



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE APÓSITOS EMPLEANDO FIBROÍNA/SERICINA
DE SEDA SUPLEMENTADOS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

Giovanni Alberto Cuervo Osorio

**Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Medellín, Colombia
2020**



PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE APÓSITOS EMPLEANDO FIBROÍNA/SERICINA DE SEDA
SUPLEMENTADOS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA

GIOVANNI ALBERTO CUERVO OSORIO

Trabajo de investigación para optar por el título de Magíster en Ingeniería de
Materiales

ASESORA

CLAUDIA PATRICIA OSSA OROZCO

INGENIERA MECÁNICA, Ph. D.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOMATERIALES BIOMAT

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE INGENIERÍA

MEDELLÍN

2020

AGRADECIMIENTOS

En este proyecto hay muchas personas a las cuales les debo agradecer, primero a mi familia por todo el apoyo brindado, a mi papá que me ha sabido motivar en los momentos difíciles, también porque a pesar de los años sigue cuidado y preocupándose por mí, porque todo salga bien, de él siempre tengo en la cabeza que las cosas se consiguen con sacrificio y por eso este proyecto se hizo realidad, a mi mamá por cada llamada, por el apoyo, por las palabras de aliento, a mis hermanos de los cuales siempre aprendo algo nuevo, a afrontar la vida y seguir adelante, a mi sobrino porque hace mis días mejores, porque es una persona que me enseña el valor de la nobleza y del preocuparse por los demás y por su famosa frase “no pasa nada”, a mi novia Lorena Arboleda y a su hijo Emiliano por tanto amor que me brindan, porque estuvieron presentes en los dos años de trabajo y estudio que duro esta maestría, por enseñarme a vivir la vida y apoyarme tanto, me alegran la vida con su existencia, a ella en especial porque apareció en los momentos difíciles de estrés y un abrazo era suficiente para mejorar el día y ser tan maravillosa, entre mi familia tengo que mencionar a mi tutora Claudia Patricia Ossa porque más que mi profesora es una persona que considero de mi familia, por su forma de ser, por cómo se preocupa por todos sus estudiantes, porque es una persona incondicional y sincera, por esto la considero una segunda mamá.

A la señora Ligia a don Gustavo y a toda su familia por acogerme en su casa como un miembro más de su familia, por ser mi familia en la ciudad de Medellín.

A todo el grupo de BIOMAT por todos los consejos y apoyo dado, en especial a Mateo Jaramillo y a Liliana Arroyave, una persona muy inteligente el cual resolvió muchas de las dudas que se me presentaron, muy buenas personas he encontrado en este grupo.

A Leonardo y Alexis “los muchachos del INVIMA” por el apoyo, por los momentos de charlas que amenizaban el trabajo, excelentes profesionales y aun mejores personas.

A mis compañeros de coesdua, porque en los momentos que no estaba realizando la maestría, tuve con quien compartir y alegrar los días con risas de paseos fallidos, y con las anécdotas de los realizados, donde descubrimos que un atajo no siempre es un atajo, y que es mejor no perderse en la noche porque en la noche las personas no se ubican, además por los excelentes partidos de los lunes.

En lo académico quiero agradecer a Sandra la persona encargada del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia, por la ayuda con los ensayos antimicrobianos y sobre todo porque en pocos días vi la calidad de ser humano que es.

A Diana Zarate, por todo el apoyo brindado con los ensayos de cultivos celulares y sobre todo porque en un congreso descubrí lo excelente persona que es, además de ser una persona con la cual encontré siempre de que hablar, por su humildad y por estar muy atenta con mi maestría.

Al profesor Diego y sus estudiantes Sara, Fabian y Manuel, por la ayuda y la disposición del Laboratorio de Polímeros y la disposición para ayudarme con las dudas, mucha nobleza descubrí en estas personas.

A Laura y Andrea, mis estudiantes de PIS que contribuyeron a este trabajo, además por permitirme crecer como profesor y persona.

En general quiero agradecer a todos los que, con una palabra, me ayudaron en este proceso quizás sean muchos los que no nombré, pero en este apartado están presentes.

A la universidad de Antioquia y al grupo de investigación BIOMAT es un privilegio formar parte de ellos y representarlos en todo lugar.

Contenido

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	12
1.1. Introducción	13
1.2. Planteamiento del problema	14
1.3. Objetivos	18
1.3.1. General	18
1.3.2. Específicos	18
Bibliografía	19
CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS	21
2.1. Marco teórico	21
2.1.1. Biomateriales	21
2.1.2. Metales	21
2.1.3. Cerámicos	22
2.1.4. Polímeros	22
2.1.5. Seda como biomaterial	23
2.1.6. Fibroína y propiedades	24
2.1.7. Sericina y propiedades	26
2.1.8. Biomateriales y efecto antimicrobiano	26
2.1.9. Piel y enfermedades	27
2.1.10. Apósitos	29
2.2. Estado del arte	30
2.2.1. Nanopartículas con capacidad microbicida	30
2.2.2. Nanopartículas de plata	31
2.2.3. Quemaduras y úlceras cutáneas	31
2.2.4. Apósitos	32
2.2.5. Polímeros naturales usados en la fabricación de apósitos	32
2.2.6. Apósitos de polímeros con adición de plata	33
2.2.7. Apósitos compuestos de fibroína	34
2.2.8. Apósitos compuestos de sericina	35
2.2.9. Reporte de artículos	36
Bibliografía	36
CAPÍTULO III: SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)	45
3.1. Introducción	45
3.2. Materiales y métodos	46
3.2.1. Síntesis de las nanopartículas de plata (AgNPs)	46
3.2.2. Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)	48

3.2.3	Diseño factorial	48
3.3	Resultados y discusión	49
3.3.1	Síntesis de AgNPs	49
3.3.2	Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)	49
3.3.2.1.	Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis).....	49
3.3.2.2.	Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	54
3.3.2.3.	Dispersión dinámica de luz (DLS)	55
3.3.3.	Diseño Factorial	57
3.3.3.1.	Análisis de varianza (ANOVA).....	61
3.3.2.3.	Optimización del diseño	65
	Conclusiones	66
	Bibliografía	66
	CAPÍTULO IV: EXTRACCIÓN DE FIBROÍNA Y SERICINA	68
4.1	Introducción	68
4.2	Metodología	68
4.2.1.	Extracción de Fibroína (SF) y Sericina (SS)	68
4.2.2.	Caracterización	71
4.2.2.1.	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	71
4.2.2.2.	Espectroscopia de UV-Vis	71
4.3	Resultados y análisis	72
4.3.1.	Concentración de las soluciones de fibroína y sericina	72
4.3.2.	Espectroscopia de UV-Vis para fibroína y sericina	74
4.3.3.	Espectroscopia de FT-IR de fibroína y sericina	77
	Conclusiones	79
	Bibliografía	79
	CAPÍTULO V: FABRICACIÓN DE PELÍCULAS DE FIBROÍNA Y SERICINA	82
5.1.	Introducción	82
5.2.	Materiales y métodos	82
5.2.1.	Caracterización	84
5.3.	Resultados y discusión	85
5.3.1.	Fabricación de películas	85
5.3.2.	Evaluación morfológica de las películas	90
5.3.3.	Mojabilidad	97
5.3.4.	Ensayo de degradabilidad	100
5.3.5.	Resistencia mecánica	103
	Conclusiones	107

Bibliografía	107
CAPÍTULO VI: ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE APÓSITOS MULTICAPA	110
6.1. Introducción	110
6.2. Materiales y métodos	110
6.2.1. Elaboración de apósitos	110
6.2.2. Caracterización	111
6.2.2.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	111
6.2.2.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	111
6.2.2.3. Mojabilidad	111
6.2.2.4. Propiedades mecánicas.....	112
6.2.2.5. Capacidad de hinchamiento.....	112
6.2.2.6. Ensayo antimicrobiano.....	112
6.2.2.6. Ensayo de citotoxicidad.....	113
6.3. Resultados y análisis	114
6.3.1. Soluciones de fibroína con AgNPs	114
6.3.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	114
6.3.3. Apósitos obtenidos	115
6.3.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	116
6.3.5. Mojabilidad	119
6.3.6. Resistencia mecánica	120
6.3.7. Hinchamiento	122
6.3.8. Ensayo antimicrobiano	123
6.3.9. Citotoxicidad	128
Conclusiones	130
Bibliografía	131
Conclusiones y consideraciones finales	133

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 Apósito comercial fabricado en capas. Modificado de [34]. 18

CAPÍTULO II

Figura 1 Micrografía SEM de un hilo de seda. Modificado de [22] 24

Figura 2 Capas y grados de quemadura en la piel. Modificado de [45] 28

Figura 3 Apósito usado para la curación de una herida [56]..... 29

CAPÍTULO III

Figura 1 Diagrama de la síntesis de las nanopartículas de plata..... 47

Figura 2 Soluciones de la síntesis de nanopartículas de plata, a. 100 °C ,0.1 y 0.2 M AgNO₃, 10% citrato de sodio, b. 100 °C ,0.1 y 0.2M AgNO₃, 1% citrato de sodio, c. 80 °C ,0.1 y 0.2 M AgNO₃, 10% citrato de sodio, d. 80 °C ,0.1 y 0.2 M AgNO₃ ,1% citrato de sodio 49

Figura 3 Espectros del ensayo con PVA al 10% 50

Figura 4 Espectro UV-Vis del PVA..... 51

Figura 5 Espectro UV-Vis muestras con baja absorbancia 51

Figura 6 Espectro UV-Vis protocolos con bandas en longitud de onda entre 400 y450 nm 52

Figura 7 Espectro UV lo-Vis protocolos con bandas en longitud de onda entre 400 y480 nm .. 52

Figura 8 Espectro UV-Vis protocolos con bandas en longitud de onda entre 400 y550 nm 53

Figura 9 micrografías TEM, a. Ag8 (13 a 40 nm); b.Ag9 (6 a 15 nm); 54

Figura 10 DLS de la muestra Ag 12 55

Figura 11 DLS de la muestra Ag 10 56

Figura 12 DLS de la muestra Ag 8 56

Figura 13 DLS de la muestra Ag 9 56

Figura 14 DLS de la muestra Ag 4 57

Figura 15 Diagrama caja y bigotes para los diferentes factores que afectan la síntesis de AgNPs 59

Figura 16 Diagrama de densidad (superior) e histograma de frecuencia (inferior) de la longitud de onda 60

Figura 17 Interacción de los factores que afectan la síntesis de AgNPs..... 60

CAPÍTULO IV

Figura 1 Metodología para la extracción de la fibroína y sericina 71

Figura 2. Soluciones obtenidas de a. fibroína al 2.6 % w/v; b. Sericina al 0.5% w/v..... 73

Figura 3. Scaffold de Sericina..... 74

Figura 4 Scaffold de fibroína..... 74

Figura 5 Espectro UV-Vis de la fibroína en transmitancia 75

Figura 6 Espectro UV-Vis de la fibroína en absorbancia 75

Figura 7 Espectro UV-Vis de la sericina en absorbancia..... 76

Figura 8 Espectro FTIR de la fibroína 77

Figura 9 Espectro FTIR de la sericina 79

CAPÍTULO V

Figura 1 Esquema de la metodología 1 de procesamiento las películas secadas en horno.....	83
Figura 2 Esquema de la metodología 2 de procesamiento de las películas con ciclo de congelamiento.....	83
Figura 3 Películas de fibroína sin glicerol metodología 1 a. Fibroína 1:1 PVA v/v;.....	86
Figura 4 Películas de fibroína con glicerol metodología 1 a. Fibroína 1:1 PVA v/v;	86
Figura 5 Películas de Fibroína congeladas sin cubrir a. Fibroína 1:1 PVA v/v; b. Fibroína 2:1 PVA v/v; c. Fibroína 3:1 PVA v/v	87
Figura 6 Películas de fibroína congeladas y cubiertas a. Fibroína 1:1 PVA v/v;	88
Figura 7 Películas de sericina sin glicerol y sin congelar a. sericina 1:1 PVA v/v;	88
Figura 8 Películas de sericina con glicerol y sin congelar a. sericina 1:1 PVA v/v;.....	89
Figura 9 Películas de sericina congeladas sin cubrir a. sericina 1:1 PVA v/v;	89
Figura 10 Películas de sericina sin glicerol y congeladas cubiertas a. sericina 1:1 PVA v/v; b. sericina 2:1 PVA v/v; c. sericina 3:1 PVA v/v.....	89
Figura 11 Películas de sericina con glicerol y congeladas cubiertas a. sericina 1:1 PVA v/v; b. sericina 2:1 PVA v/v; c. sericina 3:1 PVA v/v.....	90
Figura 12 Micrografías SEM de las películas de a. fibroína 1:1 PVA v/v con glicerol sin ciclo de congelamiento b. fibroína 1.1 PVA v/v sin glicerol y sin ciclo de congelamiento c. fibroína 1.1 PVA v/v con glicerol y ciclo de congelamiento d. EDS puntos blancos en la película	91
Figura 13 imágenes SEM de las películas de a. fibroína 2:1 PVA v/v con glicerol y sin ciclo de congelamiento; b. fibroína 2.1 PVA v/v sin glicerol y sin ciclo de congelamiento; c. fibroína 2:1 PVA v/v con glicerol y sin cubrir en ciclo de congelamiento; d. fibroína 2:1 PVA con glicerol y cubierta en ciclo de congelamiento	92
Figura 14 imágenes SEM de las películas de a. fibroína 3:1 PVA v/v con glicerol;	93
Figura 15 imágenes SEM de las películas de a. sericina 1:1 PVA v/v con glicerol;	94
Figura 16 imágenes SEM de las películas de a. sericina 2:1 PVA v/v con glicerol;	95
Figura 17 imágenes SEM de las películas de a. sericina 3:1 PVA v/v con glicerol;	96
Figura 18 Valores de ángulo de contacto para las diferentes formulaciones de películas	98
Figura 19 Ángulo de contacto película de fibroína a. Contacto inmediato b. Contacto 16 minutos después	99
Figura 20 Ángulo de contacto película de sericina a. contacto inmediato b. contacto 30 segundos después	99
Figura 21 Degradación de películas de fibroína con ciclo de congelamiento con glicerol y sin ciclo de congelamiento con glicerol.....	100
Figura 22 Degradación de películas de sericina sin glicerol con ciclo de congelamiento y sin ciclo de congelamiento	101
Figura 23 Degradación películas de sericina con glicerol con ciclo de congelamiento y sin ciclo de congelamiento.....	102
Figura 24 Esfuerzo máximo de las diferentes películas.....	104
Figura 25 Porcentajes de deformación de las diferentes películas.....	106

CAPÍTULO VI

Figura 1 Metodología para la elaboración de los apósitos multicapa	111
Figura 2 Esquema de trabajo perteneciente a los diferentes tratamientos evaluados en línea celular NiH3T3	113
Figura 3 Soluciones de a. fibroína con AgNPs al 1% v/v; b. fibroína con AgNPs 2% v/v.....	114
Figura 4 FTIR de las películas con adición de AgNPs	114

Figura 5 apósitos compuestos de a. fibroína + AgNPs 1%; b. fibroína + AgNPs 2%	115
Figura 6 Apósito compuesto de a. fibroína/ sericina + AgNPs 1%; b. fibroína/sericina + AgNPs 2%.....	115
Figura 7 Apósito de a. fibroína + PVA + AgNPs 1% v/v ; b. fibroína + PVA + AgNPs 2% v/v	116
Figura 8 Apósito multicapa de fibroína / sericina + AgNPs 1% a 1000 X.....	117
Figura 9 Apósito multicapa de fibroína / sericina + AgNPs 1% a 4000 X.....	117
Figura 10 Apósito multicapa de fibroína / sericina + AgNPs 2% a 500X.....	118
Figura 11 Apósito multicapa de fibroína / sericina + AgNPs 2% a 500 X.....	118
Figura 12 Ángulo de contacto de los apósitos.....	120
Figura 13 Deformación máxima de los apósitos obtenidos	121
Figura 14 Esfuerzo máximo de los apósitos obtenidos	122
Figura 15 Porcentaje de hinchamiento para los apósitos obtenidos	123
Figura 16 Colonias de A. E. Coli B. S. Aureus en agar sangre.....	123
Figura 17 Prueba antimicrobiana con E. coli para materiales individuales.....	124
Figura 18 Prueba antimicrobiana con S. aureus para materiales individuales	125
Figura 19 Halos de inhibición ante S. aureus de los apósitos obtenidos	125
Figura 20 Apósito compuesto de fibroína/sericina + AgNPs 2% 4 días después del ensayo antibacteriano	126
Figura 21 Halos de inhibición ante E. coli de los apósitos obtenidos.....	127
Figura 22 Aumento de halos de inhibición ante E. coli de los apósitos obtenidos.	127
Figura 23 Placa de cultivo perteneciente a las diferentes películas poliméricas adicionadas con resazurina (2 horas de incubación).	128
Figura 24 Placa de cultivo perteneciente a las películas control y células sin tratamiento adicionadas con resazurina (2 horas de incubación)	129
Figura 25 Evaluación de la citotoxicidad de los apósitos obtenidos en células NiH3T3 por un tiempo de 24 horas mediante resazurina.	130

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO II

Tabla 1 Propiedades mecánicas de los biopolímeros [26], [27].....	25
---	----

CAPÍTULO III

Tabla 1 parámetros correspondientes a cada muestra.....	47
Tabla 2 Valores de AgNPs obtenidos.....	55
Tabla 3 Datos experimentales de las síntesis.....	58
Tabla 4 Prueba Levene de los datos.....	61
Tabla 5 Prueba Durbin Watson del modelo ajustado	62
Tabla 6 ANOVA del modelo del diseño factorial	63
Tabla 7 ANOVA del modelo ajustado del diseño factorial	63
Tabla 8 Valores de optimización para la síntesis de AgNPs.....	65

CAPÍTULO IV

Tabla 1 obtenidos en cada extracción para la fibroína	72
Tabla 2 Porcentajes obtenidos en cada extracción para la sericina.....	72

CAPÍTULO V

Tabla 1 Composición y nomenclatura de las películas fabricadas	84
---	----

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Resumen

En este proyecto se realizaron apósitos de fibroína/sericina suplementados con nanopartículas de plata AgNPs, para esto se procedió a realizar la extracción de los polímeros a partir del capullo de gusano de seda *Bombyx mori*, los cuales se llevaron a una concentración específica, estandarizando así el método de extracción. Para la síntesis de AgNPs se procedió a realizar un diseño factorial y ver como la variación de los reactivos de la síntesis modificaba el tamaño final de las AgNPs, los cuales estuvieron alrededor de los 20 y 110 nm. Para realizar los apósitos primero se tuvo que realizar diferentes ensayos para la obtención de películas de fibroína y sericina, estas se realizaron con la adición de PVA y glicerol, además se les realizó un ciclo de congelamiento con el fin de mejorar las propiedades mecánicas; con las formulaciones realizadas se escogió la mejor película tanto de fibroína como de sericina respecto al ensayo de tracción, mojabilidad, degradabilidad, morfología y ángulo de contacto, luego se fabricó el apósito variando la concentración de AgNPs al 1 y 2 % la cual fue adicionada a la solución de fibroína, se realizó el proceso seguido para la elaboración de la películas pero esta vez se hizo multicapa. A los apósitos obtenidos se les evaluó la resistencia mecánica, mojabilidad e hinchamiento, para observar si cumplían las condiciones necesarias para ser considerado como un candidato para la aplicación en apósitos, después se realizaron los ensayos antimicrobianos y de citotoxicidad, los cuales dieron como resultado que los apósitos obtenidos mejoraban la viabilidad celular, y que tenían una leve capacidad antimicrobiana, por lo cual el apósito obtenido tiene un potencial en su uso para la curación y protección de heridas.

1.1. Introducción

La piel al ser el órgano más extenso que tiene el ser humano está expuesto a diferentes tipos de lesiones, como por ejemplo quemaduras, las cuales son ocasionadas por diversas fuentes como el fuego, o por la exposición al sol sin una buena protección solar, siendo esta la causa más común. Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se afirma que aproximadamente al año mueren 180.000 personas debido a quemaduras. Por otro lado, también existen otras afectaciones de la piel conocidas como úlceras, éstas son lesiones que no cicatrizan de forma espontánea, por esto se hace necesario el uso de elementos como los apósitos que ayuden al mejoramiento de la cicatrización y a su vez a disminuir el tiempo de curación de las heridas; además, como este tipo de lesiones proveen un ambiente idóneo para el crecimiento de microorganismos, se considera de gran importancia tener un componente antimicrobiano en estos apósitos, para que las heridas no se infecten y con esto reducir al máximo una posible complicación a causa de estos microorganismos.

Dado que algunos polímeros naturales presentan excelentes propiedades antimicrobianas se ha considerado la fabricación de apósitos con este tipo de materiales, puesto que presentan una excelente biocompatibilidad, y al ser de origen natural se degradan con facilidad. Ejemplos de esta clase de polímeros son el quitosano, la fibroína, la sericina, y la celulosa. En el mercado existen apósitos de materiales naturales a base de alginatos y colágeno; también se encuentran apósitos fabricados de polímeros sintéticos, no obstante, estos generan productos de contaminación. Para optimizar las propiedades antimicrobianas de los polímeros naturales, se ha implementado la adición de materiales particulados en tamaño nanométrico, puesto que esto ayuda a una mejor respuesta celular, como por ejemplo las nanopartículas de plata que poseen una alta capacidad antimicrobiana, con lo cual se potencializan todas las propiedades que poseen individualmente. En este proyecto será evaluado un apósito fabricado por capas de dos polímeros naturales: sericina y fibroína, con la adición de nanopartículas de plata, siendo evaluadas sus propiedades como potencial uso en el tratamiento de quemaduras.

1.2. Planteamiento del problema

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), las quemaduras constituyen un problema de salud pública a nivel mundial [1], [2]; por ello se deben tratar este tipo de lesiones de manera especial. Dado que las quemaduras en la piel presentan un ambiente en el cual se da la proliferación bacteriana, se hace necesario el uso de materiales con capacidad antimicrobiana, con el fin de reducir la tasa de mortalidad asociada a las infecciones ocasionadas en las heridas. En Colombia un estudio realizado entre los años 2000 y 2009, dio a conocer que 5448 personas murieron debido a quemaduras [3]. Las quemaduras por contacto directo con el fuego no son el único tipo de lesión que afecta el tejido de la piel, también existen padecimientos cutáneos como por ejemplo las úlceras, ya sean por presión o fricción, esto puede ser ocasionado, por ejemplo, con el uso de prótesis en personas con pérdida de extremidades, también son frecuentes en personas con diabetes *mellitus*, enfermedad que al igual que las quemaduras es considerada como un problema de la salud mundial. Este tipo de lesiones conlleva a un incremento en los costos del cuidado de un paciente, que en la actualidad tienen una connotación legal importante para el equipo médico, pues representan una complicación del cuidado de la salud que no debe ser atribuible exclusivamente al cuidado de enfermería [4], [5].

