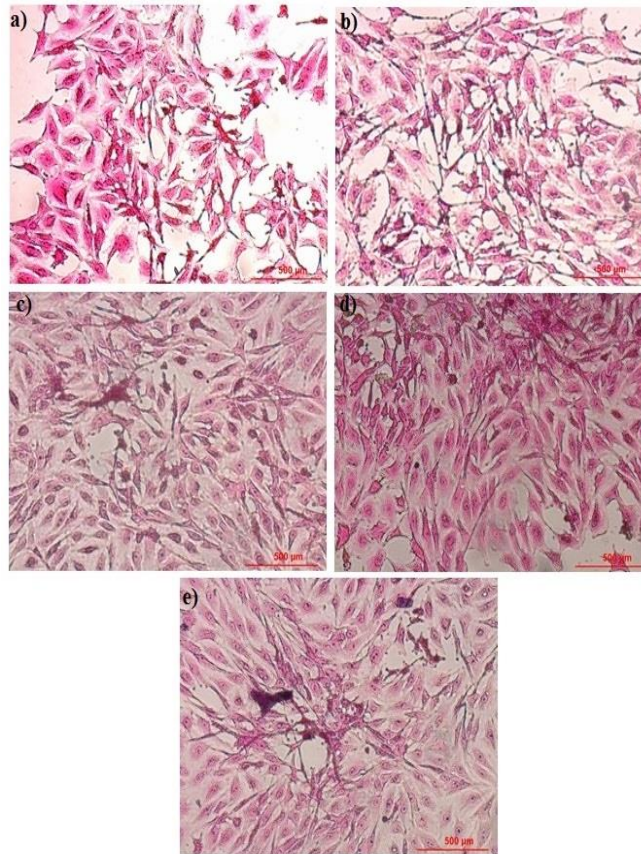


Figura24. Imágenes de fibroblastos observados en el microscopio óptico a 20X después de 24 horas de incubación y teñidos con los colorantes hematoxilina y eosina, sembrados en: a) control positivo (sin película), b) película de OCMC, c) película de OCMC/Ext. 10%, d) película de OCMC/Ext. 20%, y e) película de OCMC/Ext. 30%.

Visualización de la morfología celular mediante Fluorescencia

En este trabajo se realizó una tinción a los fibroblastos sembrados sin material como control positivo luego de 24 horas de incubación, utilizando dos tintes fluorescentes: DAPI, para la observación de los núcleos celulares, y Calcein AM, para la observación del citoplasma celular. En la **Figura 25**, se presenta la imagen del control positivo (sin película) obtenida después de la tinción y de la observación al microscopio, pudiéndose apreciar los núcleos de los fibroblastos en color azul envueltos por el citoplasma; resultados similares se han obtenido en otras investigaciones al utilizar DAPI como tinte fluorescente para la identificación del núcleo de los fibroblastos (Zakrzewicz y col., 2015; Karpus y col., 2016; Keivani y col., 2016). También, se puede apreciar las interacciones célula-célula y su distribución de los fibroblastos por área. Como se sabe, el DAPI es un tinte que fluoresce al estar en contacto con el ADN, y que en células vivas su permeabilidad es limitada, por lo que al ser una prueba con células vivas y en medio de cultivo, algunos de los fibroblastos vistos durante la observación microscópica no se aprecia su núcleo. Por su parte, el citoplasma de las células es claramente observable en la prueba al utilizar el tinte fluorescente Calcein AM, apreciándose alrededor de nucleó celular con una intensidad menor.

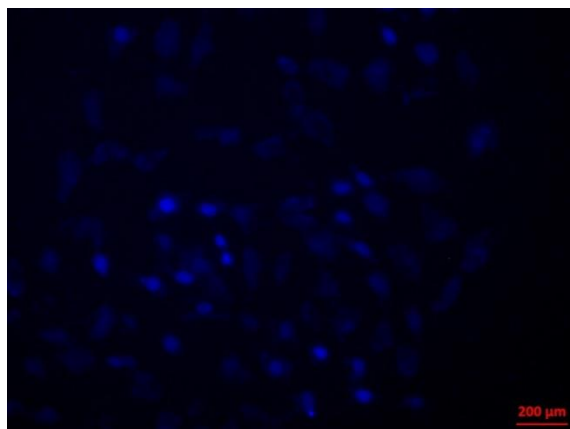


Figura 258. Observación al microscopio a 20X de los fibroblastos del control positivo luego de 24 horas de incubación, mediante la tinción de DAPI y Calcein AM.