Las úlceras por presión aparecen generalmente en pacientes que están más de tres días hospitalizados [6], en investigaciones realizadas en Colombia se ha concluido que entre un 3 y 10 % del total de los pacientes hospitalizados sufre de úlceras por presión y que el porcentaje de personas que sufren nuevamente este padecimiento se encuentra entre 7.7 % y 26.9 % [4].

La diabetes *mellitus* está asociada con padecimientos en la piel como el pie diabético, para el año 2010 a nivel mundial se registraban 285 millones de personas con esta enfermedad, visualizando que la tendencia en los próximos 10 años aumentará a 360 millones; en Colombia se estima que de la población adulta un 7.4% a un 9.4% es diabética. De las personas que padecen diabetes *mellitus* el 70% tienden a sufrir de pie diabético, lo cual está asociado con la amputación de miembros inferiores, debido a infecciones en las heridas [5], [7]. Para curar estas úlceras se requieren tratamiento de

un alto costo, además que al tenerlas expuestas a ambientes hospitalarios, donde si bien existe una asepsia, el control de microorganismos no es simple, por lo cual se es más propenso a sufrir complicaciones debido a la aparición de bacterias en las heridas, requiriéndose un tratamiento diferente para la recuperación del paciente [8], surgiendo así, la implementación de apósitos antimicrobianos fabricados a partir de materiales poliméricos en una herramienta idónea para promover la reparación del tejido de la piel [9].

En el mercado se encuentran una gran variedad de apósitos, estos son fabricados con materiales poliméricos sintéticos, como por ejemplo espumas de poliuretano y láminas de silicona; también existen apósitos fabricados con polímeros naturales tales como fibras de alginato y carboximetilcelulosa sódica [10]. Si bien los polímeros sintéticos son usados en este tipo de aplicaciones, se ha evidenciado que algunos de ellos producen problemas de toxicidad, es el caso de los elaborados con poliuretanos que generan liberación de di-isocianato [11], causando una reacción adversa en el paciente, lo que conlleva a tratamientos clínicos adicionales y a más gastos económicos [12]. Además este tipo de apósitos tiene una gran deficiencia en propiedades bioactivas intrínsecas, las cuales son muy bajas [13]. Los apósitos compuestos de polímeros sintéticos tiene también como desventaja que luego de ser retirados se convierten en productos que contaminan el medio ambiente por su difícil degradación [14], es por esto que aparecen los polímeros naturales en esta aplicación específica, los cuales no presentan en su degradación productos secundarios que afecten la compatibilidad con el paciente y a su vez contribuyan de manera positiva al medio ambiente [15].

Los polímeros naturales que como su nombre lo indican provienen de recursos renovables, son utilizados considerablemente en la ingeniería de tejidos en aplicaciones de medicina regenerativa, debido a sus propiedades como por ejemplo la bioactividad y la biodegradabilidad, cabe resaltar que el cuerpo humano posee en sus tejidos matrices de tipo polimérico. Entre los polímeros naturales más utilizados para tratar heridas se encuentran la celulosa, el ácido hialurónico, la quitina, el quitosano, el alginato, fibroína, entre otros [16], [17]. Algunas propiedades que se resaltan de los polímeros es que son antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos lo cual los convierte en sustitutos

adecuados de la matriz extracelular (ECM) y el ambiente celular original de la piel [12]. Cuando se tienen heridas se busca dos factores fundamentales: tener un tiempo de cicatrización corto y una cicatrización mínima, es por esto que se debe inhibir al máximo la aparición de microorganismos en las heridas, puesto que esto hace que se prolongue el tiempo de cicatrización, es así como se hace necesario desarrollar biomateriales que cumplan con una doble función, es decir, que promuevan la actividad estimulante del crecimiento celular combinada con la actividad antimicrobiana [18]. Un polímero usado en la fabricación de apósitos es la fibroína, esto debido a que posee propiedades antimicrobianas, además, tiene la cualidad de ayudar en la síntesis de colágeno, lo cual ayuda a una cicatrización más rápida [19], [20], otro polímero que se ha venido usando en ingeniería de tejidos es la sericina, la cual ha evidenciado que posee resistencia a la oxidación, actividad antimicrobiana, protección a la radiación solar ultravioleta (UV), fácil absorción y liberación de humedad, inhibición de la actividad de la tirosina y de la cinasa, actividad celular, propiedades anticoagulantes y anticancerígenas, además, promueve el crecimiento celular y la cicatrización de heridas, y es biodegradable [21].

A pesar de las ventajas que posee la fibroína, presenta deficiencias pues posee baja hidrofiliidad, poca capacidad de hinchamiento y baja resistencia mecánica, propiedades que pueden ser mejoradas con la adición de otros elementos como otros polímeros, lo cual también mejora el tiempo de degradación que por lo general es bajo en apósitos que solo poseen fibroína [22].

En el mercado se encuentran materiales con propiedades antimicrobianas que se han venido incorporando en la fabricación de apósitos como por ejemplo, la plata, el yodo, la clorhexidina, la miel, entre otros [23]. Si bien la plata presenta un alto componente antimicrobiano, se conoce que en ciertas proporciones es citotóxica, sin embargo, el desarrollo de la nanotecnología ha facilitado la producción de partículas de plata nanoestructurada, con alta superficie de contacto lo que genera una proporción de área y volumen más alta, aumentando el poder antibacteriano, y se pueden manejar porcentajes bajos dentro de los apósitos reduciendo así la toxicidad de este material [16], este tipo de material reducido a esta escala ha evidenciado que es un candidato para curar afecciones antes tratadas con antibióticos, debido a su alta capacidad

antimicrobiana, y a su capacidad de atacar a diferentes agentes patógenos. Se ha observado que las nanopartículas de plata (AgNPs) provocan daños estructurales en la pared celular de las bacterias, lo que provoca la muerte de estas [24]. Para cada aplicación, las AgNPs requieren unas características específicas que definen sus propiedades físicas y químicas, tales como el tamaño y distribución, forma y carga superficial, entre otras. La forma de obtención de las AgNPs determina su tamaño y su forma. Cabe resaltar que diferentes estudios han demostrado que no se debe aumentar las concentraciones de AgNPs [25], se estima que concentraciones por encima de 250 ppm de AgNPs ocasiona citotoxicidad, lo cual termina afectando a las células que están regenerando el tejido [26].

Dadas las propiedades expuestas anteriormente de las AgNPs y la necesidad de crear apósitos para heridas con capacidad antibacteriana, sin que estos sean antibióticos, además, que la liberación de estas AgNPs sea controlada con el fin de prevenir la aparición de bacterias dentro de las heridas, y con la funcionalización de este tipo de partículas con polímeros naturales el concepto moderno de apósito interactivo contemplaría los cambios en el entorno de la herida, para una mejor cicatrización debido a que la respuesta celular local se revalorizaría mejorando la retención de la humedad, inhibiendo el crecimiento bacteriano en la herida, disminuyendo los exudados y estimulando el proceso de epitelización [9], [16]. Diversos polímeros naturales impregnados con AgNPs han sido evaluados como apósitos entre los que se destaca celulosa [27], [28], la fibroína de seda [18], quitosano [29], [30], carragenina [31], carboximetilcelulosa [32] y alginato [33].

En el mercado se encuentran algunos apósitos multicapas (Figura 1) con el fin de que cada una de las capas aporte una propiedad específica, aquella en contacto con la piel es una capa adherente, la segunda capa es la que presenta el componente antimicrobiano. En este orden de ideas, la sericina aportaría el componente adhesivo, dado que está demostrado que esta proteína es la que une los hilos de seda, y el componente antimicrobiano está presente tanto en la sericina, fibroína y en mayor cantidad en las AgNPs. Las nanopartículas AgNPs necesitan de una matriz donde puedan

ser embebidas, para que se dé su liberación moderada en la lesión, para lo cual se usara la fibroína, que a su vez potenciará el efecto antimicrobiano antes mencionado.

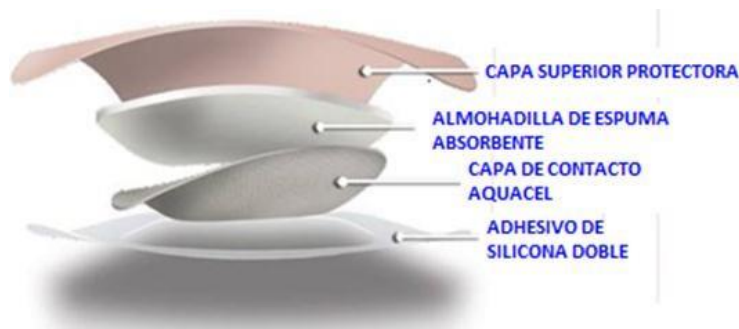


Figura 1 Apósito comercial fabricado en capas. Modificado de [34].

Este estudio pretende fabricar apósitos para lesiones en la piel a partir de fibroína y sericina, los cuales son polímeros naturales extraídos del gusano de seda *Bombyx mori*, suplementados con nanopartículas de plata, sintetizadas químicamente; surgiendo la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo afectan la adición de sericina y nanopartículas de plata AgNPs sintetizadas químicamente las características físicas, químicas y biológicas de apósitos fabricados a base de fibroína?

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Desarrollar apósitos empleando fibroína y sericina de seda suplementados con nanopartículas de plata sintetizadas químicamente.

1.3.2. Específicos

- Implementar un protocolo estandarizado para la obtención de fibroína y sericina a partir del capullo de gusano de seda *Bombyx mori*.
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata por medio de procesos químicos.
- Preparar apósitos variando porcentajes de fibroína, sericina y nanopartículas de plata, para determinar la composición con propiedades antimicrobianas y citotóxicas adecuadas para su aplicación como biomaterial.
- Caracterizar la morfología, las propiedades mecánicas y la mojabilidad de los apósitos obtenidos.

Bibliografía

- [1] OMS, "Quemaduras," 2018. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns>. [Accessed: 04-Apr-2018].
- [2] S. Archilla and J. Benitez, "Costos Médicos Directos del tratamiento de Pacientes Adultos con Quemaduras de Segundo y Tercer Grado en Colombia," Universidad de Ciencias aplicadas y Ambientales, 2017.
- [3] N. Navarrete and N. Rodriguez, "Epidemiologic characteristics of death by burn injury from 2000 to 2009 in Colombia, South America: a population-based study," *Burn. Trauma*, 2016.
- [4] M. de S. y P. Social, "PREVENCIÓN ÚLCERAS POR PRESIÓN," 2015. [Online]. Available: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/prevenir-ulceras-por-presion.pdf>.
- [5] A. E. Pinilla, M. del P. Barrera, A. L. Sánchez, and A. Mejía, "Factores de riesgo en diabetes mellitus y pie diabético: un enfoque hacia la prevención primaria," *Rev. Colomb. Cardiol.*, 2014.
- [6] A. Tzuc-Guardia, E. Vega-Morales, and L. Collí-Novelo, "Nivel de riesgo y aparición de úlceras por presión en pacientes en estado crítico," *Enfermería Univ.*, 2015.
- [7] M. R. Amarís, J. B. Rojas, A. G. Batista, C. G. Chaparro, J. P. García, and L. V. Rodríguez, "Factores asociados al pie diabético en pacientes ambulatorios. centro de diabetes cardiovascular del caribe. Barranquilla (Colombia)," *Salud Uninorte*, 2012.
- [8] M. M. Soltan Dallal *et al.*, "A comparison between occlusive and exposure dressing in the management of burn wound," *Burns*, 2016.
- [9] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing," *Int. J. Pharm.*, 2014.
- [10] K. Vowden and P. Vowden, "Wound dressings: principles and practice," *Surgery (United Kingdom)*. 2017.
- [11] M. Farokhi, F. Mottaghitlab, Y. Fatahi, A. Khademhosseini, and D. L. Kaplan, "Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings," *Trends in Biotechnology*. 2018.
- [12] G. Sandri *et al.*, "Clay minerals for tissue regeneration, repair, and engineering," in *Wound Healing Biomaterials*, 2016.
- [13] M. P. Sikka and V. K. Midha, "The role of biopolymers and biodegradable polymeric dressings in managing chronic wounds," in *Advanced Textiles for Wound Care*, 2018.
- [14] M. Naseri-Nosar and Z. M. Ziora, "Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites," *Carbohydrate Polymers*. 2018.
- [15] M. F. Maitz, "Applications of synthetic polymers in clinical medicine," *Biosurface and Biotribology*, 2015.
- [16] J. Boateng and O. Catanzano, "Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review," *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015.
- [17] H. P. Felgueiras and M. T. P. Amorim, "Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017.
- [18] S. Patil, T. George, and K. Mahadik, "Green synthesized nanosilver loaded silk fibroin gel for enhanced wound healing," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2015.
- [19] H. W. Ju *et al.*, "Wound healing effect of electrospun silk fibroin nanomatrix in burn-

model," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016.

[20] Y. Zhou, H. Yang, X. Liu, J. Mao, S. Gu, and W. Xu, "Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013.

[21] J. A. Barajas-Gamboa, A. M. Serpa-Guerra, A. Restrepo-Osorio, and C. Álvarez-López, "Sericin applications: a globular silk protein," *Ing. y Compet.*, 2016.

[22] S. S. Shera, N. Kulhar, and R. M. Banik, *Chapter 11. Silk and silk fibroin-based biopolymeric composites and their biomedical applications*, no. 2011. Elsevier Inc., 2019.

[23] S. Asghari, S. Logsetty, and S. Liu, "Imparting commercial antimicrobial dressings with low-adherence to burn wounds," *Burns*, 2016.

[24] A. Abdel-Megeed and M. R. El-Aassar, "k-Carrageenan/poly vinyl pyrrolidone/polyethylene glycol/silver nanoparticles film for biomedical application," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 74, pp. 179–184, 2015.

[25] M. Pérez-Díaz *et al.*, "Anti-biofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts," *Mater. Sci. Eng. C*, 2016.

[26] J. L. Velázquez-Velázquez *et al.*, "Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles," *Mater. Sci. Eng. C*, 2015.

[27] J. Wu, S. Guo, and X. Wen, "In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing," *Carbohydr Polym.*, vol. 102, pp. 762–771, 2014.

[28] R. Singla *et al.*, "In situ functionalized nanobiocomposites dressings of bamboo cellulose nanocrystals and silver nanoparticles for accelerated wound healing," *Carbohydr. Polym.*, 2017.

[29] Z. Lu and R. Chen, "Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing," *Carbohydr Polym.*, vol. 156, pp. 460–469, 2017.

[30] L. Ding *et al.*, "Spongy bilayer dressing composed of chitosan–Ag nanoparticles and chitosan–Bletilla striata polysaccharide for wound healing applications," *Carbohydr. Polym.*, 2017.

[31] S. Azizi, R. Mohamad, R. Abdul Rahim, R. Mohammadinejad, and A. Bin Ariff, "Hydrogel beads bio-nanocomposite based on Kappa-Carrageenan and green synthesized silver nanoparticles for biomedical applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017.

[32] A. Das, A. Kumar, N. B. Patil, C. Viswanathan, and D. Ghosh, "Preparation and characterization of silver nanoparticle loaded amorphous hydrogel of carboxymethylcellulose for infected wounds," *Carbohydr. Polym.*, 2015.

[33] T. C. Mokhena and A. S. Luyt, "Electrospun alginate nanofibres impregnated with silver nanoparticles: Preparation, morphology and antibacterial properties," *Carbohydr. Polym.*, 2017.

[34] ConvaTec, "Apósitos AQUACEL." [Online]. Available: <https://www.convatec.mx/herida-y-piel/apositos-aquacel/aquacel-foam/>. [Accessed: 11-Oct-2018].

CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Marco teórico

2.1.1. Biomateriales

Los biomateriales son materiales que pueden ser de origen natural o sintético, son usados para el reemplazo parcial o total de órganos de seres vivos, con el fin de que cumpla las funciones de dicho órgano, dentro de los biomateriales se encuentran los dispositivos médicos que están en contacto con el paciente, y los diferentes fluidos corporales, una característica fundamental es que todo biomaterial debe cumplir una interacción óptima con el paciente [1], [2].

Los biomateriales se han usado desde épocas antiguas, se conoce que en la época de la prehistoria aproximadamente a los 3000 a.C, los egipcios usaban hilos de lino para realizar suturas, en el continente americano se encontró que la civilización maya alrededor del año 600 a.C realizaba reemplazos dentales con conchas marinas; el problema según los estudios es que, al no tener una adecuada asepsia, los procedimientos no eran exitosos. El estudio de los biomateriales para implantes, inició sus desarrollos debido a la I y II guerra mundial, donde el uso de metales fue de gran importancia [3], [4].

Según la naturaleza de los biomateriales pueden tener diferentes propiedades y se clasifican en varios tipos presentados a continuación.

2.1.2. Metales

Están conformados por enlaces metálicos, poseen muy buenas propiedades mecánicas, por lo cual son usados en tejidos que soportan grandes cargas, puesto que su estructura y sus propiedades físicas los hacen idóneos para ello. En los biomateriales metálicos están tanto los metales como sus aleaciones, se pueden encontrar el titanio, los aceros inoxidables como el 316L, con los cuales se fabrican placas fijadoras, tornillos, entre otros [5].

Los metales además de proveer soporte, pueden ser tratados superficialmente, mejorando su porosidad superficial; modificando así su biocompatibilidad y osteoconducción [6].

2.1.3. Cerámicos

Este tipo de materiales están formados por enlaces iónicos y/o covalentes, tienen gran interés en la ingeniería de tejidos, debido a que muchos de ellos presentan bioactividad, que les provee la posibilidad de unirse químicamente al tejido natural, además por su semejanza con la fase mineral que presenta el tejido óseo, entre ellos se puede encontrar la hidroxiapatita la cual posee propiedades similares tanto físicas como químicas a la del hueso [7].

También están la alúmina y la zirconia, las cuales no son bioactivas, con estas se hacen partes que puedan requerir de resistencia al desgaste y baja fricción[8] [35]. Los biocerámicos se pueden comportar de diferentes formas dentro del cuerpo humano y por esto se clasifican en bioinertes, bioactivos y bioabsorbibles [9].

2.1.4. Polímeros

Estos son formados por la unión repetida de una o varias moléculas de monómeros unidas por enlaces covalentes, este tipo de biomaterial se puede conseguir de forma natural o sintética, los primeros se obtienen por procesos metabólicos de seres vivos o de la misma naturaleza, y los segundos por síntesis química, los polímeros sintéticos tienen una leve ventaja sobre los naturales puesto que se pueden obtener en función de una aplicación específica, por su parte los polímeros naturales poseen biocompatibilidad.

Entre los polímeros naturales se pueden encontrar, los lípidos y proteínas, como por ejemplo el colágeno y la fibroína, además de los polisacáridos como el quitosano, los almidones y las pectinas. También los poliésteres de origen microbiano conocidos como los polihidroxialcanoatos PHA por sus siglas en inglés, que se encuentran en microorganismos. Los poliésteres del ácido láctico conocidos como PLA que son obtenidos por síntesis química [9].

Este tipo de polímeros se pueden encontrar en diferentes aplicaciones como por ejemplo, envases de alimentos, liberación controlada de fármacos, medicina regenerativa, y vendajes para heridas, esto gracias a sus diferentes propiedades, y por su tiempo de degradación se convierten en una alternativa para disminuir los impactos ambientales ocasionados por los polímeros de origen de materias fósiles [10].

Entre los polímeros naturales más usados en la ingeniería de tejidos se encuentra el quitosano, de este biomaterial se fabrican membranas, microesferas para la encapsulación de fármacos, debido especialmente a sus propiedades antibacterianas [11], además, su estructura molecular permite realizar modificaciones tanto mecánicas como químicas [12]. Otro polímero que ha ido ganando importancia es la fibroína, la cual se extrae de la seda por procesos químicos, es usada en suturas médicas, debido a su elasticidad [13], ha sido objeto de estudio durante los últimos años, por ejemplo para la fabricación de scaffolds [14].

2.1.5. Seda como biomaterial

Durante las últimas décadas la fibra de seda se ha utilizado en suturas quirúrgicas, debido a que causa pocas reacciones adversas en ensayos *in vivo*. Recientemente, dentro de la industria de los biomateriales han surgido la necesidad de implementar compuestos orgánicos derivados de seda debido a que se consideran fuertes candidatos como material anticoagulante, como material para la fabricación de scaffolds para la regeneración de tejidos y para la fabricación de sustratos de cultivo celular y de suministro de fármacos, regeneración de piel, y de musculo [15]–[21]. En la Figura 1 se observa la composición de una fibra de seda, la capa exterior es la sericina y la interna fibroína.

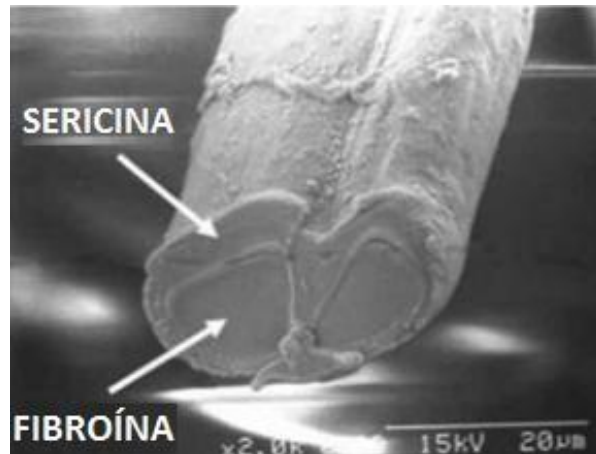


Figura 1 Micrografía SEM de un hilo de seda. Modificado de [22].

2.1.6. Fibroína y propiedades

La fibroína es una proteína fibrosa y lineal esta representa del 70 al 80% de la seda, está conformada en diferentes estructuras, cuando se encuentra en la glándula del gusano es soluble en agua, y cuando se vuelve hilo para formar el capullo de este, se conforma en dos estructuras helicoidal y láminas β , volviéndose insoluble en agua, esta proteína se constituye por tres aminoácidos principales glicina (43.8 %), alanina (26.4 %) y serina (11.9-13.2 %) que se repiten formando un estructura que puede denominarse simple, además tiene residuos de aminoácidos como tirosina y valina [23], [24], esta proteína presenta baja reacción inflamatoria *in vivo* [25].

La fibroína posee mejores propiedades mecánicas comparación con otros polímeros, esto se debe a su estructura y ordenamiento molecular, estas propiedades cambian cuando se encuentran encapsuladas por la sericina, lo cual es de suma importancia a la hora de utilizarlas en aplicaciones relacionadas con soporte de cargas [26]. Según la fuente y si está encapsulada en sericina sus propiedades mecánicas varían, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1 Propiedades mecánicas de los biopolímeros [26], [27].

Fuente	Módulo de Young (GPa)	Tensión de ruptura (MPa)	Elongación máxima (%)
SF del gusano <i>Bombyx mori</i> (Con sericina)	5-12	500	19
SF del gusano <i>Bombyx mori</i> (Sin sericina)	15-17	610-690	4-16
Seda de araña <i>Araneus</i>	10	1100	----

Como se puede observar en la tabla 1, la fibroína posee muy buenas propiedades mecánicas, además de esto es biocompatible, ésta se ha usado en la industria cosmética, para la ayuda de regeneración de colágeno, y también ayuda a reducir la respuesta inflamatoria en la piel. Además, en aplicaciones óseas se ha demostrado que ayuda al crecimiento, adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos y fibroblastos [28].

Otra cualidad importante de la fibroína es su degradación, se ha demostrado que la tasa de degradabilidad de la fibroína es menor a la del colágeno [29], estudios han registrado que la fibroína conserva sus propiedades mecánicas hasta en un 50% después de haber sido implantada, esta degradabilidad está vinculada con la estructura, morfología y características del lugar donde ha sido implantada, esta se ve afectada por el pH y la temperatura [29].

Recientemente se ha usado la fibroína en la fabricación de apósitos para la piel, sin embargo, en la década de los noventa se fabricaron membranas insolubles para el usarse como biomaterial [30]. En esa misma década se hicieron estudios sobre las propiedades mecánicas de la fibroína proveniente de la seda de araña [31], en el siglo XXI, se ha incrementado el estudio de este material debido a su potencial en la ingeniería de tejidos, en el año 2005 [32].

2.1.7. Sericina y propiedades

La sericina es una proteína globular la cual es parcialmente soluble en agua tibia, esta constituye entre un 20 a 30% de la seda, debido a su naturaleza amorfa posee bajas propiedades mecánicas [33], es secretada por el gusano de seda en el proceso de formar el capullo, y su función principal es servir como un agente de cohesión de las estructuras fibrilares, entre sus principales ventajas se tiene su hidrofiliidad y esta característica hace que se clasifique en sericina A, B o C, las A y B se diluye fácilmente en agua a temperaturas cercanas a 60 °C, la tipo C necesitas temperaturas mayores a 83%, la sericina A se encuentra en la capa más alejada del interior de las fibras de seda, la B en la zona media y la C en la zona más interna[34]. La sericina es resistente a la oxidación, es antibacterial, biocompatible, además tiene la capacidad de inhibir la actividad de la tirosinasa, ha sido usada como biomaterial para la fabricación de apósitos[35], [36].

Esta proteína es obtenida por el proceso de desgomado de la seda y se convierte en un desecho de la industria textil el cual es poco usado [37], se estima que al año se pierden 50.000 toneladas de sericina a nivel mundial [33], se puede encontrar estructuralmente en láminas β [37], la sericina esta constituidas por 18 aminoácidos siendo los más importantes la serina (32%), ácido aspártico (18%), glicina (16%), además, se divide en 45.8% hidroxí-aminoácidos (serina y treonina), un 42.3% de aminoácidos polares y 12.2% de aminoácidos no polares ácidos [38].

Se usa en diferentes aplicaciones como en la elaboración en cosméticos para el cuidado del cabello, la piel, entre otros, se han fabricado membranas e hidrogeles para el cuidado de la piel [34].

2.1.8. Biomateriales y efecto antimicrobiano

Este tipo de biomateriales deben cumplir diferentes requerimientos, entre los cuales se encuentra un rendimiento adecuado ante agentes microbianos, ser biocompatible e interactuar de manera adecuada con el tejido y las células que lo componen, existen biomateriales que por sus propiedades hidrofóbicas al estar en contacto con el organismo permiten la unión de bacterias, lo cual puede ser contrarrestado modificando la superficie de los materiales, es decir, haciendo superficies anti infecciosas [39]. El

efecto antimicrobiano se puede llevar a cabo mediante diferentes procesos o técnicas, ya sean de carácter físico o químico, también se puede disminuir con el uso de nanomateriales que posean propiedades antimicrobianas, puesto que interactúan de manera óptima con los microorganismos.

Entre los materiales metálicos que presentan mayor capacidad antimicrobiana se encuentran plata, titanio, hierro y el cobre [40]. También existen materiales de naturaleza polimérica que poseen esta propiedad, entre los que se tiene el quitosano y la fibroína.

Las nanopartículas de plata han sido usadas en diferentes aplicaciones biomédicas, entre ellas se encuentran el dopaje a prótesis de titanio para evitar infecciones posteriores a la implantación [41], pero su gran potencial se encuentra en afecciones asociadas con la piel y el tratamiento de diferentes tipos de cáncer [42][43], su uso en apósitos es un tema que ha sido de gran interés, debido a sus buenas propiedades antimicrobianas [44], la combinación de polímeros naturales y AgNPs, puede mejorar la cicatrización de heridas, puesto que algunos de los primeros ayudan a la cicatrización de la piel, además que favorecen el crecimiento celular y también posee capacidad antimicrobiana, por su parte las AgNPs poseen una acción antimicrobiana de amplio espectro sobre los microbios que afectan a las heridas [45], [46]; en otras investigación se ha usado el CS con AgNPs para la fabricación de vendajes, dando como resultado un buen a la proliferación de fibroblastos, lo cual ayuda en la deposición de colágeno en el sitio de la herida[47]–[50], la carragenina el cual es un polímero que se obtiene de las algas rojas, también ha sido usado en el uso de apósitos suplementado con AgNPs, estas obtenidas mediante métodos verdes lo cual da un valor agregado a estos apósitos [51].

2.1.9. Piel y enfermedades

La piel es el tejido que sirve como barrera para proteger los diferentes órganos contra infecciones, además de proveer una defensa ante los cambios ambientales. Dicho tejido está expuesto a ser afectado por microorganismos, quemaduras, y en personas con enfermedades como la diabetes *mellitus*, la piel puede sufrir de úlceras lo cual las

expone aún más a tener complicaciones debido a la aparición de microorganismos en las heridas. En las quemaduras sucede un fenómeno aún más complicado de controlar y es la producción de exudados, debido a que esto genera un ambiente propicio para la aparición de agentes patógenos [52].

La piel posee diferentes capas, la más externa es la epidermis, siguiéndole la dermis, la hipodermis, la cual está en contacto con el músculo. Las quemaduras en la piel están catalogadas en cuatro grados dependiendo de la capa que afecta, siendo las quemaduras de grado 4 las más delicadas, puesto que alcanzan a tocar el hueso [53].

En la Figura 2, se muestran las diferentes capas de la piel y el grado de una quemadura según la cantidad de tejido afectado.

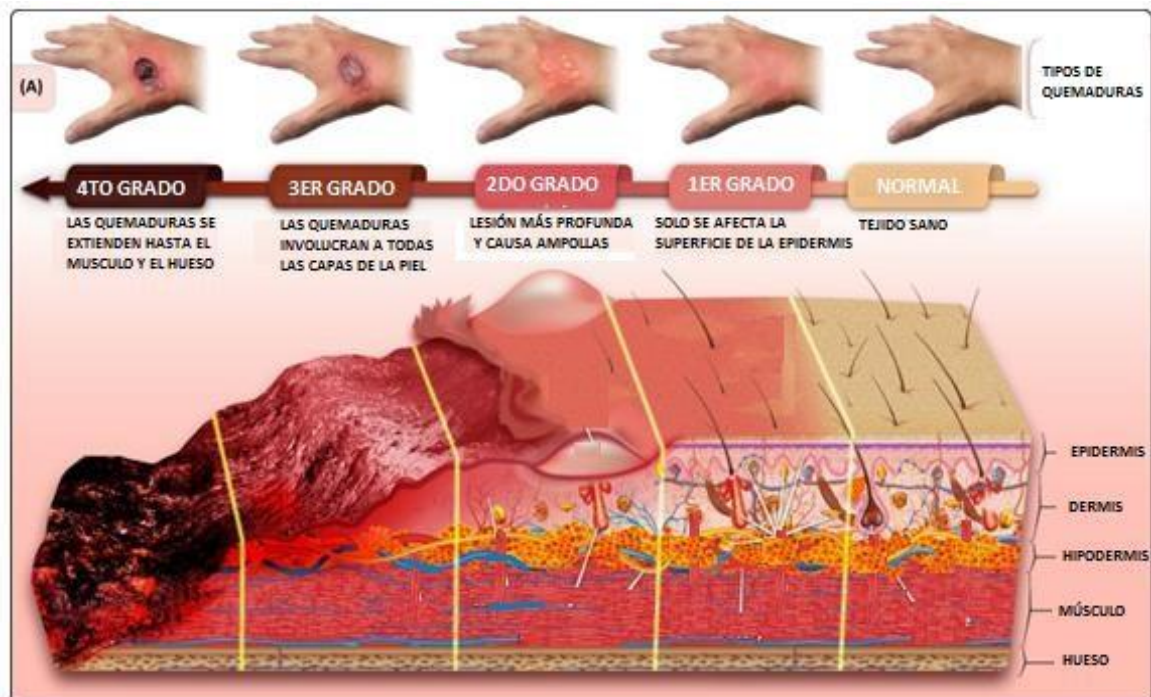


Figura 2 Capas y grados de quemadura en la piel. Modificado de [45].

También existen otras afectaciones en la piel como lo son las úlceras, las cuales se presentan en mayor proporción en las personas que sufren de pie diabético, este tipo de lesiones también es susceptible a ser infectada por diferentes microorganismos [54].

2.1.10. Apósitos

Los apósitos son productos usados en el campo médico, con el fin de proteger y cubrir heridas del tejido de la piel, además de proveer un alivio del dolor, ayudan a disminuir el tiempo de cicatrización y en algunos casos tienen un efecto antimicrobiano [55].

En la Figura 3 se puede ver como el uso de un apósito adecuado mejora la cicatrización de las heridas [56].



Figura 3 Apósito usado para la curación de una herida [56].

Los injertos de piel humana y piel de cerdo son los apósitos biológicos clínicamente más utilizados, tales materiales son de estructura de tipo colágeno que incluye elastina y lípidos, pero poseen algunas desventajas como suministros limitados, alta antigenicidad, mala adhesividad y riesgo de contaminación cruzada [57], [58].

Un apósito debe proveer absorción de los exudados de las heridas, proporcionar un equilibrio óptimo de humedad en la superficie de la herida, evitar la maceración de los tejidos circundantes y controlar la colonización bacteriana. Su objetivo principal es preservar los principios biológicos básicos de humedad, calor, oxigenación y circulación sanguínea [59].

Existen cuatro categorías de apósitos ampliamente usados en regeneración de tejido y para el cuidado de heridas: tradicionales, biológicos, artificiales y una mezcla de ambos

[57]. Los apósitos tradicionales están formados a partir de gasa y algodón, y mezcla de ambos; se caracterizan por su bajo costo, facilidad de uso y fabricación, estos poseen una gran capacidad absorbente de exudados de la herida que causa una deshidratación rápida, sin embargo, promueve el crecimiento bacteriano y la contaminación, lo cual no es una característica que se desee en este tipo de aplicación [58], los apósitos biológicos están, por lo general, elaborados a base de queratinocitos cultivados, los cuales se embeben en mallas de poliglactina o colágeno, estos ayudan a generar nueva piel y a una rápida cicatrización [60]; por otro lado, los apósitos artificiales están elaborados con polímeros sintéticos, presentan excelentes propiedades mecánicas [45], no obstante, se han reemplazado porque estos se vuelven un producto de desecho, con un impacto negativo sobre el medio ambiente. Los apósitos compuestos hacen referencia a aquellos que poseen una combinación de materiales, como por ejemplo los elaborados con polímeros y partículas metálicas, estos poseen la ventaja de tener un efecto sinérgico en la curación de las heridas, combinando las ventajas de los materiales que lo componen [61]. Los apósitos elaborados con polímeros naturales, poseen mayor capacidad de absorción de los exudados, se pueden retirar fácilmente, además que aceleran el proceso de cicatrización, una desventaja de este tipo de apósitos es su baja resistencia mecánica [57].

2.2. Estado del arte

A continuación, se mostrarán algunos estudios que se encuentran en la literatura referentes a los temas de interés para el proyecto.

2.2.1. Nanopartículas con capacidad microbicida

Recientemente, la fabricación de superficies funcionalizadas con nanomateriales, como los nanotubos de carbono de pared simple y nanopartículas metálicas, ha sido estudiada para mejorar las propiedades antibacterianas de las superficies de los biomateriales y para la implementación de nanorevestimientos [62].

La nanotecnología ha llevado al desarrollo de nanomateriales, entre ellos las nanopartículas inorgánicas, las cuales poseen un efecto microbicida, con capacidad de

atacar virus, bacterias y hongos [63], [64]. Entre las nanopartículas que han demostrado tener propiedades microbicidas o antimicrobianas se encuentran las nanopartículas de plata, óxido de zinc, cobre y óxidos de hierro. Estos últimos son microbicidas en tamaño nano estructurado, mientras que la plata, el cobre y los óxidos de zinc, poseen esta propiedad intrínsecamente [64]. Una ventaja del uso de estas nanopartículas es la desvinculación de los antibióticos que se usan en el momento, lo cual genera una alternativa para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos [55].

2.2.2. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs), presentan propiedades funcionales únicas, que conducen a aplicaciones variadas en las áreas de medicina, catálisis, sensores ópticos y bactericidas. Una de las características que hace más atractiva su aplicación, es la baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos, debido a que interactúan con la pared, proteínas y ADN bacteriano [55]. Debido a su naturaleza antimicrobiana las AgNPs se han incorporado en diversas matrices, con el fin de extender su utilidad en biomateriales para el uso de implantes y aplicaciones biomédicas [65]. Las sales de estas nanopartículas, ya son usadas en el mercado como por ejemplo en cremas tópicas, lo cual genera un mayor interés en busca de nuevas aplicaciones [55].

2.2.3. Quemaduras y úlceras cutáneas

Entre algunos defectos o heridas que se pueden presentar en el tejido de la piel se encuentran las úlceras y quemaduras. La úlcera cutánea es un defecto del tejido de la piel que se extiende a la dermis e hipodermis, que puede ser inducida por múltiples causas [66]. Varias de estas pueden estar relacionadas con el pie diabético, que es una complicación común entre los pacientes con diabetes *mellitus* [58], [67]; también por problemas vasculares relacionados con la arteriosclerosis obliterante y enfermedad arterial periférica (PAD) [15], y por presión, este tipo de úlcera son de rápida aparición y cursan con un proceso de larga curación debido al gran compromiso que se puede generar en las estructuras musculares y tendinosas de un área corporal, en su mayoría surgen de los cuidados médicos y de enfermería [68], [69].

2.2.4. Apósitos

Los apósitos artificiales se fabrican a partir de materiales sintéticos no biológicos y polímeros que no se encuentran en la piel, poseen una vida útil más extensa, inducen una mínima reacción inflamatoria y en su mayoría no generan riesgo de transmisión de patógenos. Diversos polímeros sintéticos como polivinil alcohol (PVA), óxido de polietileno (PEO), poliuretano, poli (N-vinilpirrolidona) (PVP), poli (N-isopropilacrilamida) (NIPAAm) y polietilenglicol (PEG) han sido utilizadas como potencial apósito para heridas y aplicaciones biomédicas. Su carácter hidrófilo genera importantes características funcionales de cicatrización de heridas tales como la capacidad de absorción de humedad y la transmisión de vapor de agua, que permiten el mantenimiento de un entorno de heridas húmedas [45], [70], [71]; en cuanto a los polímeros naturales, algunos homoglicanos entre los que se encuentra la quitina y el quitosano estructurados en nanofibras y celulosa en forma scaffolds; heteroglicanos como los alginatos y la carragenina en forma de hidrogeles, hidrocoloide y proteínas como el colágeno y la queratina en forma de esponjas; han sido ampliamente utilizados en el campo de la medicina regenerativa, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Se ha reportado el uso de estos tipos de polímeros naturales como vendajes para heridas gingivales y de quemaduras [45].

Otra de las aplicaciones donde se ha usado la fibroína es en la reconstrucción del tejido ocular [72], por sus propiedades mecánicas se han diseñado injertos vasculares [73]. Los compuestos de fibroína/PVA y sericina/PVA, se han usado para la fabricación de apósitos puesto que el PVA mejora las propiedades mecánicas de las películas finales, también se han embebidos diferentes materiales para inhibir el crecimiento bacteriano en las heridas, desde fármacos hasta nanopartículas metálicas[36], [57], [74], para mejorar las propiedades mecánicas del PVA se ha estudiado como afectan los ciclos de congelamiento a este polímero, evidenciando que se obtienen mejores propiedades mecánicas con más ciclos de congelamiento y descongelamiento [75].

2.2.5. Polímeros naturales usados en la fabricación de apósitos

La fibroína se ha utilizado como un biomaterial para la fabricación de apósitos bioactivos para heridas [76][66]. Por la acción de los aminoácidos que la componen, se considera

un material muy útil, que facilita la síntesis de colágeno y la reepitelización en el tratamiento de lesiones de la piel [76]. Estudios recientes, han mostrado que scaffolds y superficies inmovilizadas con fibronectina sobre matrices de nanofibras de fibroína de seda mejoran la adhesión de los fibroblastos humanos, la viabilidad y la migración tridimensional *in vitro* acelerando el proceso de curación de heridas [76], [77].

Entre los polisacáridos básicos se encuentra el quitosano, que debido a sus propiedades antibacterianas ha sido de gran uso en la fabricación de apósitos, este ha sido mezclado con colágeno y algunos antibióticos como lo es la ciprofloxacina y el sulfato de gentamicina, para prevenir la aparición de agentes microbianos en las heridas, se demostró que la adición de estos antibióticos a los apósitos de quitosano redujo el crecimiento bacteriano [78].

Entre los polisacáridos neutros se encuentra la celulosa, este polímero ha evidenciado que ayuda a reducir el tiempo de curación de las heridas y a disminuir el dolor, presenta alta biodegradabilidad, resistencia mecánica y propiedades antimicrobianas. Entre este tipo de polisacáridos también se encuentra el dextrano, el cual ayuda a la cicatrización de las heridas [79].

La sericina ha sido usada en la fabricación de apósitos debido a su buenas propiedades antimicrobianas, este polímero ha sido mezclado con otras sustancias para mejorar esta propiedad, ya sean antibióticos u otros polímeros naturales [80], [81].

2.2.6. Apósitos de polímeros con adición de plata

La plata es uno de los materiales antisépticos más potentes disponibles naturalmente y poseen baja toxicidad hacia el tejido de mamíferos [82], esta se puede encontrar en los apósitos: como plata elemental, por ejemplo, metal de plata, plata nano cristalina, como un compuesto inorgánico, por ejemplo, óxido de plata, fosfato de plata, cloruro de plata, sulfato de plata, fosfato de plata-calcio-sodio, compuesto de circonio y plata, SSD, como un complejo orgánico, por ejemplo, alantoinato de plata-zinc, alginato de plata, carboximetilcelulosa argéntica [83][69]. Se ha informado que al llegar a tamaño nanométrico (AgNPs), la plata exhibe propiedades físico-químicas notablemente

inusuales y actividades biológicas elevadas. Las cuales han demostrado gran importancia debido a su amplio espectro antimicrobiano contra varias cepas de bacterias, incluyendo *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* entre otras. Se han propuesto diversos mecanismos para la acción antibacteriana de las AgNPs. El primer mecanismo propuesto implica la desactivación de la proteína enzimática de la membrana celular bacteriana por unión a grupos tiol. Estas proteínas son conocidas por tomar parte en la producción de energía de la membrana y en el transporte de iones; otro mecanismo establece que el perfil de fosfotirosina de los péptidos bacterianos puede ser alterado por las AgNPs, que a su vez modulan la transducción de señales en bacterias que conduce a la paralización del crecimiento [70].

La combinación de polímeros naturales y AgNPs, puede mejorar la cicatrización de heridas, puesto que algunos de los primeros ayudan a la cicatrización de la piel, además que favorecen el crecimiento celular y también posee capacidad antimicrobiana, por su parte las AgNPs poseen una acción antimicrobiana de amplio espectro de AgNPs sobre los microbios que afectan a las heridas [45], [46]. Se conoce que la combinación de estos dos tipos de materiales se ha venido usando en la fabricación de apósitos como por ejemplo la carboximetilcelulosa (CMC), quitosano (CS), fibroína de seda (SF), carragenina, entre otros [52], [84]–[86]. Estudios de hidrogeles con CMC suplementada con AgNPs evidenciaron que estos ayudaban a una cicatrización más rápida de las heridas [48], [87], en otra investigación se usó el quitosano con AgNPs para la fabricación de vendajes, dando como resultado una buena proliferación de fibroblastos, lo cual ayuda en la deposición de colágeno en el sitio de la herida [47]–[50], la carragenina también ha sido usado en el uso de apósitos suplementado con AgNPs, estas obtenidas mediante métodos verdes lo cual da un valor agregado a estos apósitos [51], la fibroína y las AgNPs demostraron tener buena capacidad antibacteriana y ayudo a la proliferación celular [88], [89].

2.2.7. Apósitos compuestos de fibroína

Debido a las propiedades antes mencionadas de la fibroína, este polímero se ha venido empleando en la fabricación de apósitos, siendo usada como matriz para otras sustancias, como por ejemplo la neurotensina implementada en el tratamiento de

lesiones asociadas con la diabetes *mellitus*, dando como resultado una mejora en la rapidez de cicatrización del tejido [80]; por otro lado se ha buscado mejorar ciertas propiedades de la fibroína adicionándole dextrosa, lo cual aumentó el porcentaje de deformación longitudinal, haciéndola más resistente a la ruptura [53]. También ha sido empleada como soporte de partículas cerámicas de TiO_2 , donde se evidenció que estas partículas potencializaron la actividad antimicrobiana de la fibroína en los diferentes apósitos [90].