Posteriormente se realizó el mismo procedimiento para los fibroblastos sembrados en las películas de OCMC con las diferentes concentraciones de extracto de *Mimosa tenuiflora* luego de 24 horas de incubación. En la **Figura 26**, se aprecian la fluorescencia de los fibroblastos sembrados mediante la utilización de los tintes DAPI y calcein AM. Como se puede apreciar, en todas las células sembradas en las diferentes películas muestra un

comportamiento similar al control positivo, en el sentido de que el núcleo celular tiene una mayor intensidad que el citoplasma. Sin embargo, la cantidad de células por campo y la interacción célula-célula es mucho mayor en los pozos con muestras, encontrándose con más células por campo durante la observación microscópica.

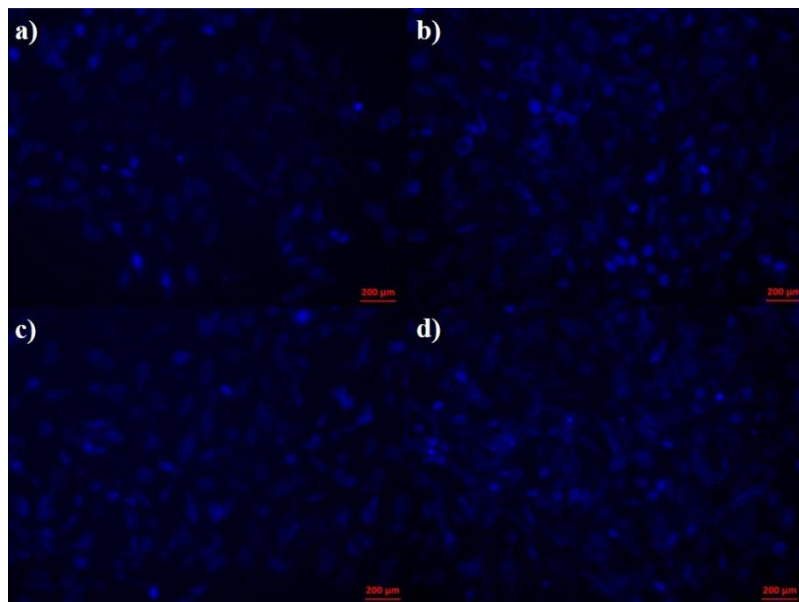


Figura26. Observación al microscopio a 20X de los fibroblastos luego de 24 horas de incubación, mediante la tinción de DAPI y Calcein AM en: a) película de OCMC, b) película OCMC/Ext. 10%, c) película OCMC/Ext. 20% y d) película OCMC/Ext. 30%.

De manera similar que en la tinción de hematoxilina y eosina, la cantidad de células por área y las interacciones célula-célula aumentan considerablemente en las películas con extracto de *Mimosa tenuiflora*, lo que confirma los resultados obtenidos de proliferación celular obtenido mediante el conteo células por área.

Contribuciones al conocimiento

A partir de este trabajo de tesis se desarrolló un procedimiento que permite la obtención de películas formadas con OCMC, reteniendo en su red polimérica extracto de *Mimosa tenuiflora* como ingrediente activo, obteniendo un biomaterial funcional para regeneración tisular y promotor de la cicatrización en piel. Dejando evidencia de uso de estas dos sustancias para la elaboración de un biomaterial funcional, el cual posee varias de las características deseadas para la curación de heridas de piel.

Se estableció la propiedad de biocompatibilidad y la actividad de la proliferación celular de las películas de OCMC/Ext. en presencia de fibroblastos murinos 3T3, constatando los resultados previos sobre estas sustancias por separado en estudios anteriores.

Se determinó las propiedades degradativas ante agentes físicos y bioquímicos de las películas de OCMC/Ext. pudiendo catalogar estos biomateriales como biodegradables. Asimismo, se comprobó la actividad antibacterial de las películas, actividad atribuida a las propiedades antimicrobianas de las dos sustancias predecesoras.

Mediante un análisis de cinética de cicatrización *in vivo* con ratones, se observó la propiedad cicatrizante de las películas OCMC/Ext., observando buenos resultados y dando hincapié a su aplicación como un material de curación de heridas en piel.