Otra propiedad de gran importancia en los apósitos es que permita liberar diferentes sustancias en la herida, ya sean antibióticos, o elementos que mejoren el tiempo de cicatrización, entre los cuales se encuentra el líquido amniótico el cual fue embebido en fibroína, se demostró que la adición de este mejoraba la producción de colágeno en la herida, favoreciendo la cicatrización del tejido [91]. La fibroína también ha sido mezclada con plantas naturales como el *Aloe vera*, mejorando la interacción célula-matriz, además, de aumentar la actividad antioxidante aportada por el *Aloe vera* [81], otro elemento natural que ha sido usado en la fabricación de apósitos a base de fibroína es la miel de abejas, la cual aporta propiedades antibacterianas potencializando las ya presentes en la fibroína, la miel ayuda a la liberación de citoquinas y a una respuesta inmune contra las infecciones [92]. Por otro lado, el uso de elementos metálicos no es muy común en la producción de apósitos, sin embargo se registra el uso de estroncio, lo cual mejora las propiedades físicas y la actividad biológica, el problema del uso de este elemento es que al aumentar las concentraciones afectaba la viabilidad celular [93].

2.2.8. Apósitos compuestos de sericina

Si bien el uso de sericina en la elaboración de apósitos no es tan extendido en comparación con la fibroína, se cuenta con algunos estudios que evidencian su implementación, debido a que es un material de desecho de la industria textil, se le da un valor agregado con su uso como biomaterial. Aplicando la técnica de electrospinning se obtuvieron apósitos compuestos de sericina y polivinil alcohol PVA, los cuales demostraron tener una buena capacidad antimicrobiana, a su vez que ayudaron a la proliferación celular en las heridas [35], este polímero también ha sido usado como vehículo indicador de humedad, teniendo la ventaja de que se logra observar en qué

momento la herida se queda sin exudado, el cual ayuda a la cicatrización [94], también la sericina se ha implementado como matriz para antibióticos como la tigeciclina, este apósito presentó una gran capacidad antibacteriana, mostrando como ventaja que la liberación del antibiótico se dio de manera controlada, lo cual hace de la sericina un material óptimo para la fabricación de apósitos [95]. Este polímero se ha combinado con otros polímeros naturales como lo es el quitosano, que tiene excelentes propiedades antibacterianas, potencializando esta propiedad en el apósito [96]. Para mejorar las propiedades mecánicas de la sericina se ha dopado con fibras de bambú, generando un apósito con excelente resistencia mecánica, y conservando las propiedades antibacterianas de la sericina [97]. En otro estudio, esta proteína se funcionalizó con el factor de crecimiento de fibroblastos ácido conocido como FGF1, la sericina permitió la liberación controlada de este factor, obteniendo como resultado una mejoría en la proliferación celular y cicatrización de las heridas [98].

2.2.9. Reporte de artículos

Según los datos obtenidos de la base de datos *Scopus*, se tiene que se han publicado 202 artículos relacionados con las palabras apósitos compuestos de fibroína, compuesto de sericina 67, y compuestos con nanopartículas en donde en Colombia no se ha publicado artículos relacionados con este tema, lo que hace que el estudio de este tema sea innovador dentro del país. Además, después de realizada la revisión se encuentra relevancia científica y pertinencia en la posible aplicación del biomaterial objeto de este trabajo de maestría.

Bibliografía

- [1] J. Gonzalez, "Evaluación de las propiedades de cuerpos porosos de hidroxiapatita, obtenidos por gel-casting y su infiltración en espumas poliméricas," Universidad de Antioquia, 2013.
- [2] J. Park and R. S. Lakes, *Biomaterials An Introduction*. 2007.
- [3] G. M. Raghavendra, T. Jayaramudu, K. Varaprasad, G. S. Mohan Reddy, and K. M. Raju, "Antibacterial nanocomposite hydrogels for superior biomedical applications: A Facile eco-friendly approach," *RSC Adv.*, 2015.
- [4] B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, and J. Lemons, *Biomaterials Science*. 2012.

- [5] P. J. Andersen, *Metals for Use in Medicine*. 2011.
- [6] A. M. Tataru, A. Ratcliffe, M. E. K. Wong, F. Kurtis Kasper, and A. G. Mikos, "Biomaterials in Regenerative Medicine: Considerations in Early Process Development," in *Translational Regenerative Medicine*, 2014.
- [7] M. W. Laschke, K. Witt, T. Pohlemann, and M. D. Menger, "Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: In vivo analysis of biocompatibility and vascularization," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2007.
- [8] C. E. Plazas Bonilla and J. E. Perilla, "Pasado, presente y futuro cercano de los materiales para uso en implantes óseos biodegradables implantes óseos biodegradables," *Ing. e Investig.*, 2011.
- [9] K. Ishikawa, S. Matsuya, Y. Miyamoto, and K. Kawate, *Bioceramics and their Clinical Applications*. 2003.
- [10] R. M. D. Soares, N. M. Siqueira, M. P. Prabhakaram, and S. Ramakrishna, "Electrospinning and electrospray of bio-based and natural polymers for biomaterials development," *Materials Science and Engineering C*. 2018.
- [11] N. Murthy, S. Wilson, and J. C. Sy, "Biodegradation of Polymers," in *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set*, 2012.
- [12] J. D. Giraldo, "PROPIDADES, OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DEL QUITOSANO," *Researchgate*, 2013.
- [13] B. Kundu, R. Rajkhowa, S. C. Kundu, and X. Wang, "Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013.
- [14] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, and S. Hofmann, "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering," *Acta Biomaterialia*. 2016.
- [15] S. Çalamak, C. Erdoğdu, M. Özalp, and K. Ulubayram, "Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 43, pp. 11–20, 2014.
- [16] D. Chouhan and B. B. Mandal, "Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside," *Acta Biomaterialia*. 2020.
- [17] D. Ma, Y. Wang, and W. Dai, "Silk fibroin-based biomaterials for musculoskeletal tissue engineering," *Materials Science and Engineering C*. 2018.
- [18] G. A. Miguel, "La Seda , Para Su Aprovechamiento Como Ingrediente Para El La

- Seda , Para Su Aprovechamiento Como Ingrediente Para El,” p. 57, 2014.
- [19] Q. Luo, Z. Chen, X. Hao, Q. Zhu, and Y. Zhou, “Preparation and properties of nanometer silk fibroin peptide/polyvinyl alcohol blend films for cell growth,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 61, pp. 135–141, 2013.
- [20] E. M. El-Fakharany, G. M. Abu-Elreesh, E. A. Kamoun, S. Zaki, and D. A. Abd-El-Haleem, “In vitro assessment of the bioactivities of sericin protein extracted from a bacterial silk-like biopolymer,” *RSC Adv.*, vol. 10, no. 9, pp. 5098–5107, 2020.
- [21] H. R. Bakhsheshi-Rad *et al.*, “Development of the PVA/CS nanofibers containing silk protein sericin as a wound dressing: In vitro and in vivo assessment,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 149, pp. 513–521, 2020.
- [22] “Estructura del hilo de seda.” [Online]. Available: <https://www.kn3.net/Zombbistian/30-A-C-D-D-4-0-0FD-JPG.html>. [Accessed: 11-Oct-2018].
- [23] S. C. Kundu, *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014.
- [24] B. Drucker and S. G. Smith, “Structure of silk fibroin,” *Nature*, 1950.
- [25] M. A. Osorio-Delgado *et al.*, “Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos,” *DYNA*, 2017.
- [26] S. Thomas, N. Ninan, S. Mohan, and E. Francis, *Natural polymers, biopolymers, biomaterials, and their composites, blends and IPNs*. 2012.
- [27] L. D. Koh *et al.*, “Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials,” *Progress in Polymer Science*. 2015.
- [28] J. Cenis Anadón, “La seda como biomaterial en Medicina Regenerativa,” *Eubacteria*, 2008.
- [29] G. H. Altman *et al.*, “Silk-based biomaterials,” *Biomaterials*, 2003.
- [30] N. Minoura, M. Tsukada, and M. Nagura, “Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial,” *Biomaterials*, 1990.
- [31] J. M. Gosline, P. A. Guerette, C. S. Ortlepp, and K. N. Savage, “The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function,” *J. Exp. Biol.*, 1999.
- [32] U. J. Kim, J. Park, H. Joo Kim, M. Wada, and D. L. Kaplan, “Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin,” *Biomaterials*, 2005.

- [33] G. Tao *et al.*, “Bioinspired design of AgNPs embedded silk sericin-based sponges for efficiently combating bacteria and promoting wound healing,” *Mater. Des.*, 2019.
- [34] C. Álvarez, C. Arredondo, A. E. Casas, M. M. Cardona, G. A. Hincapié, and A. Restrepo-osorio, “Caracterización de sericina obtenida a partir de aguas de desengomado de seda natural Characterization of sericin obtained from water degumming natural silk,” *Prospectiva*, 2013.
- [35] S. Gilotra, D. Chouhan, N. Bhardwaj, S. K. Nandi, and B. B. Mandal, “Potential of silk sericin based nanofibrous mats for wound dressing applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, 2018.
- [36] R. Cai *et al.*, “Preparation and characterization of silk sericin/PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 457–464, 2017.
- [37] D. C. Castrillón Martínez, C. L. Zuluaga, A. Restrepo-Osorio, and C. Álvarez-López, “Characterization of sericin obtained from cocoons and silk yarns,” in *Procedia Engineering*, 2017.
- [38] J. A. Barajas-Gamboa, A. M. Serpa-Guerra, A. Restrepo-Osorio, and C. Álvarez-López, “Sericin applications: a globular silk protein,” *Ing. y Compet.*, 2016.
- [39] D. Campoccia, L. Montanaro, and C. R. Arciola, “A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces,” *Biomaterials*. 2013.
- [40] I. D. Akhidime *et al.*, “The antimicrobial effect of metal substrates on food pathogens,” *Food Bioprod. Process.*, 2019.
- [41] L. Zhao *et al.*, “Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 24, pp. 5706–5716, 2011.
- [42] L. Farzin, S. Sadjadi, M. Shamsipur, S. Sheibani, and M. hasan Mousazadeh, “Employing AgNPs doped amidoxime-modified polyacrylonitrile (PAN-oxime) nanofibers for target induced strand displacement-based electrochemical aptasensing of CA125 in ovarian cancer patients,” *Mater. Sci. Eng. C*, 2019.
- [43] M. Dadashpour *et al.*, “Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria chamomilla* extract and their potential anticancer activity against human lung cancer cells,” *Mater. Sci. Eng. C*, 2018.
- [44] P. J. Babu, M. Doble, and A. M. Raichur, “Silver oxide nanoparticles embedded silk

- fibroin spuns: Microwave mediated preparation, characterization and their synergistic wound healing and anti-bacterial activity," *J. Colloid Interface Sci.*, 2018.
- [45] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing," *Int. J. Pharm.*, 2014.
- [46] A. Hebeish, M. H. El-Rafie, M. A. EL-Sheikh, A. A. Seleem, and M. E. El-Naggar, "Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014.
- [47] L. Ding *et al.*, "Spongy bilayer dressing composed of chitosan–Ag nanoparticles and chitosan–Bletilla striata polysaccharide for wound healing applications," *Carbohydr. Polym.*, 2017.
- [48] N. Levi-Polyachenko, R. Jacob, C. Day, and N. Kuthirummal, "Chitosan wound dressing with hexagonal silver nanoparticles for hyperthermia and enhanced delivery of small molecules," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2016.
- [49] E. Bozaci, E. Akar, E. Ozdogan, A. Demir, A. Altinisik, and Y. Seki, "Application of carboxymethylcellulose hydrogel based silver nanocomposites on cotton fabrics for antibacterial property," *Carbohydr. Polym.*, 2015.
- [50] M. S. Rubina *et al.*, "Collagen-chitosan scaffold modified with Au and Ag nanoparticles: Synthesis and structure," *Appl. Surf. Sci.*, 2016.
- [51] J. Osorio-Echavarría, N. A. Gómez-Vanegas, J. Osorio-Echavarría, and C. P. Ossa-Orozco, "Preparation of carrageenan biofilms mixed with silver nanoparticles by biological synthesis method | Obtención de biopelículas de carragenina suplementadas con nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente," *DYNA*, 2017.
- [52] Z. Lin *et al.*, "Biofunctions of antimicrobial peptide-conjugated alginate/hyaluronic acid/collagen wound dressings promote wound healing of a mixed-bacteria-infected wound," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.
- [53] M. Farokhi, F. Mottaghitalab, Y. Fatahi, A. Khademhosseini, and D. L. Kaplan, "Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings," *Trends in Biotechnology*. 2018.
- [54] L. Soldevila, E. Benavent, and O. Murillo, "Protocolo de tratamiento de las infecciones de úlceras del pie diabético," *Med.*, 2018.
- [55] R. C. Benedi J, "Apósitos," *Farm. Prof.*, 2006.

- [56] F. Castillo and J. F. Salvador Sanz, "Comparative study on the effectiveness of a dressing of nanocrystalline silver opposite to the use of silver sulfadiazine in burned patients treatment," *Cir. Plast. Ibero-Latinoamericana*, vol. 37, pp. 253–266, 2011.
- [57] E. A. Kamoun, E.-R. S. Kenawy, and X. Chen, "A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings," *J. Adv. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 217–233, May 2017.
- [58] J. H. Park, D. H. Suh, H. J. Kim, Y. I. Lee, I. H. Kwak, and G. W. Choi, "Role of procalcitonin in infected diabetic foot ulcer," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2017.
- [59] J. L. Velázquez-Velázquez *et al.*, "Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles," *Mater. Sci. Eng. C*, 2015.
- [60] L. Puig, "Fisiopatología de la cicatrización cutánea," *Actas Dermosifiliogr.*, vol. 88, no. 4, pp. 155–163, 1997.
- [61] Z. Lu and R. Chen, "Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing," *Carbohydr Polym.*, vol. 156, pp. 460–469, 2017.
- [62] X. Liu, P. K. Chu, and C. Ding, "Surface nano-functionalization of biomaterials," in *Materials Science and Engineering R: Reports*, 2010.
- [63] M. J. Hajipour *et al.*, "Antibacterial properties of nanoparticles," *Trends in Biotechnology*. 2012.
- [64] J. T. Seil and T. J. Webster, "Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature," *International Journal of Nanomedicine*. 2012.
- [65] M. R. Amarís, J. B. Rojas, A. G. Batista, C. G. Chaparro, J. P. García, and L. V. Rodríguez, "Factores asociados al pie diabético en pacientes ambulatorios. centro de diabetes cardiovascular del caribe. Barranquilla (Colombia)," *Salud Uninorte*, 2012.
- [66] H. Yang, W. S. Wang, Y. Tan, D. J. Zhang, J. J. Wu, and X. Lei, "Investigation and analysis of the characteristics and drug sensitivity of bacteria in skin ulcer infections," *Chinese J. Traumatol. - English Ed.*, 2017.
- [67] A. A. Escárcega-Galaz, J. L. D. La Cruz-Mercado, J. López-Cervantes, D. I. Sánchez-Machado, O. R. Brito-Zurita, and J. M. Ornelas-Aguirre, "Chitosan treatment for skin ulcers associated with diabetes," *Saudi J. Biol. Sci.*, 2018.

- [68] H. Twilley and S. Jones, "Heel ulcers - Pressure ulcers or symptoms of peripheral arterial disease? An exploratory matched case control study," *J. Tissue Viability*, 2016.
- [69] L. H. Griswold, R. L. Griffin, T. Swain, and J. D. Kerby, "Validity of the Braden Scale in grading pressure ulcers in trauma and burn patients," *J. Surg. Res.*, 2017.
- [70] J. Boateng and O. Catanzano, "Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review," *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015.
- [71] E. A. Kamoun, X. Chen, M. S. Mohy Eldin, and E. R. S. Kenawy, "Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers," *Arabian Journal of Chemistry*. 2015.
- [72] D. G. Harkin, K. A. George, P. W. Madden, I. R. Schwab, D. W. Hutmacher, and T. V. Chirila, "Silk fibroin in ocular tissue reconstruction," *Biomaterials*, vol. 32, no. 10, pp. 2445–2458, 2011.
- [73] M. Zhu *et al.*, "Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts," *Acta Biomater.*, 2014.
- [74] H. He *et al.*, "Preparation and characterization of silk sericin/PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 457–464, 2017.
- [75] S. Gupta, S. Goswami, and A. Sinha, "A combined effect of freeze-thaw cycles and polymer concentration on the structure and mechanical properties of transparent PVA gels," *Biomed. Mater.*, vol. 7, no. 1, 2012.
- [76] J. Wang and M. Windbergs, "Functional electrospun fibers for the treatment of human skin wounds," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017.
- [77] Y. Shan and J. Xiong, "Silk fibroin/gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized with astragaloside IV induces healing and anti-scar effects on burn wound," *Int J Pharm.*, vol. 479, pp. 291–301, 2015.
- [78] S. Hu *et al.*, "Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.
- [79] M. P. Sikka and V. K. Midha, "The role of biopolymers and biodegradable polymeric dressings in managing chronic wounds," in *Advanced Textiles for*

Wound Care, 2018.

- [80] J. Liu *et al.*, "Controlled-release neurotensin-loaded silk fibroin dressings improve wound healing in diabetic rat model," *Bioact. Mater.*, vol. 4, no. March, pp. 151–159, 2019.
- [81] S. A. Kheradvar, J. Nourmohammadi, H. Tabesh, and B. Bagheri, "Starch nanoparticle as a vitamin E-TPGS carrier loaded in silk fibroin-poly(vinyl alcohol)-Aloe vera nanofibrous dressing," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 166, pp. 9–16, 2018.
- [82] D. Archana, B. K. Singh, J. Dutta, and P. K. Dutta, "Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015.
- [83] Consenso del grupo de trabajo de Expertos, "Consenso Internacional. Uso adecuado de los apósitos de plata en las heridas," *Wounds Int.*, 2012.
- [84] M. Zare-Gachi *et al.*, "Improving anti-hemolytic, antibacterial and wound healing properties of alginate fibrous wound dressings by exchanging counter-cation for infected full-thickness skin wounds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 107, no. May 2019, p. 110321, 2020.
- [85] J. He, Y. Liang, M. Shi, and B. Guo, "Anti-oxidant electroactive and antibacterial nano fibrous wound dressings based on poly (ϵ -caprolactone)/ quaternized chitosan-graft-polyaniline for full-thickness skin wound healing," *Chem. Eng. J.*, no. November, p. 123464, 2019.
- [86] J. S. Oh and E. J. Lee, "Engineered dressing of hybrid chitosan-silica for effective delivery of keratin growth factor and acceleration of wound healing," *Mater. Sci. Eng. C*, 2019.
- [87] A. Das, A. Kumar, N. B. Patil, C. Viswanathan, and D. Ghosh, "Preparation and characterization of silver nanoparticle loaded amorphous hydrogel of carboxymethylcellulose for infected wounds," *Carbohydr. Polym.*, 2015.
- [88] C. M. Srivastava, R. Purwar, and A. P. Gupta, "Enhanced potential of biomimetic, silver nanoparticles functionalized *Antheraea mylitta* (tasar) silk fibroin nanofibrous mats for skin tissue engineering," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 437–453, 2019.
- [89] S. Patil and N. Singh, "Antibacterial silk fibroin scaffolds with green synthesized silver nanoparticles for osteoblast proliferation and human mesenchymal stem

- cell differentiation," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 176, no. September 2018, pp. 150–155, 2019.
- [90] M. G. Mehrabani *et al.*, "Chitin/silk fibroin/TiO₂ bio-nanocomposite as a biocompatible wound dressing bandage with strong antimicrobial activity," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018.
- [91] S. Ghalei, J. Nourmohammadi, A. Solouk, and H. Mirzadeh, "Enhanced cellular response elicited by addition of amniotic fluid to alginate hydrogel-electrospun silk fibroin fibers for potential wound dressing application," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2018.
- [92] X. Yang *et al.*, "Green electrospun Manuka honey/silk fibroin fibrous matrices as potential wound dressing," *Mater. Des.*, vol. 119, pp. 76–84, 2017.
- [93] S. Li, L. Li, C. Guo, H. Qin, and X. Yu, "A promising wound dressing material with excellent cytocompatibility and proangiogenesis action for wound healing: Strontium loaded Silk fibroin/Sodium alginate (SF/SA) blend films," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 969–978, 2017.
- [94] M. Y. Bai, D. T. Wang, and J. Sin, "Sericin-based wound dressing with wound moisture indicator: In vitro and in vivo comparison study," *Materialia*, 2018.
- [95] S. Chao *et al.*, "Synthesis and characterization of tigecycline-loaded sericin/poly(vinyl alcohol) composite fibers via electrospinning as antibacterial wound dressings," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 44, no. February, pp. 440–447, 2018.
- [96] R. Zhao *et al.*, "Electrospun chitosan/sericin composite nanofibers with antibacterial property as potential wound dressings," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 68, pp. 92–97, 2014.
- [97] H. W. Kwak, H. Lee, M. E. Lee, and H. J. Jin, "Facile and green fabrication of silk sericin films reinforced with bamboo-derived cellulose nanofibrils," *J. Clean. Prod.*, 2018.
- [98] F. Wang *et al.*, "Fabrication of the FGF1-functionalized sericin hydrogels with cell proliferation activity for biomedical application using genetically engineered *Bombyx mori* (*B. mori*) silk," *Acta Biomater.*, 2018.

CAPÍTULO III: SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

3.1. Introducción

Los biomateriales con tamaño manométrico han venido siendo de gran interés para aplicaciones biomédicas, entre ellos se encuentran las nanopartículas de plata (AgNPs), estas han demostrado una gran capacidad antimicrobiana y bactericida [1], siendo una alternativa a los antibióticos comunes, puesto que se ha evidenciado la resistencia que adquieren las bacterias ante estos agentes antimicrobianos [2]. La obtención de AgNPs se realiza por diferentes métodos, por ejemplo las vías verdes o reducciones químicas[2][3], el uso de estos métodos pretende obtener un tamaño y geometría específico en las nanopartículas, puesto que sus propiedades antimicrobianas y bactericidas están ligadas con estas características [4].

Los diseños factoriales han sido de gran ayuda a la hora de optimizar diferentes procesos, como por ejemplo la recuperación de cromo en aguas residuales, también se pueden encontrar estudios de este tipo en el área médica, donde se desea obtener propiedades mecánicas adecuadas en un implante vascular [5][6], mostrando así la importancia de la estadística en diversos los campos de estudio. En este trabajo el diseño factorial se empleó con el fin de observar cómo influyen las variables o factores la síntesis de AgNPs, y como sus interacciones tienen un efecto sinérgico para la optimización; este tipo de diseño utiliza pruebas como la prueba F, la t student, el ajuste del modelo, entre otras[7].

En este capítulo será presentado el proceso de síntesis de nanopartículas, donde se usó un diseño factorial 2^k variando 4 factores de síntesis los cuales fueron la temperatura, porcentaje de citrato trisódico, concentración de nitrato de plata, y porcentaje de PVA, en dos niveles alto y bajo, se realizó un total de 32 muestras donde se obtuvo como resultado nanopartículas de plata (AgNPs) de diferentes tamaños con forma pseudoesférica, mediante la microscopía electrónica de transmisión se pudo observar tamaños de partículas entre los 20 y 110 nm, el resultado con mejores características en

cantidad AgNPs y tamaño de partícula fue la muestra Ag8 la cual tiene como parámetros de síntesis 100°C, 0,1 M de AgNO₃, 1% de PVA y 1% de citrato trisódico.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1. Síntesis de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas mediante reducción química, realizando modificaciones al protocolo implementado por Gallo et al. 2018 [8], para esto se variaron cuatro parámetros, temperatura de síntesis entre 80 °C y 100 °C, concentración del agente precursor, nitrato de plata AgNO₃ marca PanReac 100 % puro entre 0.11 M y 0.2 M, porcentaje del agente reductor, citrato trisódico dihidratado marca PanReac al 99 % de pureza, entre 1 % y 10 % y como agente dispersante se usó polivinil alcohol PVA marca SIGMA ALDRICH al 99 % hidrolizado variando su porcentaje entre 1 %, 2% y 10 % .

Para la síntesis primero se llevó el agua destilada hasta la temperatura deseada con agitación constante, la temperatura fue controlada constantemente para evitar fluctuaciones; cuando el agua alcanzó la temperatura, se le agregó la solución de nitrato de plata, continuando en agitación durante 10 min, al cabo de este tiempo se goteó lentamente el agente reductor citrato trisódico manteniendo la agitación; al finalizar este goteo se esperó que la solución tomara un color amarillo, para retirarla de la agitación y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente.

El PVA se disolvió a 70 °C en cada una de las concentraciones indicadas anteriormente durante 2 h, se dejó finalmente enfriar hasta temperatura ambiente, para mezclarlo en una proporción 1:1 con las diferentes soluciones de nanopartículas de plata, en un proceso de 30 min en agitación constante. En la figura 1 se observa el procedimiento antes descrito.

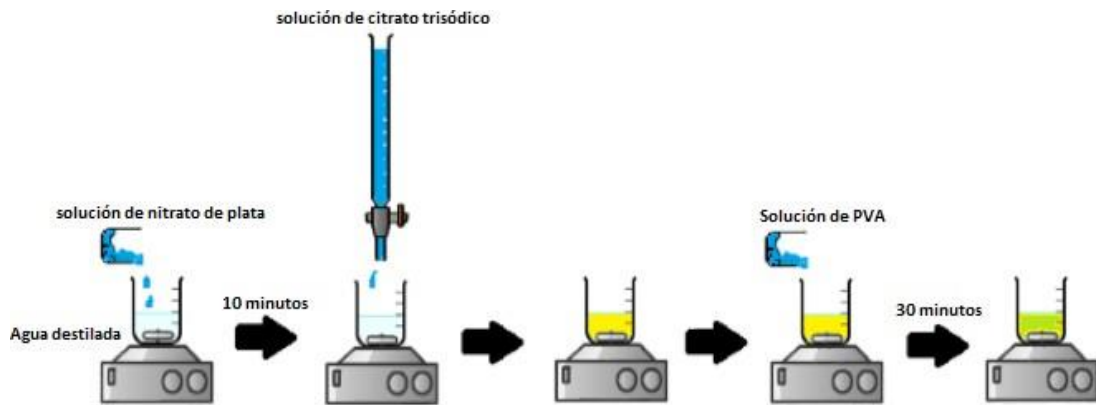


Figura 1 Diagrama de la síntesis de las nanopartículas de plata.

En la tabla 1 se presenta un resumen de los diferentes protocolos que fueron evaluados, indicando la nomenclatura para cada uno.

Tabla 1 parámetros correspondientes a cada muestra.

Muestra	Temperatura [°C]		Concentración de AgNO ₃ [M]		Porcentaje de PVA [%]		Porcentaje de citrato trisódico dihidratado [%]	
	80	100	0.1	0.2	1	2	1	10
Ag 1		x		x		x		x
Ag 2		x		x		x	x	
Ag 3		x		x	x			x
Ag 4		x		x	x		x	
Ag 5		x	x			x		x
Ag 6		x	x			x	x	
Ag 7		x	x		x			x
Ag 8		x	x		x		x	
Ag 9	x			x		x		x
Ag 10	x			x		x	x	

Ag 11	x			x	x			x
Ag 12	x			x	x		x	
Ag 13	x		x			x		x
Ag 14	x		x			x	x	
Ag 15	x		x		x			x
Ag 16	x		x		x		x	

3.2.2 Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)

A las soluciones obtenidas se les realizó un barrido en el equipo espectrofotómetro UV-VIS MAPADA 3200 PC en longitudes de onda entre 300 y 600 nm. El objetivo del análisis fue observar la longitud de onda donde se presenta la mayor absorbancia y definir el tamaño de partícula aproximado que se obtiene en cada síntesis.

Para verificar el tamaño de partícula obtenido se usó microscopía electrónica de transmisión TEM en el equipo Tecnai F20 Super Twin TMP de FEI, se escogieron solo 6 protocolos, los cuales mostraban un pico de absorbancia correspondiente con la plata. Las mediciones se realizaron usando el software del equipo TEM. Por otro lado, se verificó el tamaño de partícula usando dispersión de luz dinámica DLS en el equipo Zetasizer Pro con longitud de onda 632.8 nm.

3.2.3 Diseño factorial

Como este proyecto buscaba optimizar el tamaño de partícula final de las AgNPs, se realizó un diseño experimental 2^k , variando cuatro parámetros mencionados anteriormente en dos niveles alto y bajo como se observa en la tabla 1, con la variación de dichos parámetros en la síntesis de AgNPs se realizaron 16 muestras diferentes, a las cuales se les hizo un duplicado para así obtener 32 soluciones finales. El diseño experimental tuvo como variable de salida la longitud de onda, observada en el UV-VIS, puesto que, según lo registrado en la literatura, para un tamaño de partícula específico se obtiene una longitud de onda característica.

Estos valores se examinaron mediante el software R studio, a los cuales se les realizó las pruebas de normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos, para así poder realizar un análisis de varianza (ANOVA), posteriormente se realizó la optimización del diseño en el software STATGRAPHCS centurión XVII.

Las hipótesis usadas para cada prueba estadísticas se especifican en el análisis y discusión de los resultados.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Síntesis de AgNPs

En la figura 2 se observan las diferentes soluciones obtenidas en la síntesis de AgNPs. Con la variación de los diferentes factores se evidencia una tendencia que a mayor nivel de molaridad del AgNO_3 , existe una coloración marrón más oscura, este cambio de tonalidad lo han registrado diferentes autores y se atribuye a una mayor concentración de AgNO_3 tal como sucede en nuestro caso, esto debido a que existe mayor cantidad de agente precursor para la formación de AgNPs [9]–[11].

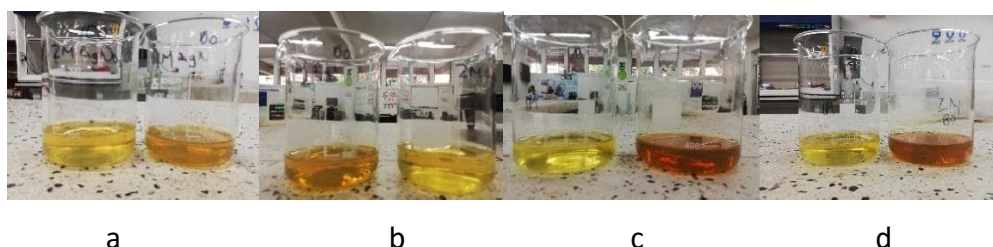


Figura 2 Soluciones de la síntesis de nanopartículas de plata, a. 100 °C, 0.1 y 0.2 M AgNO_3 , 10% citrato de sodio, b. 100 °C, 0.1 y 0.2 M AgNO_3 , 1% citrato de sodio, c. 80 °C, 0.1 y 0.2 M AgNO_3 , 10% citrato de sodio, d. 80 °C, 0.1 y 0.2 M AgNO_3 , 1% citrato de sodio.

3.3.2 Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)

3.3.2.1 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis)

En la figura 3 se muestran los espectros UV-Vis para todos los protocolos realizados. Se resalta en la leyenda de la figura los espectros obtenidos cuando se adicionó PVA al 10%, debido a que al realizar el espectro es evidente la presencia del PVA sobre las AgNPs,

efecto verificado al efectuar el espectro UV-Vis del PVA (Figura 4), donde se observan bandas en 273 y 323 nm, que aparecen también registradas en los espectros de las nanopartículas sintetizadas (ver flechas, figura 3), dando así picos en las longitudes de ondas erróneas las cuales corresponden al espectro de PVA, es por esto que se redujo el porcentaje de PVA correspondiente al nivel alto de 10% a 2%, esto con el fin de evitar el enmascaramiento por el alto porcentaje. La presencia de bandas de absorción en el espectro UV-Vis en longitudes de onda entre 400 a 450 nm, indica la presencia de nanopartículas metálicas de plata; dichas bandas corresponden a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales de la plata [12].

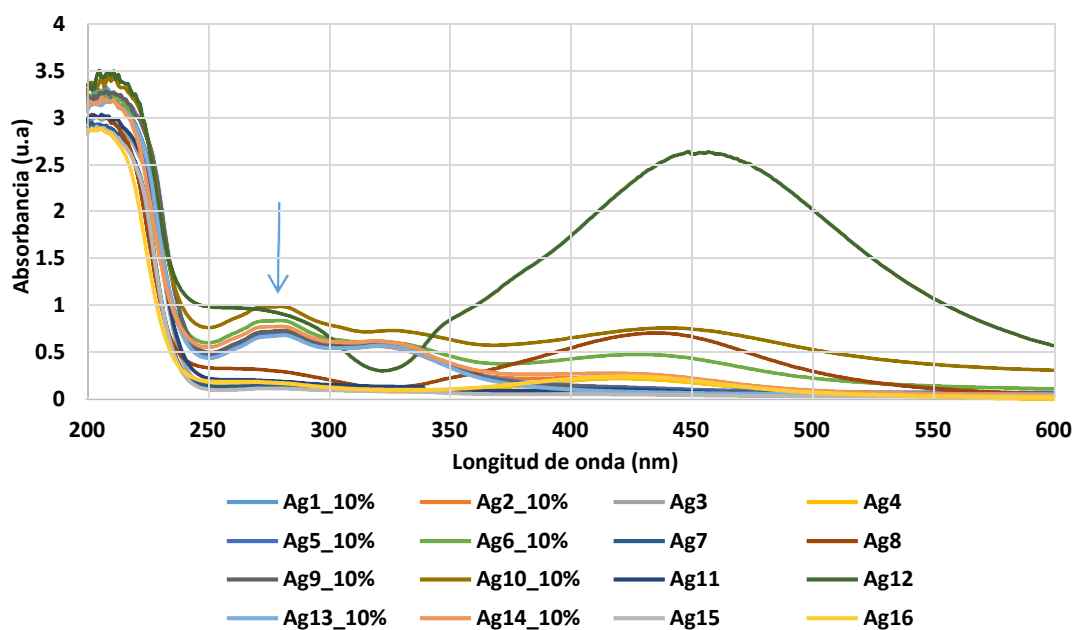


Figura 3 Espectros del ensayo con PVA al 10%.

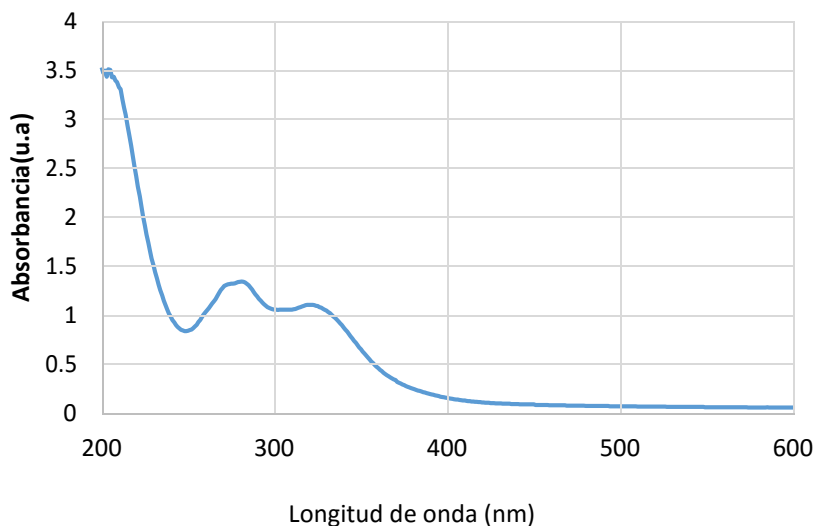


Figura 4 Espectro UV-Vis del PVA.

En las figuras 5 a la 8 se visualizan los diferentes espectros UV-Vis para los protocolos evaluados, la nomenclatura mostrada corresponde a la información contenida en la tabla 1.

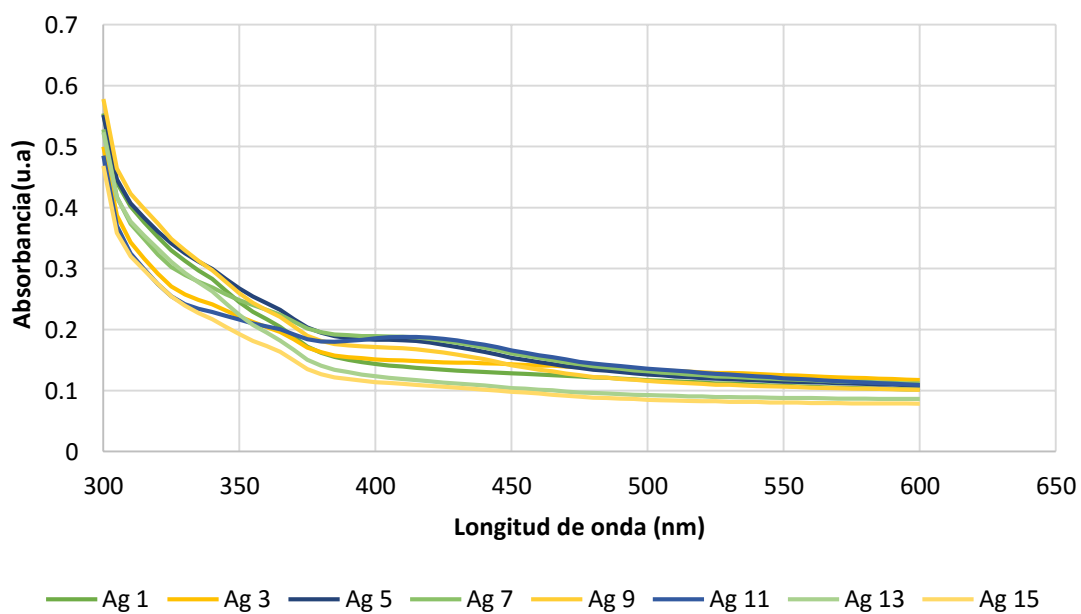


Figura 5 Espectro UV-Vis muestras con baja absorbancia.

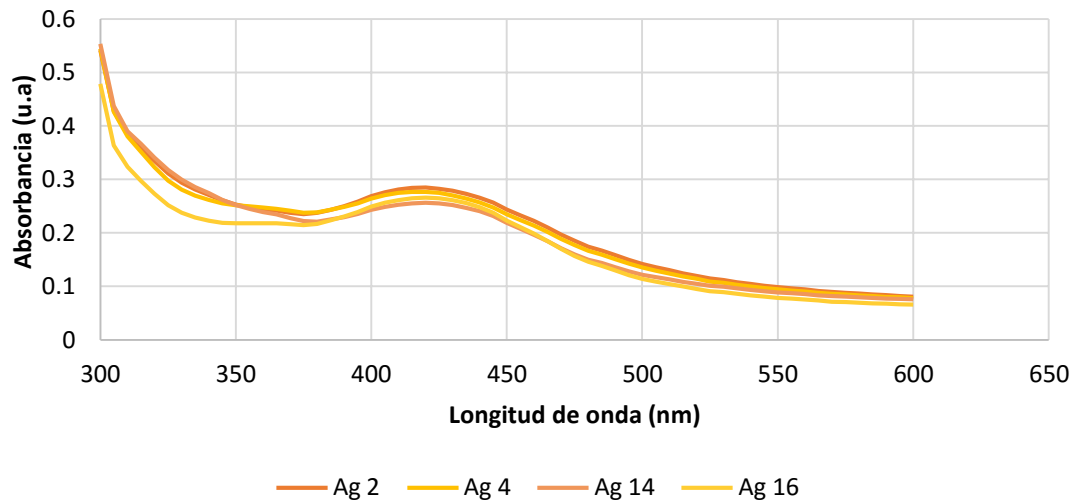


Figura 6 Espectro UV-Vis protocolos con bandas en longitud de onda entre 400 y 450 nm.

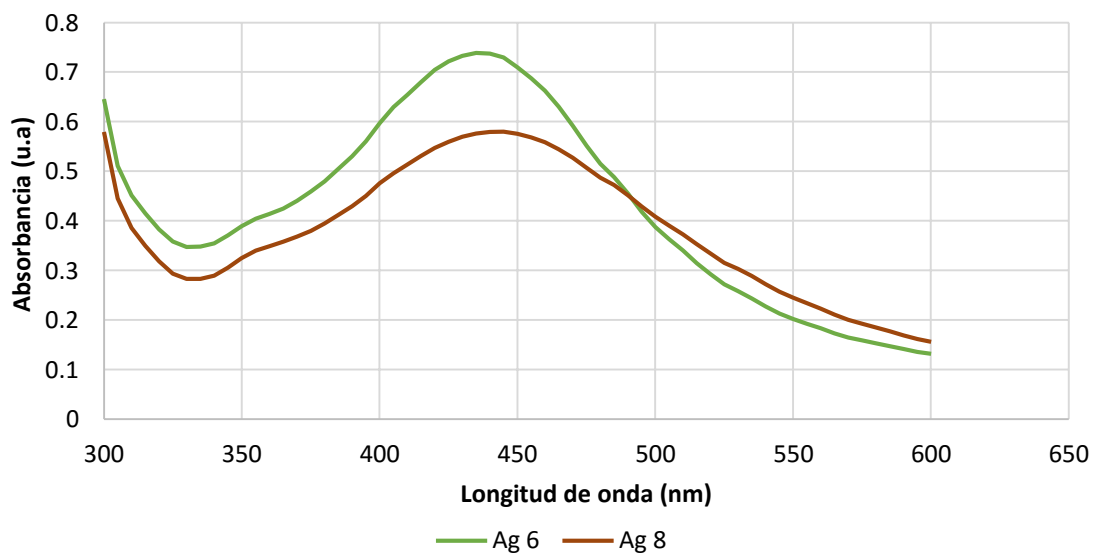


Figura 7 Espectro UV lo-Vis protocolos con bandas en longitud de onda entre 400 y 480 nm.

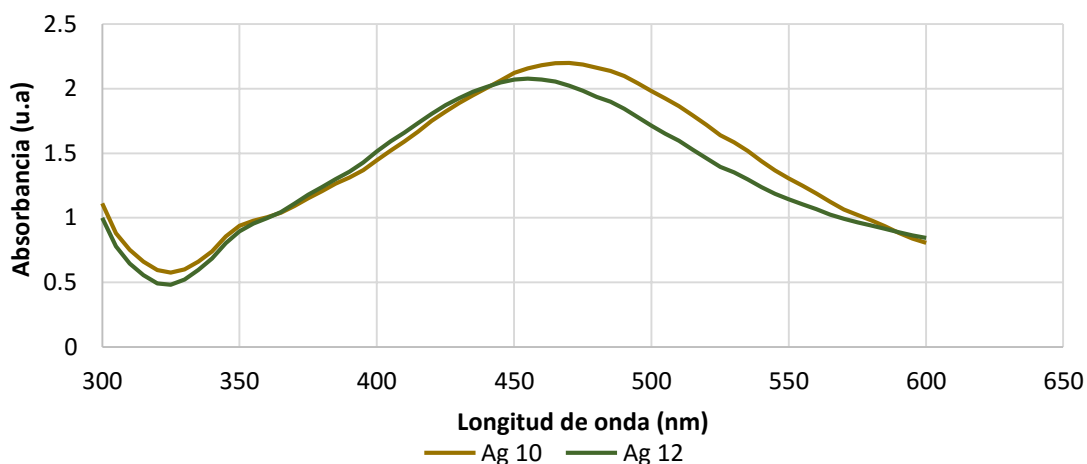


Figura 8 Espectro UV-Vis protocolos con bandas en longitud de onda entre 400 y 550 nm.

En las figuras de las 5 a la 8, se muestran los espectros obtenidos para una de las síntesis realizadas, se evidencia que existen muestras con mayor absorbancia que otras, en la figura 5 se puede ver claramente que no existe un pico característico en la curva lo que puede indicar dos cosas que no hubo formación de AgNPs o que la reacción dio muy pocas AgNPs con un tamaño de partícula muy pequeño, en la figura 6 se evidencia un pico aproximadamente en los 420 nm que corresponde aproximadamente a un tamaño de partícula de 40 nm [13], sin embargo una absorbancia baja; esto debido a una baja concentración de AgNPs formadas en la solución. En las figuras 7 y 8 se puede observar cómo se forma un pico aproximadamente entre los 430 y 470 nm, que corresponde a un tamaño de partícula entre los 30 y 60 nm [13], con una absorbancia mucho mayor que las muestras anteriores, siendo las muestras Ag10 y Ag12 las que presentan mayor absorbancia, la cual puede asociarse a que exista gran cantidad de AgNPs que corresponden a este tamaño o a la formación de nanopartículas más pequeñas en forma de aglomerados, en estas longitudes de ondas teóricamente las AgNPs, deben oscilar en un rango de 60 nm a 80 nm [14], las otras dos curvas Ag6 y Ag8 con mayor absorbancia se espera un tamaño de partícula aproximadamente de 40 nm, cabe resaltar que no se tiene gran diferencia entre la primera síntesis y su réplica, lo que indica que los procesos se realizaron adecuadamente.

3.3.2.2. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Posterior al análisis por UV-Vis se seleccionaron las muestras que presentaron las bandas características de la plata entre 400 a 450 nm.

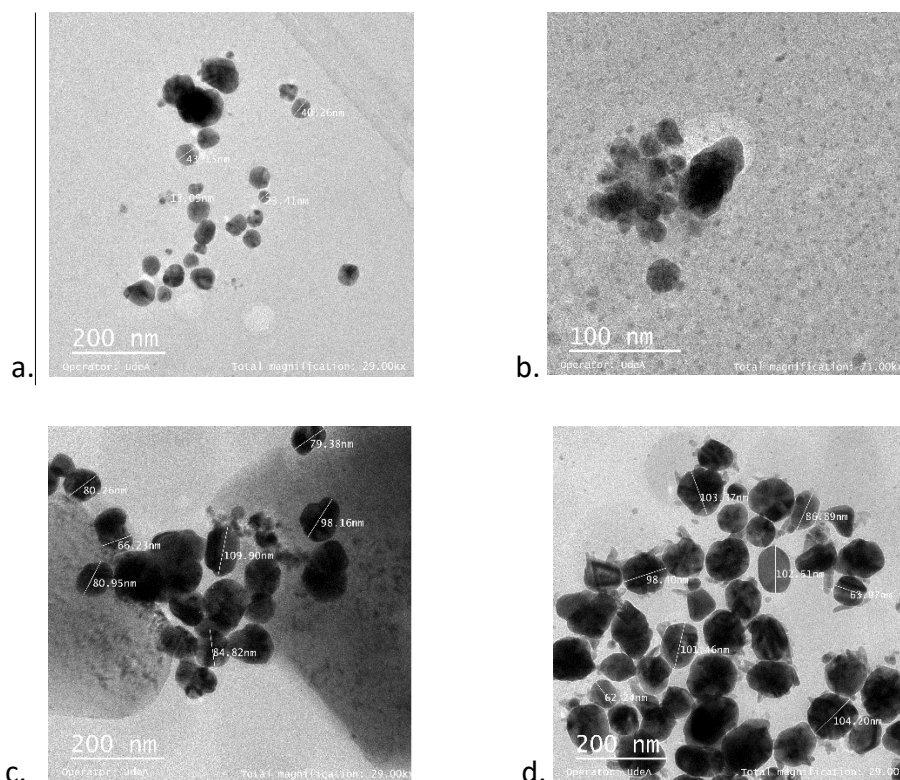


Figura 9 micrografías TEM, a. Ag8 (13 a 40 nm); b. Ag9 (6 a 15 nm);
c. Ag10 (60 a 110 nm); d. Ag12. (62 a 103 nm)

De las micrografías TEM se midieron las nanopartículas mediante el software asociado al equipo TEM, se hizo un promedio aproximado de 20 partículas, con el cual se sacó el tamaño aproximado de las AgNPs presentes en las diferentes muestras, según los datos registrados por el ensayo de UV-Vis se puede esperar ciertos tamaños de partículas según la literatura [13], al compararlos con los resultados obtenidos en el TEM, se puede ver que en la tabla 2 que las mayoría de AgNPs no difieren considerablemente con lo reportado por la literatura, con una diferencia no mayor a los 10 nm, **exceptuando la muestra Ag10 en donde su tamaño más grande es 80 nm y el obtenido empiezan en 90 nm, sin embargo se puede concluir** que las AgNPs se obtuvieron de forma adecuada, además como se observa en la figura 9 c y 9 d, existe una gran cantidad de AgNPs por

lo cual se presenta la absorbancia medida en el UV-Vis, también se puede afirmar que las AgNPs son de tamaño nano puesto que son menores en su gran mayoría a 100 nm, se evidencia además que la geometría obtenida es pseudoesférica.

Tabla 2 Valores de AgNPs obtenidos.

Muestra	Absorbancia	Valor teórico (nm)	Valor experimental (nm)
Ag 9	390 – 460	20 – 60	6 – 15
Ag 8	390 – 460	20 – 60	13 – 40
Ag 10	430 – 470	60 - 80	90 – 110
Ag 12	430 – 470	60 - 80	62 – 103

3.3.2.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Como las AgNPs no tienen un tamaño exacto, sino que oscilan en un rango, se debe realizar el DLS a las muestras, para realizar una verificación del tamaño que poseen las muestras, los resultados se presentan en las Figuras 10 a la 14.

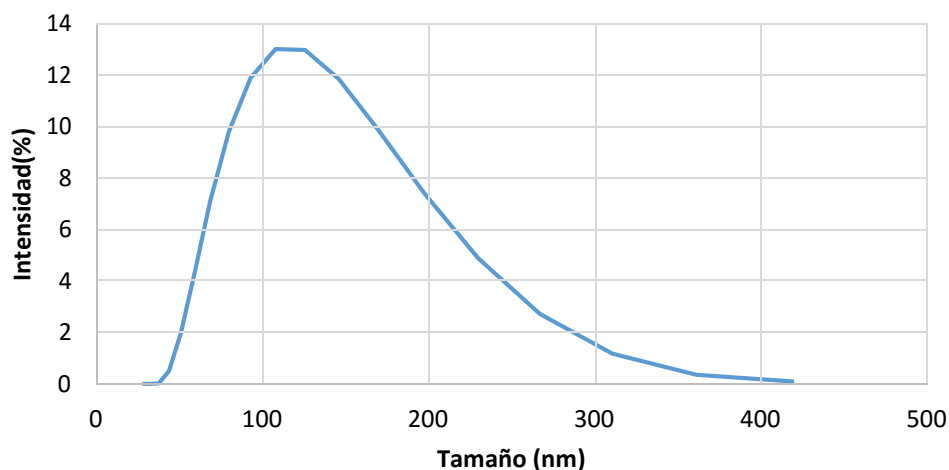


Figura 10 DLS de la muestra Ag 12.

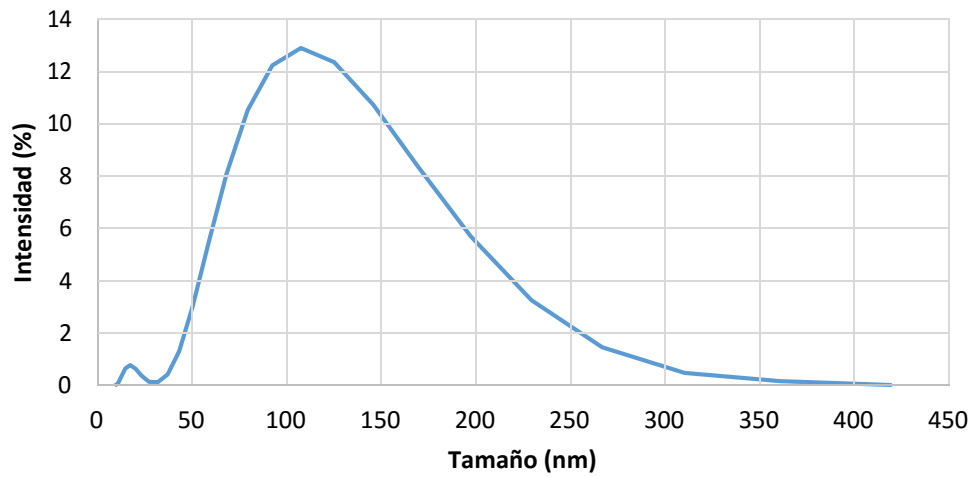


Figura 11 DLS de la muestra Ag 10.

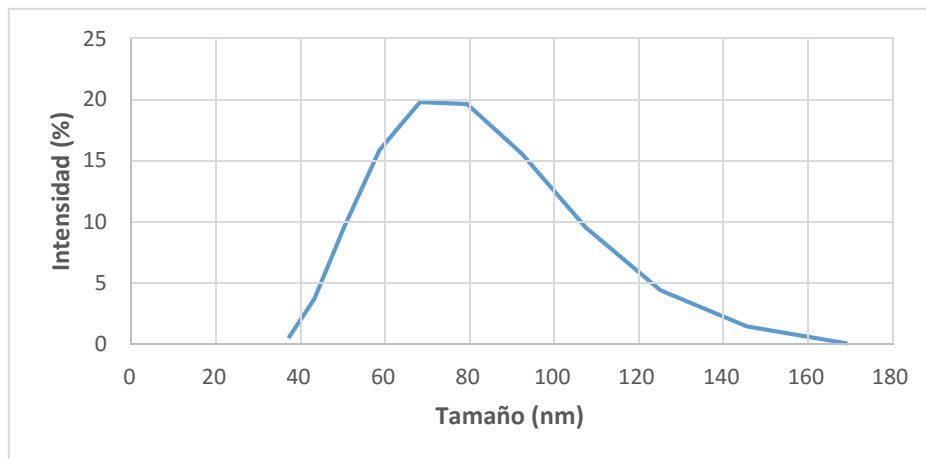


Figura 12 DLS de la muestra Ag 8.

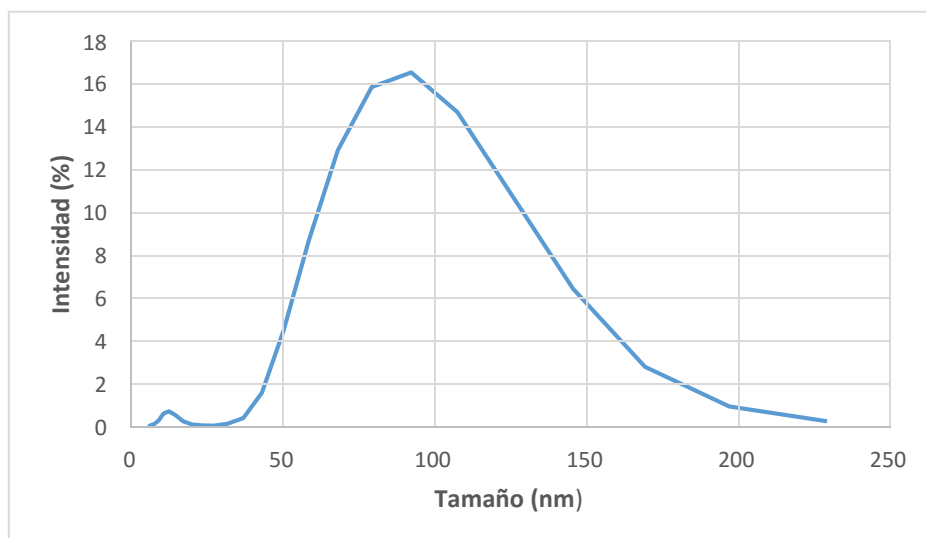


Figura 13 DLS de la muestra Ag 9.

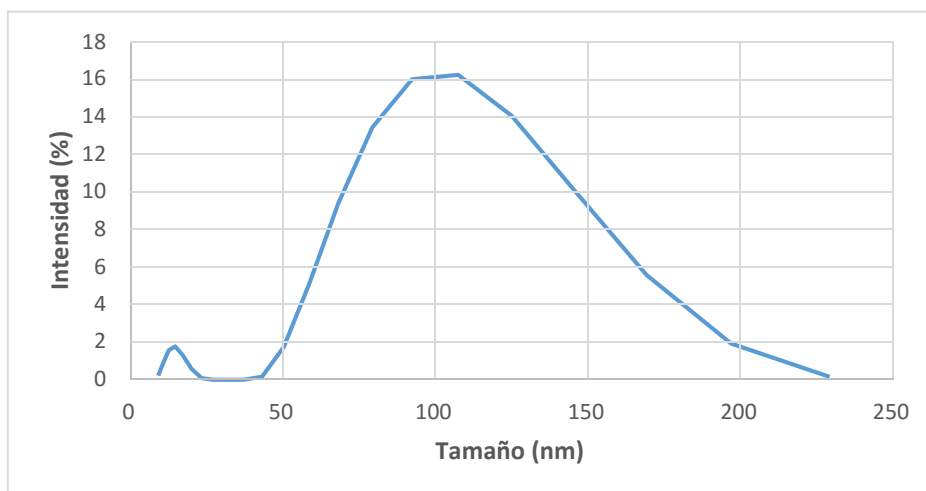


Figura 14 DLS de la muestra Ag 4.

En las curvas anteriores se puede ver cómo es la distribución de partículas en las diferentes soluciones preparadas, si bien existen tamaños mayores a los 100 nm, estos valores pueden asociarse con la aglomeración de partículas en el tiempo, **la cual se revierte con la aplicación de procesos como el ultrasonido antes de usar las nanopartículas en la preparación de las películas,** como se verá en capítulos posteriores. En los resultados observados en el TEM no se evidenció presencia de partículas mayores a los 200 nm, se nota que existen AgNPs en el rango esperado y menores a 100 nm, además para las muestras Ag 4, Ag 6 y Ag 10, existe un pequeño pico entre los 10 y 20 nm el cual es el tamaño esperado para la optimización del ensayo. Si bien los resultados obtenidos mediante esta técnica tienen un rango mayor a los mostrados en las anteriores técnicas, **se evidencia que las longitudes de onda obtenidas en el UV-Vis daban un tamaño de partícula de 20 a 100 nm aproximadamente,** están dentro del rango de los resultados obtenidos mediante DLS.

3.3.3. Diseño Factorial

Para la optimización del diseño factorial se partió de los datos de la tabla 3, que muestran las longitudes de ondas obtenidas para las dos síntesis realizadas, se puede observar cómo los valores son muy cercanos entre las mismas muestras de las dos síntesis, lo que indica que el método es reproducible. Este valor de longitud de onda fue el usado para el análisis estadístico de los datos, pues presenta relación con la presencia de plata y además con el tamaño esperado de las partículas, debido a que se variaron la temperatura la cual ayuda a la formación de AgNPs debido a que aumenta la cinética en

la reacción, el nitrato de plata es el agente precursor puesto que mediante la reducción se pasa de una sal metálica al átomo cerovalente, estos átomos se comportan como centros de nucleación así se van formando la AgNPs por la agregación de varios de estos átomos, para detener el crecimiento se usa un agente reductor como es el citrato trisódico en este caso, su función consiste en unirse a la superficie de las AgNPs estabilizándolas [15].

Tabla 3 Datos experimentales de las síntesis

Muestra	Ensayo 1 Longitud de onda (nm) UV-Vis	Ensayo 2 Longitud de onda (nm) UV-Vis
Ag 1	395	395
Ag 2	420	420
Ag 3	395	395
Ag 4	420	420
Ag 5	395	410
Ag 6	435	440
Ag 7	400	410
Ag 8	445	435
Ag 9	395	395
Ag 10	470	465
Ag 11	415	395
Ag 12	450	470
Ag 13	395	395
Ag 14	420	420
Ag 15	395	395
Ag 16	415	420

En el análisis exploratorio el cual corresponde de la figura 15 a 17, se presenta inicialmente el diagrama de caja y bigotes, indican que los únicos datos que coinciden en sus medianas es decir difieren en su valor central son en los niveles de porcentaje de

citrato trisódico, además se observa la presencia de valores atípicos esto indica que existen dos valores que difieren numéricamente del resto de ese factor, y al sus medianas estar separadas indica que entre los niveles existe una diferencia numérica [7], en la figura 16 se puede observar la tendencia de la respuesta de los datos, en donde la mayoría de datos se encuentran en el intervalo de 380 a 400 nm, lo cual se corrobora de las tabla 3, donde gran cantidad da 395 nm. Respecto al diagrama de densidad, que estadísticamente se espera en forma de campana de Gauss, indicando una distribución normal, no presenta dicha forma sino una distribución asimétrica positiva indicando así que la mayoría de los datos se encuentran en una longitud de onda baja, es por esto por lo que se hace necesario realizar la prueba de normalidad. En el gráfico de interacciones que se muestra en la figura 17, se puede notar como dos factores no presentan interacción que pueda afectar la respuesta y estos son la temperatura con el porcentaje de citrato trisódico, en las otras interacciones se evidencia como los factores afectan la respuesta en este caso la longitud de onda.

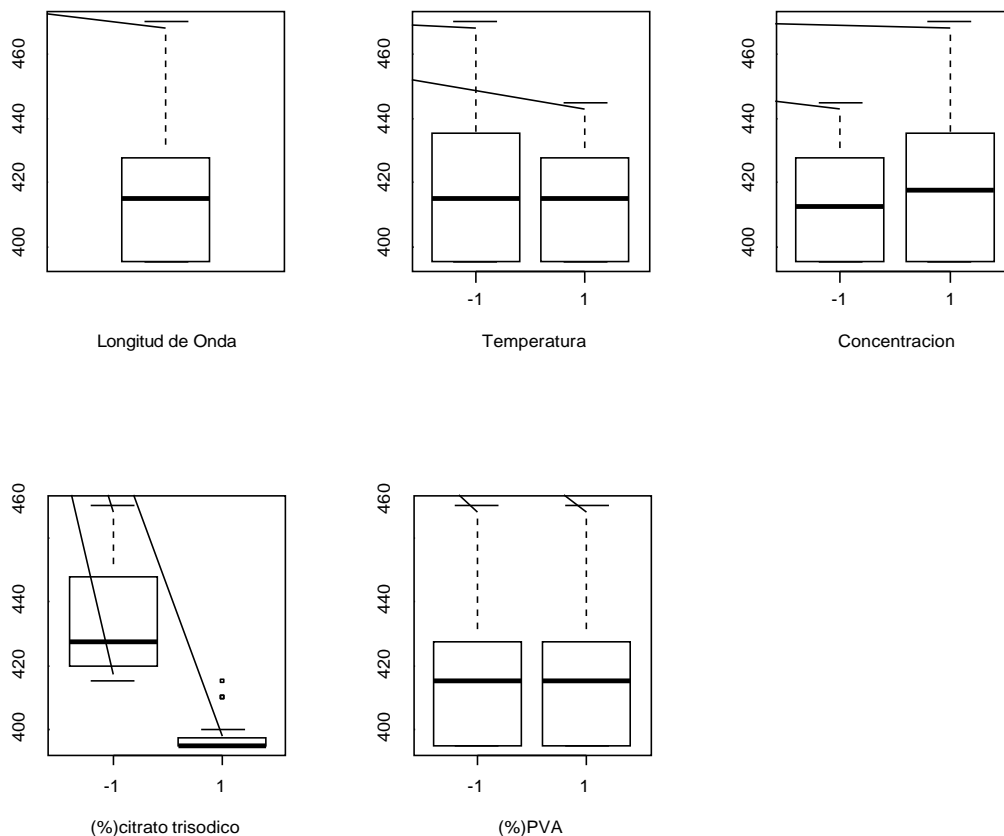


Figura 15 Diagrama caja y bigotes para los diferentes factores que afectan la síntesis de AgNPs.

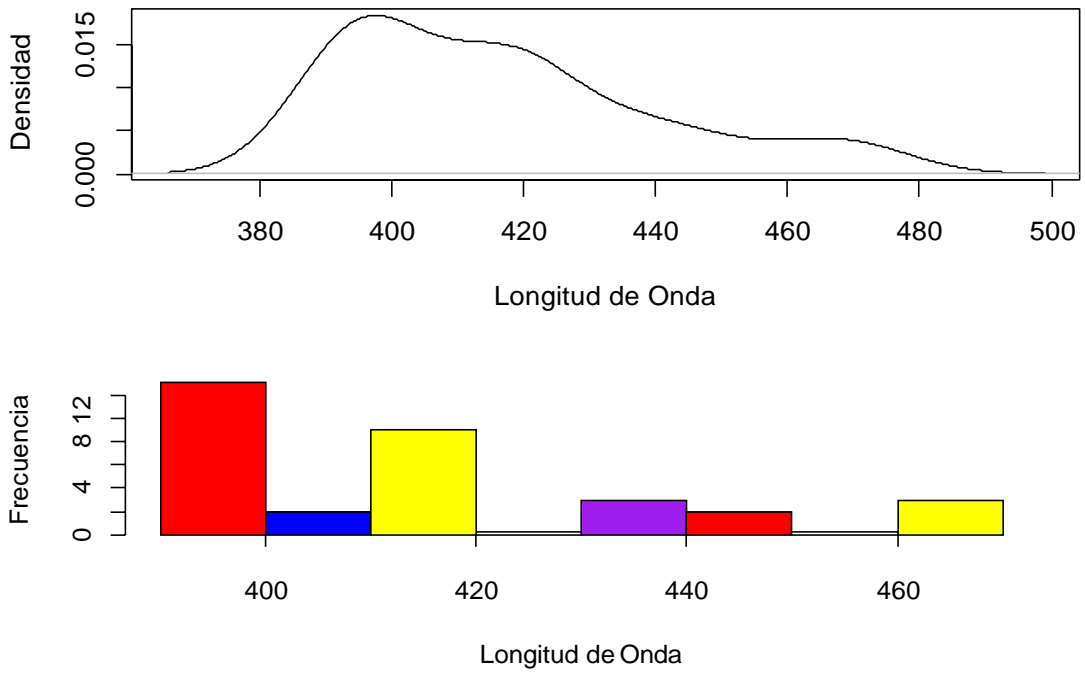


Figura 16 Diagrama de densidad (superior) e histograma de frecuencia (inferior) de la longitud de onda.

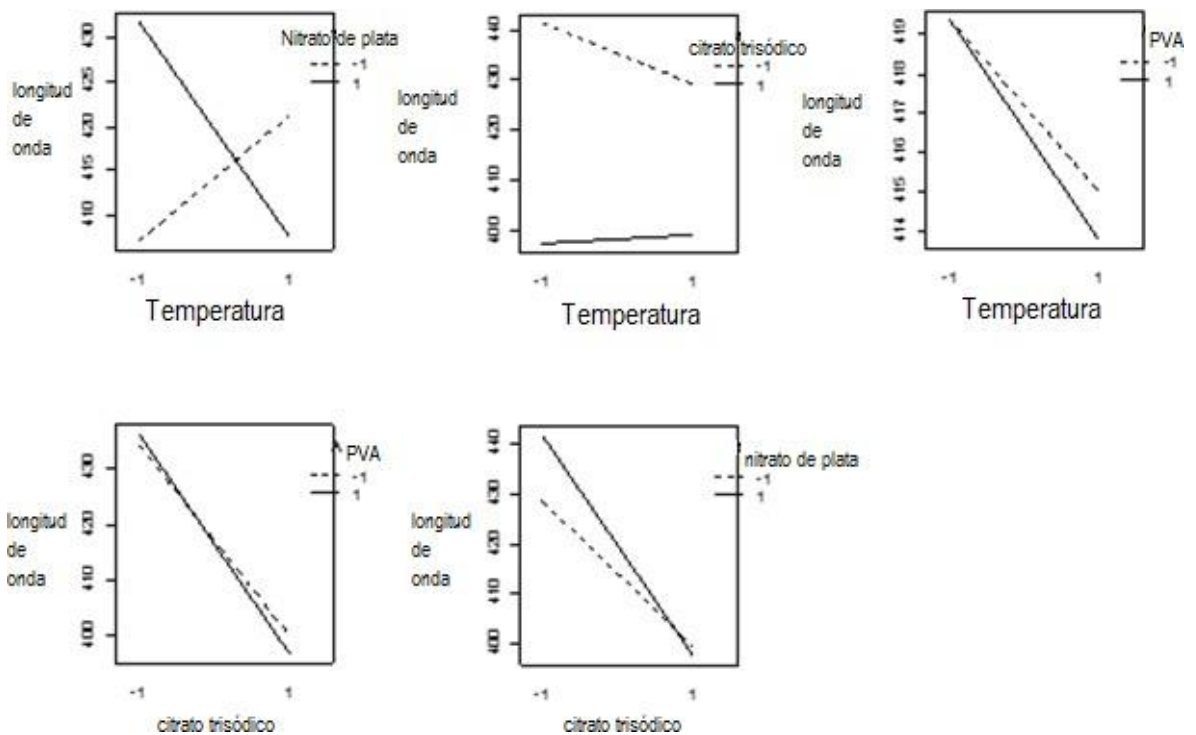


Figura 17 Interacción de los factores que afectan la síntesis de AgNPs.

3.3.3.1. Análisis de varianza (ANOVA)

Para el análisis de varianza (ANOVA), primero se hizo las pruebas de normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos, con un intervalo de confianza del 95%.

Para el test de normalidad de los datos se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, obteniéndose como resultado un valor-P de 0.161867, esta prueba tiene como hipótesis nula que los datos proviene de una distribución normal, en el resultado se evidencia que él está dentro del intervalo de confianza puesto que es mayor al 0.05; por lo tanto se puede afirmar, que la hipótesis nula se cumple y los datos provienen de una distribución normal [7]. Para la prueba de homocedasticidad de los datos se hizo mediante la prueba de Levene, la cual arrojo lo resultados mostrados en la tabla 4.

Tabla 4 Prueba Levene de los datos.

Prueba Levene	
Grupo	Valor-P
Porcentaje PVA	0.6324
Concentración AgNO₃	0.1367
Porcentaje citrato trisódico	0.0019
Temperatura	0.1826

La prueba de homocedasticidad de Levene tiene como hipótesis nula, que la varianza de los datos es igual, como se evidencia en la tabla 4 existe un valor que es menor al 0.05 lo cual indica que existe una varianza entre sus datos, esto para el factor de porcentaje de citrato trisódico [7].

La prueba de independencia se realizó mediante la prueba de Durbin Watson, para el modelo ajustado se tienen los datos de la tabla 5.

Tabla 5 Prueba Durbin Watson del modelo ajustado.

Prueba Durbin Watson	
	Valor P
Modelo ajustado	0.9247
Porcentaje PVA del modelo ajustado	0.8234
Concentración AgNO₃ del modelo ajustado	0.8812
Porcentaje citrato trisódico del modelo ajustado	0.4593
Temperatura del modelo ajustado	0.8631

El análisis de independencia de los datos la cual se hizo por el test de Durbin Watson que tiene como hipótesis nula que la auto correlación de los datos es cero, como se observa en la tabla 5 los valores P son mayores al 0.05, es decir no existe auto correlación y los datos son independientes [7], condición necesaria para validar el ANOVA.

En vista que todos las pruebas estuvieron dentro del nivel de confianza, exceptuando un factor para la prueba de homocedasticidad, se realizó la prueba de falta de ajuste Lack of fit, la cual dio un valor P de 0.4176, esta prueba se hizo con fin de evaluar si una relación curvilínea podría expresar mejor a los datos que un modelo lineal, esta prueba se basa en el análisis de la varianza de los residuales, esta tiene como hipótesis nula que no existe falta de ajuste del modelo, y como se observó el valor P es mayor a 0.05, por lo cual se acepta la hipótesis nula y se puede seguir con el análisis de varianza [7].

Como los datos pasaron la prueba Lack of fit, se realizó el ANOVA, los resultados se encuentran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6 ANOVA del modelo del diseño factorial.

Factores individuales	Valor P
Temperatura	0,041
AgNO₃	0,024
PVA	0,785
Citrato trisódico	2.05*10 ⁻¹¹
Interacción de factores	
Temperatura:AgNO₃	2,15*10 ⁻⁷
Temperatura: PVA	0,785
AgNO₃:PVA	1,000
Temperatura: Citrato trisódico	0,008
AgNO₃:citrato trisódico	0,004
PVA: Citrato trisódico	0,283
Temperatura: AgNO₃:PVA	0,587
Temperatura: AgNO₃:citrato trisódico	4,42*10 ⁻⁵
Temperatura: PVA: citrato trisódico	0,284
AgNO₃:PVA: Citrato trisódico	0,417
Temperatura: AgNO₃:PVA: Citrato trisódico	0,417

Tabla 7 ANOVA del modelo ajustado del diseño factorial.

Factor individual	Valor P
Temperatura	0,024
AgNO₃	0,012
Citrato trisódico	2.51*10 ⁻¹⁵
Interacción de factores	
Temperatura:AgNO₃	1.81*10 ⁻⁹
Temperatura: Citrato trisódico	0,003
AgNO₃:citrato trisódico	0,001
Temperatura: AgNO₃:citrato trisódico	3.16*10 ⁻⁶

En la tabla 6 se presenta el análisis factorial del modelo en donde se evidencia que solo 7 factores entre individuales e interacciones presentan una significancia estadística. Con el fin de reducir el modelo se eliminaron uno a uno los factores que no representan una significancia estadística, obteniendo como resultado la tabla 7 en donde se observa que el PVA no influencia la obtención de AgNPs, lo cual es evidente debido a que este es solo un factor para ayudar a la dispersión de las AgNPs en la solución. La temperatura, la concentración de AgNO_3 , el porcentaje de citrato trisódico, y la interacción entre temperatura: AgNO_3 , temperatura: Citrato trisódico, y AgNO_3 : citrato trisódico, muestran que influyen en la obtención de las AgNPs, siendo más relevante el factor del porcentaje de citrato trisódico.

Estos parámetros hacen variar la obtención final de AgNPs, puesto que a mayor porcentaje de nitrato de plata se dará mayor cantidad de AgNPs, sin embargo si el citrato trisódico está en menor proporción no se alcanza a reducir toda la sal de plata, y si hay mayor porcentaje de citrato trisódico que de AgNO_3 , las AgNPs obtenidas son de un tamaño muy pequeño puesto que se estabilizan muy rápido, como se observa en la tabla 1 y la tabla 3, se puede ver que las muestras con 10% que corresponde al nivel alto de citrato trisódico, la longitud de onda es de aproximadamente 395 nm, lo que indica que las AgNPs formadas tienen un tamaño menor a los 20 nm, también se puede observar que las AgNPs con un tamaño entre los 20 y 100 nm se obtienen usando citrato trisódico en nivel bajo que corresponde a las longitudes de onda entre 410 y 490 nm, lo que indica que si se quiere disminuir el tamaño de partícula es necesario aumentar la concentración de citrato trisódico independientemente de la concentración de AgNO_3 , la temperatura afecta las AgNPs en el sentido que la reacción de reducción y estabilización se dé más rápido, con lo que se aumenta el tamaño de partícula y la concentración de estas como se evidencian en las imágenes TEM de la figura 9, este parámetro también afecta la tonalidad de la solución puesto que a mayor concentración de AgNPs la solución se torna más oscura.

3.3.2.3. Optimización del diseño

Para la optimización del diseño a un tamaño de partícula aproximado de 20 nm el cual corresponde a una longitud de onda de 400 nm aproximadamente [14], se registran en la tabla 8, el cual es el que propone la literatura para la aplicación en apósitos, esto debido a que entre 10 y 20 nm las AgNPs interaccionan de mejor manera con la membrana de los microorganismo ocasionando una mayor inhibición de estos [16], se debe tener una temperatura de 91 °C, una concentración de nitrato de plata de 0.13 molar y finalmente una concentración de citrato trisódico de aproximadamente el 10%, lo que se deduce que al haber mayor cantidad de agente reductor las AgNPs se obtienen en un tamaño más pequeño, según lo reportado para este tipo de síntesis se puede variar la forma en que se agrega la solución precursora al agente reductor y con una menor temperatura se obtienen tamaños entre los 20 y 30 nm [11].

Tabla 8 Valores de optimización para la síntesis de AgNPs.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>	<i>valor</i>
Temperatura	-1.0	1.0	0.098	91 °C
AgNO ₃	-1.0	1.0	-0.58	0.13 M
Citrato trisódico	-1.0	1.0	0.98	10 %

Se observa de la tabla 1, que estos valores tienen una gran semejanza con la muestra Ag 5, en donde se observa que para esta muestra en la tabla 2, se tiene una longitud de onda entre los 395 y 410 nm, lo cual corrobora que la optimización para obtener partículas de un tamaño de 20 nm o menores es acertada.

Si bien el valor deseado para apósitos se tiene a 20 nm, debido a la baja concentración que se obtiene para esta en Ag 5, debido a su absorbancia tan baja, se trabajara con la muestra Ag 8 puesto que esta posee valores en este rango y la absorbancia relacionada con la concentración es mucho mayor como se muestra en la figura 7.

Conclusiones

- Los diseños factoriales son de gran importancia debido a que permiten la optimización de procesos o síntesis, en este caso permitió observar cómo al variar los factores de la síntesis de nanopartículas de plata se modifican las características finales de estas.
- Los factores temperatura, concentración de AgNO_3 , porcentaje de citrato trisódico, exceptuando el porcentaje de PVA, al ser variados modifican la geometría y tamaño de las AgNPs.
- La interacción de la temperatura, el citrato trisódico y el nitrato de plata, es de gran importancia por su efecto en la obtención final de las AgNPs.
- Según los resultados mostrados, concentración y tamaño de partícula, el protocolo Ag 8 se elige para continuar con el proceso de fabricación de los apósitos.

Bibliografía

- [1] M. Guzman, J. Dille, and S. Godet, "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 8, no. 1. pp. 37–45, 2012.
- [2] J. P. Zhang, P. Chen, C. H. Sun, and X. J. Hu, "Sonochemical synthesis of colloidal silver catalysts for reduction of complexing silver in DTR system," *Appl. Catal. A Gen.*, 2004.
- [3] K. Patel, S. Kapoor, D. P. Dave, and T. Mukherjee, "Synthesis of nanosized silver colloids by microwave dielectric heating," *J. Chem. Sci.*, 2005.
- [4] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, "Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem.*, 2015.
- [5] M. E. R. Carmona, M. A. P. Da Silva, and S. G. Ferreira Leite, "Biosorption of chromium using factorial experimental design," *Process Biochem.*, 2005.
- [6] I. Y. Enis, H. Sezgin, and T. G. Sadikoglu, "Full factorial experimental design for mechanical properties of electrospun vascular grafts," *J. Ind. Text.*, 2018.

- [7] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments: Eight Edition*. 2012.
- [8] J. P. Gallo and C. Ossa, "Fabricación y caracterización de nanopartículas de plata con potencial uso en el tratamiento del cáncer de piel," *Rev. Científica Ing. y Desarro.*, vol. 37, 2019.
- [9] A. P. Ananda, H. M. Manukumar, N. B. Krishnamurthy, B. S. Nagendra, and K. R. Savitha, "Assessment of antibacterial efficacy of a biocompatible nanoparticle PC@AgNPs against *Staphylococcus aureus*," *Microb. Pathog.*, 2019.
- [10] N. K. Ahila *et al.*, "Synthesis of stable nanosilver particles (AgNPs) by the proteins of seagrass *Syringodium isoetifolium* and its biomedical properties," *Biomed. Pharmacother.*, 2016.
- [11] U. T. Khatoon, G. V. S. Nageswara Rao, K. M. Mohan, A. Ramanaviciene, and A. Ramanavicius, "Antibacterial and antifungal activity of silver nanospheres synthesized by tri-sodium citrate assisted chemical approach," *Vacuum*, 2017.
- [12] J. Morales, J. Morán, M. Quintana, and W. Estrada, "SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR LA RUTA Sol-Gel A PARTIR DE NITRATO DE PLATA SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES BY Sol-Gel ROUTE FROM SILVER NITRATE," *Rev. Soc. Quím. Perú*, vol. 75, no. 2, pp. 177–184, 2009.
- [13] A. Wei, "Chapter 7 PLASMONIC NANOMATERIALS their Ensembles," 2003.
- [14] A. Wei, "PLASMONIC NANOMATERIALS Enhanced Optical Properties from Metal Nanoparticles and their Ensembles."
- [15] Á. B. Sifontes *et al.*, "Preparation of silver nanoparticles in the absence of polymer stabilizers," *Quim. Nova*, 2010.
- [16] J. L. Velázquez-Velázquez *et al.*, "Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles," *Mater. Sci. Eng. C*, 2015.

CAPÍTULO IV: EXTRACCIÓN DE FIBROÍNA Y SERICINA

4.1 Introducción

En este capítulo se realizó la extracción de fibrina y sericina provenientes de los capullos de gusano de seda *Bombyx mori*, estos polímeros fueron caracterizados mediante las técnicas de UV-Vis y FTIR, con el fin de observar si aparecían los picos de los aminoácidos que conforman esos polímeros y los grupos funcionales de esto, se verificó la aparición de los picos característicos de las amida I, II y III, lo cual confirmó que la extracción se hizo correctamente, también se estandarizó el proceso de extracción de fibroína y sericina, para obtener las concentraciones de 2,5 % w/v para la fibroína y 0,5 % w/v para la sericina con las cuales se trabajó, se notó que en el proceso se obtenían concentraciones similares por lo cual se puede afirmar que el protocolo es reproducible, se evidencia que por encima de 1.25 % w/v la sericina tiende a gelarse, por lo cual se trabajó por debajo de este valor.

4.2 Metodología

4.2.1. Extracción de fibroína (SF) y sericina (SS)

La extracción de fibroína se hizo a partir de capullos de gusano de seda *Bombyx mori*, el protocolo seguido fue planteado por Estefanía et al (2019) y optimizado por el grupo de investigación BIOMAT de la Universidad de Antioquia, el cual consiste en 4 procesos: preparación de los capullos, separación de las proteínas sericina y fibroína presentes en las fibras de seda, disolución de fibroína y diálisis para extraer las diferentes sales que quedan durante el proceso[1].

La preparación de capullos consistió en escogerlos y separarlos por su aspecto, la mayoría presentaba buenas características visuales, debido a que fueron comprados en la Corporación CORSEDA que se dedica exclusivamente a la producción de este producto y tienen un proceso estandarizado. Los capullos se cortaron en trozos pequeños con el fin de favorecer el resto del proceso, algunos capullos presentaron manchas internas por lo que fue retirada la capa más interna del capullo antes de continuar la separación de las proteínas.

Para separar las dos proteínas, sericina y fibroína, que contienen los capullos se debe hacer un proceso conocido como desgomado, debido a que la característica de la sericina es unir las fibras con una especie de goma. Para realizar este proceso se preparó una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3), con una relación molar de 1:1000, esta solución acuosa se llevó a agitación magnética con una temperatura entre los 75 °C y 80 °C, lentamente se adicionaron los trozos de capullo en la solución hasta sumergirlos completamente, se dejó una hora a esta temperatura y manteniendo el mismo nivel de RPM, posteriormente la seda que ya se puede observar en fibras, fue retirada de la solución la cual contiene la sericina producto del desgomado, esta solución fue almacenada para posteriormente realizar un proceso de diálisis, las fibras son lavadas manualmente con agua destilada aproximadamente durante 3 veces para retirar la sericina en su totalidad, y se dejó secar a temperatura ambiente durante un día.

Para realizar la disolución de la fibroína se preparó una solución de 1:8:2 molar de CaCl_2 marca PanReac, agua destilada y etanol al 99% de pureza marca SIGMA ALDRICH; esta solución se debe tener a una temperatura menor de 60 °C, y debido a que la reacción presentada es exotérmica se debe mantener un termómetro en la solución y verificar que no se exceda esta temperatura, cuando se logró mantener la temperatura se adicionó la fibroína desgomada, y se procedió a dejarlo en agitación magnética hasta lograr que la seda se disolviera por completo y fuera una solución homogénea.

Debido a que la solución de fibroína y sericina obtenidas quedan cargadas de sales por los anteriores procesos, se debe realizar un proceso de diálisis, para lo cual se usaron membranas de acetato de celulosa usadas en la industria alimentaria [15], estas membranas se recortaron en un tamaño aproximado de 20 cm y se llenaron con las diferentes soluciones, las membranas llenas se sumergieron en un recipiente con agua destilada, la cual fue cambiada cada 2 horas durante las primeras 12 horas, posteriormente se disminuyó el cambio de agua a 5 horas durante 24 horas y por último dos veces al día hasta completar 3 días del proceso, para que se dé un intercambio iónico óptimo se deben asegurar las membranas al fondo del recipiente para que estén completamente sumergidas en el agua destilada, se controló el proceso de remoción de

sales mediante la medición de la conductividad del agua, usando el equipo HACH sesION 5, teniendo una muestra de agua destilada como patrón, cuando el agua usada en los procesos de diálisis llegaba al valor de la conductividad del agua destilada, se concluía la diálisis. La figura 1 permite observar la metodología seguida para la extracción de fibroína y sericina.

Por último se procedió a concentrar la soluciones de fibroína y sericina al 2.6 % w/v y 0.5 % w/v respectivamente, estos fueron los porcentajes definidos para trabajar puesto que la soluciones se obtienen muy cercanos a estos valores, existen diferentes estudios donde se trabajan con valores similares, aunque alguno llegan hasta un 20% w/v de fibroína [2], [3], esta proteína se prefiere llevar primero a un estado sólido o en polvo puesto que se puede disolver y trabajar con porcentajes más elevados de esta proteína sin el inconveniente del punto de gelificación que esta presenta [4], [5], sin embargo como en este trabajo el polímero estaba en solución, se trabajó por debajo del punto de gelificación, para llegar a estas concentraciones se debe conocer la concentración de las soluciones, debido a que al finalizar el proceso de extracción esta concentración es desconocida, por lo tanto, se retiró 1 mL de la solución y se vertió en un vidrio reloj y se puso secar en estufa a 35 °C, se pesó el vidrio reloj solo y luego del secado, se sacó la diferencia entre ellos y se dividió por la cantidad en mL usados y se obtuvo la concentración, este procedimiento se hizo por triplicado.

Después de realizar este proceso se obtenían concentraciones de 2 a 2.3 % w/v para la fibroína y 0.2% a 0.23% w/v para la sericina, se debían entonces concentrar los polímeros para llegar a las concentraciones antes mencionadas, para esto se usó la siguiente ecuación:

$$C_1V_1=C_2V_2 \text{ Ecuación 1}$$

Para llegar a estos valores la fibroína se calentó a 70 °C si bien la temperatura de degradación para la fibroína se registra entre los 266–300 ° C [6], [7], se trabajó a 70 °C para mantener los parámetros similares al proceso de obtención, se usó esta

temperatura con el fin de no desnaturalizar la proteína, la sericina se llevó a 94 °C si bien varios estudios realizan el proceso de desgomado a 120 °C en autoclave [8], otros autores informan que a temperaturas mayores a 100 °C la proteína puede degradarse [9], por el proceso de evaporación se elimina el agua y se deja el polímero con una concentración mayor.

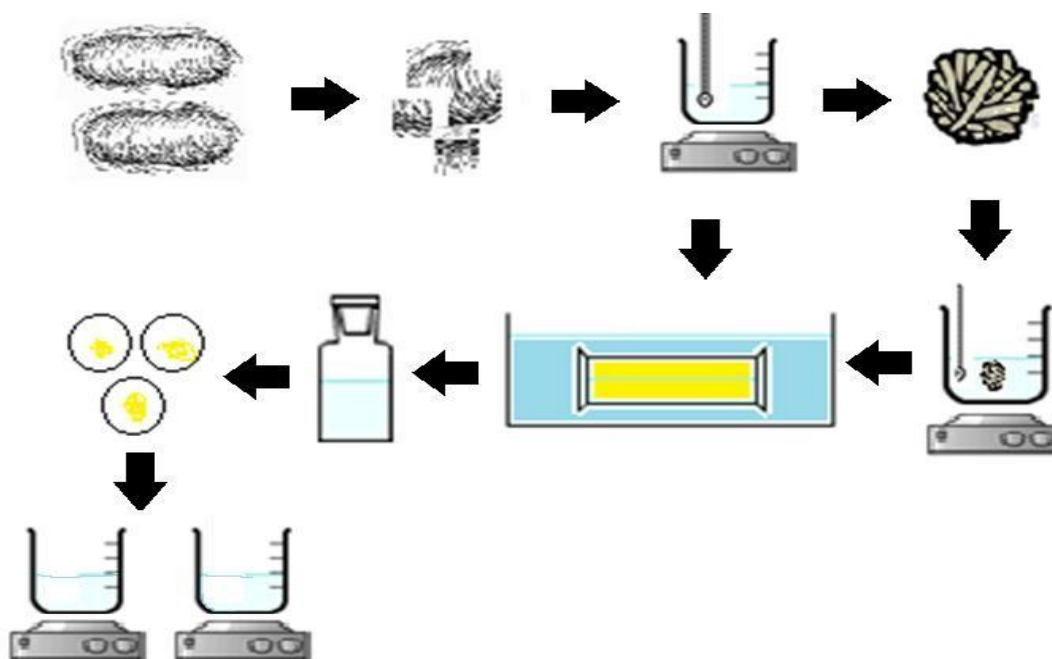


Figura 1 Metodología para la extracción de la fibroína y sericina.

4.2.2. Caracterización

4.2.2.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Con la finalidad de determinar los grupos funcionales y componentes principales de la fibroína y la sericina extraída, se procedió a realizar un análisis infrarrojo de una porción de un scaffold de fibroína y sericina mediante ATR usando un equipo SHIMATZU IR-TRACER 100 en un rango de barrido entre 400 y 4000 cm^{-1} y un número de ciclos de 24.

4.2.2.2. Espectroscopia de UV-Vis

Las soluciones obtenidas se les realizó un barrido en el equipo de UV-VIS MAPADA 3200 PC en longitudes de onda entre 300 y 600 nm. El objetivo del análisis fue observar la longitud de onda donde se presenta la mayor absorbancia.

4.3 Resultados y análisis

4.3.1. Concentración de las soluciones de fibroína y sericina

De las tablas 1 y 2, las cuales muestran los porcentajes obtenidos en las diferentes extracciones tanto para fibroína como para sericina, se puede observar que el método de extracción es reproducible puesto que se generan valores muy cercanos, además se puede comprobar que usando la ecuación 1 se tienen los porcentajes esperados, cumpliendo así que independientemente el lote de capullos se puede llegar a una concentración final idónea para diferentes aplicaciones, esto es importante puesto que la materia prima para la obtención de los polímeros naturales, no siempre tiene las mismas condiciones, lo que hace que varíen las concentraciones obtenidas en las soluciones, aunque se utilicen protocolos estandarizados.

Tabla 1 obtenidos en cada extracción para la fibroína.

Extracción	Porcentaje inicial w/v	Porcentaje final w/v
1	2.23	2.62
2	2.12	2.61
3	1.97	2.58
4	2.3	2.6
5	2.33	2.63
6	1.98	2.57
7	2	2.61

Tabla 2 Porcentajes obtenidos en cada extracción para la sericina.

Extracción	Porcentaje inicial w/v	Porcentaje final w/v
1	0.23	0.52
2	0.29	0.53
3	0.25	0.48
4	0.35	0.49
5	0.39	0.47
6	0.28	0.54

7	0.32	0.52
---	------	------

En la figura 2 se pueden observar las dos soluciones obtenidas tanto la de fibroína como la de sericina, se evidencia que la primera tiene un color más blanco que la sericina que tiende a ser traslucido, esto se puede deber al porcentaje de concentración de cada solución; cabe resaltar que la sericina no se puede llevar a porcentajes mayores del 1% debido a que tiende a gelarse y entre más concentración se acelera más este proceso [9]; por otro lado, la solución de fibroína cuando no se le realiza el proceso de diálisis adecuadamente tiende a volver a su estructura de láminas beta, este fenómeno también sucede cuando en el proceso de disolución de la proteína en la solución ternaria con cloruro de calcio no se tiene un control de temperatura y de la agitación de la solución. Ambas proteínas pueden almacenarse a temperaturas de -4°C , sin embargo la fibroína tiende a desnaturizarse en menor tiempo, la sericina en cambio puede ser almacenada por más de 4 meses sin perder sus propiedades, esto se vio reflejado en los ensayos de UV-Vis, en donde para 4 meses se obtenía el mismo espectro de la proteína inicial.

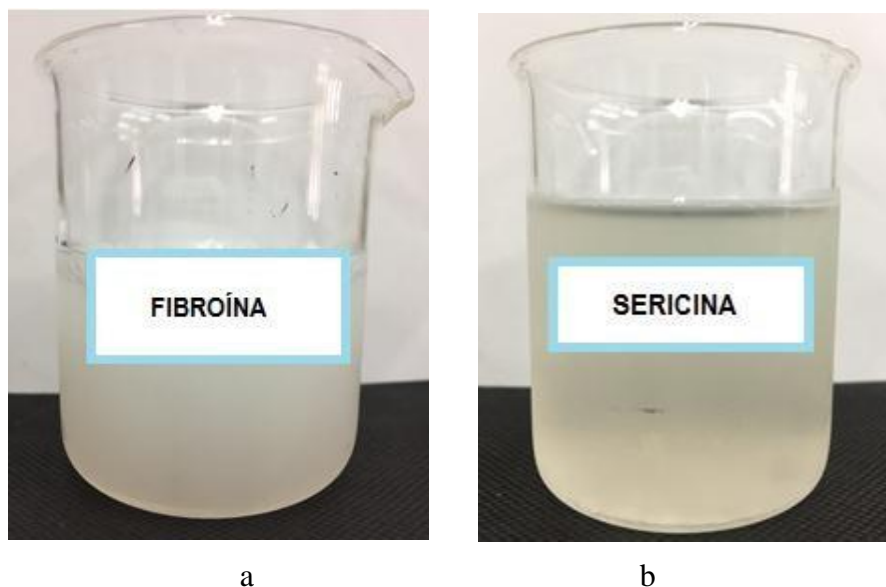


Figura 2 Soluciones obtenidas de a. fibroína al 2.6 % w/v; b. Sericina al 0.5% w/v

En la figura 3 y 4 se muestran los scaffolds los cuales se realizaron tomando 20 ml de las soluciones obtenidas de fibroína y sericina y posteriormente se llevaron a liofilización durante aproximadamente por 24 horas en el equipo Labconco 2.5 L, con estos se realizó

la técnica de FTIR, se observa que la fibroína produce scaffolds mucho más compactos con respecto al scaffold obtenido con sericina, puesto que se evidenció que los scaffolds de sericina eran más livianos y además se deshacían al tacto, identificándose una baja resistencia mecánica, esto puede deberse a que la fibroína está en mayor concentración en la solución inicial.



Figura 3. Scaffold de sericina.



Figura 4 Scaffold de fibroína.

4.3.2. Espectroscopia de UV-Vis para fibroína y sericina

En la figura 5 se muestra el espectro UV-Vis de la solución de fibroína, se logra apreciar un pico a los 268 nm, asociado a la excitación de los aminoácidos tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) [10], presentes en la estructura de la fibroína [11].

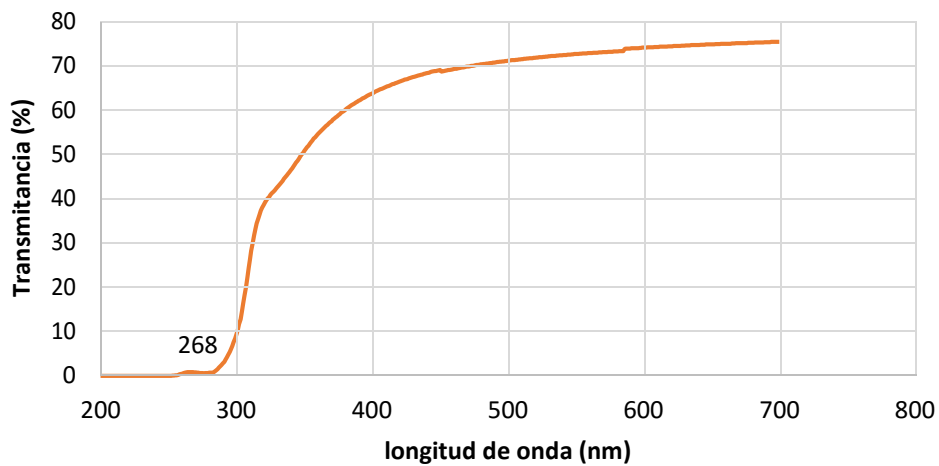


Figura 5 Espectro UV-Vis de la fibroína en transmitancia.

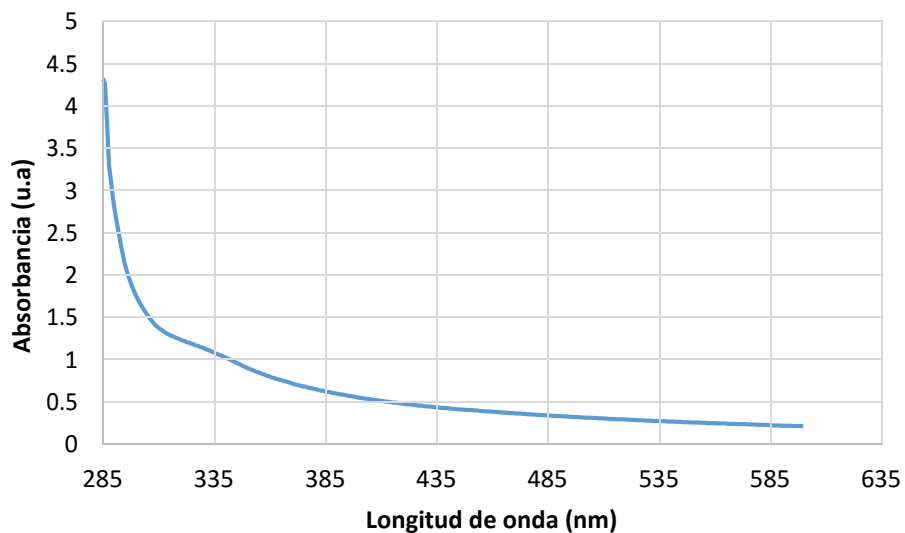


Figura 6 Espectro UV-Vis de la fibroína en absorbancia.

Para confirmar la presencia de fibroína en la solución se realizó el análisis de UV-Vis pero mediante absorbancia, dando como resultado el espectro de la figura 6, donde se evidencia una absorción con un amplio pico entre los 290 y 350 nm, esto se atribuye a los aminoácidos aromáticos entre ellos se encuentran la tirosina, fenilalanina y triptófano, aminoácidos presentes en la cadena que conforma la seda [12], el anterior análisis tanto para los espectros en absorbancia y transmitancia, informa de la presencia

de aminoácidos presentes en la seda, sin embargo se debe realizar otra técnica como el FTIR para confirmar esta información.

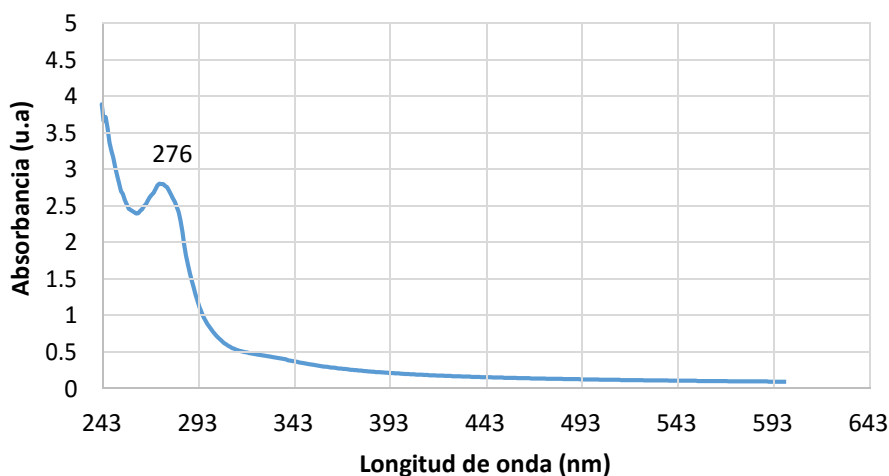


Figura 7 Espectro UV-Vis de la sericina en absorbancia.

El espectro de UV-Vis de la sericina se presenta en la figura 7, se observa un pico a los 276 nm, se estima que este pico corresponde a los aminoácidos aromáticos de la sericina los cuales se encuentran en la región de 260 a 290 nm [13], varios estudios registran que este valor de longitud de onda es característico de sericina pura [14].

Se pudo observar que mediante la espectroscopia de UV-Vis, los elementos cromóforos que absorben son los aminoácidos aromáticos, sin embargo estos no son los de mayor porcentaje en estos polímeros pero si están presentes en su estructura, se muestra con este pico que corresponde a estos aminoácidos, además que para cada polímero se presentan curvas diferentes en absorbancia, esto indica que hay más presencia de aminoácidos aromáticos en la sericina que en la fibroína, se registra que el tercer aminoácido en importancia en la composición de la fibroína es la tirosina (Tyr), este aminoácido está en las tres capas que conforman la sericina y al calentar la solución de sericina a 94 °C se abren las capas que conforman su estructura y se llega a la capa más interna, teniendo así una sericina más concentrada, es por esto que se registra un pico tan marcado para la presencia de este aminoácido [15], [16].

4.3.3. Espectroscopia de FT-IR de fibroína y sericina

La figura 8 muestra el espectro FTIR de la fibroína, donde se logran evidenciar cuatro bandas características de la fibroína una de ellas es debido a los OH a los 3288 cm^{-1} , para la amida I la región está entre los 1600 y 1700 cm^{-1} , se puede notar como esta amida está presente en la banda de 1640 cm^{-1} esta banda está relacionada con los estiramiento de C=O, e involucra estructuras secundarias como hélice α , laminas β , entre otras. La siguiente banda característica se encuentra alrededor de los 1550 cm^{-1} y corresponde a la amida II, se observa en la figura 8 que esta banda se encuentra en los 1524 cm^{-1} , lo que indica la presencia de esta amida, esta corresponde a la deformación angular del grupo N-H en un 60% y el estiramiento C-N en un 40%, la última banda relacionada con la amida III que se espera encontrar entre los 1230 y 1300 cm^{-1} , se observa que se obtiene en 1236 cm^{-1} , esto se debe a la combinación del estiramientos N-C y las vibraciones de flexión del grupo C=O, en donde la estructura que se asocia a esta banda es la conformación de láminas β [17]–[22].

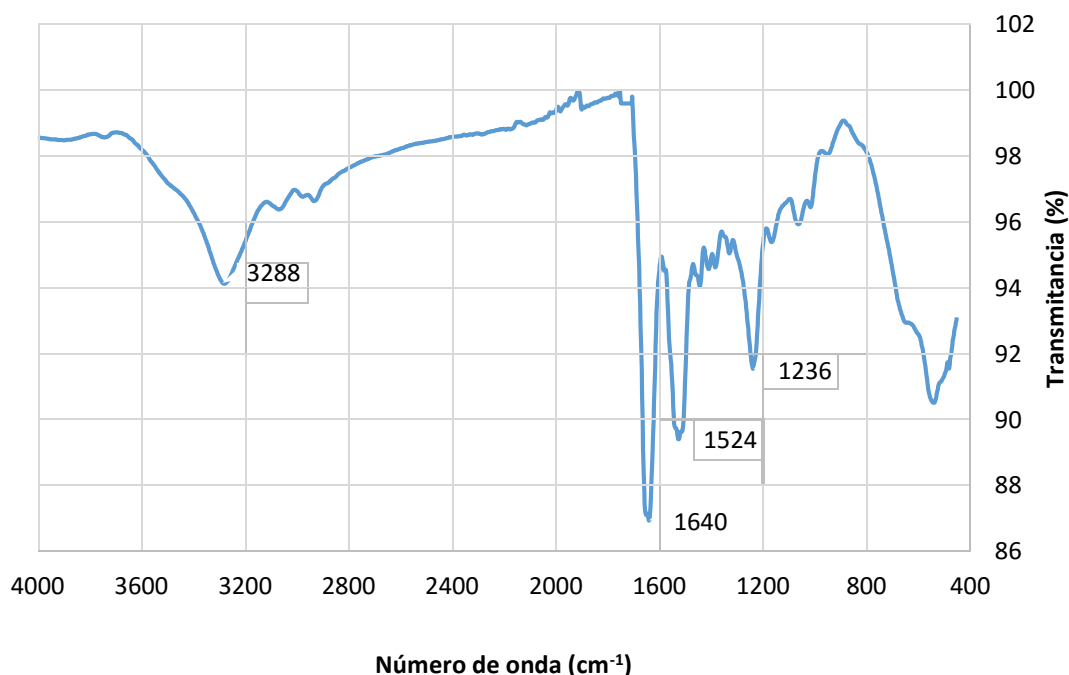


Figura 8 Espectro FTIR de la fibroína.

Los resultados obtenidos en el FTIR y en el UV-Vis, demuestran el procedimiento para extraer la fibroína se realizó adecuadamente, puesto que es evidente la presencia de este polímero en la solución obtenida.

Al igual que para la fibroína el espectro de FT-IR de sericina que se observa en la figura 9, muestra una banda alrededor de los 3274 cm^{-1} la cual se genera por los grupos hidroxilos (OH), para la sericina también se registran tres bandas características las cuales son la amida I la cual oscila entre los 1650 cm^{-1} a 1630 cm^{-1} , se puede evidenciar en la figura 9 que esta banda se registra a los 1644 cm^{-1} , esta banda se da debido a los estiramientos de los grupos carbonilos C=O, para las amidas II la banda característica oscila entre 1540 cm^{-1} a 1520 cm^{-1} se nota que esta banda se presenta alrededor de los 1530 cm^{-1} , esta banda se produce por la flexión de los grupos N-H, para las amidas III la banda está entre 1270 cm^{-1} a 1230 cm^{-1} , en el espectro esta banda se presenta alrededor de los 1244 cm^{-1} , esta se genera debido al estiramiento del enlace C-N, estas bandas dan cuenta que si la banda de amida I se presenta a los 1650 cm^{-1} existe una estructura en espiral aleatoria y si se da a 1630 cm^{-1} la estructura será de láminas β , para la amida II si se da a los 1540 cm^{-1} la estructura es de espiral aleatoria y si se da a los 1520 cm^{-1} la estructura es de lámina β , por último para la amida III si la banda se da a los 1270 cm^{-1} la estructura es de hoja beta y si se da a los 1230 cm^{-1} es de bobina aleatoria, según los resultados obtenidos se evidencia una leve tendencia a formar estructuras de bobinas aleatorias [18], [23]–[27].

Según los resultados obtenidos para la sericina se puede confirmar que la solución obtenida contiene sericina, además según los resultados obtenidos mediante el UV-Vis se puede presumir que el principal componente de la solución obtenida es sericina, esto se puede deber al proceso de concentrar la proteína en la solución.

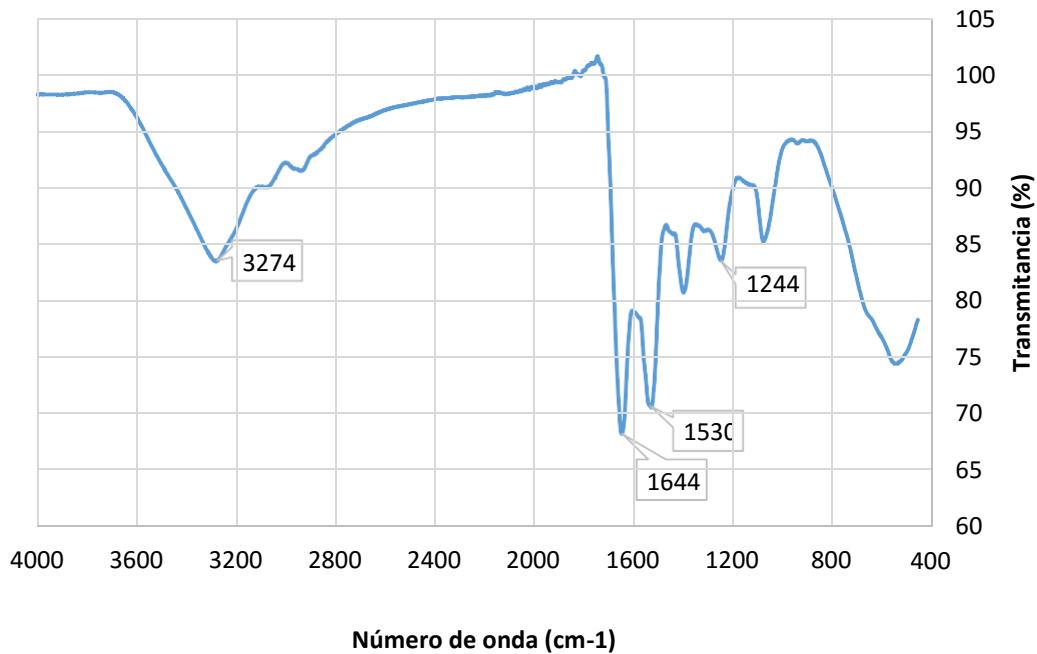


Figura 9 Espectro FTIR de la sericina.

Conclusiones

- Se logró obtener fibroína usando el protocolo desarrollado en el grupo de investigación BIOMAT, verificando la estandarización de este. Además, se desarrolló un proceso de extracción de sericina usando desgomado y diálisis; en ambos polímeros se pudo estandarizar el contenido final del polímero en la solución mediante la evaporación de agua.
- Según los resultados obtenidos de porcentaje del polímero en la solución y los análisis UV-Vis y FTIR, se puede afirmar que los protocolos seguidos para la extracción de fibroína y sericina son reproducibles.
- La presencia de las aminas I, II y III, identificadas en los espectros FTIR, permiten confirmar la presencia de los polímeros en las diferentes soluciones.
- Mediante la técnica de UV-Vis se pudo determinar la presencia de algunos aminoácidos que conforman la fibroína y sericina de seda.

Bibliografía

- [1] E. E. Correa, D. O. G. Lopera, S. G. Restrepo, and C. P. Ossa-Orozco, "Effective sericin-fibroin separation from Bombyx mori silkworms fibers and low-cost salt removal from fibroin solution," *Rev. Fac. Ing.*, 2020.

- [2] M. G. Mehrabani *et al.*, "Chitin/silk fibroin/TiO₂ bio-nanocomposite as a biocompatible wound dressing bandage with strong antimicrobial activity," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018.
- [3] J. Liu *et al.*, "Controlled-release neurotensin-loaded silk fibroin dressings improve wound healing in diabetic rat model," *Bioact. Mater.*, 2019.
- [4] S. Gilotra, D. Chouhan, N. Bhardwaj, S. K. Nandi, and B. B. Mandal, "Potential of silk sericin based nanofibrous mats for wound dressing applications," *Mater. Sci. Eng. C*, 2018.
- [5] S. Chao *et al.*, "Synthesis and characterization of tigecycline-loaded sericin/poly(vinyl alcohol) composite fibers via electrospinning as antibacterial wound dressings," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 44, no. February, pp. 440–447, 2018.
- [6] J. P. Quiñones, C. Roschger, A. Zierer, C. Peniche, and O. Brüggemann, "Steroid-grafted silk fibroin conjugates for drug and agrochemical delivery," *Eur. Polym. J.*, 2019.
- [7] R. Arthe, D. Arivuoli, and V. Ravi, "Preparation and Characterization of bioactive Silk Fibroin / Paramylon Blend Films for chronic wound healing," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.
- [8] C. Álvarez, C. Arredondo, A. E. Casas, M. M. Cardona, G. A. Hincapié, and A. Restrepo-osorio, "Caracterización de sericina obtenida a partir de aguas de desengomado de seda natural Characterization of sericin obtained from water degumming natural silk," *Prospectiva*, 2013.
- [9] M. J. Jang and I. C. Um, "Effect of sericin concentration and ethanol content on gelation behavior, rheological properties, and sponge characteristics of silk sericin," *Eur. Polym. J.*, 2017.
- [10] R. S. Pugina, E. G. da Rocha, S. J. L. Ribeiro, and J. M. A. Caiut, "Study of the energy transfer process in rare earth-doped silk fibroin for future application in luminescent compounds," *J. Lumin.*, vol. 205, no. September 2018, pp. 423–428, 2019.
- [11] A. D. Rios Osorio, C. Alvarez-López, L. J. Cruz Riaño, and A. Restrepo-Osorio, "Revisión: Fibroína de seda y sus potenciales aplicaciones en empaques biodegradables para alimentos/Review: silk fibroin and their potential applications on biodegradable food packaging," *Prospectiva*, vol. 15, no. 1, pp. 7–15, 2017.
- [12] A. Sionkowska and A. Planecka, "The influence of UV radiation on silk fibroin," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 96, no. 4, pp. 523–528, 2011.
- [13] G. Tao *et al.*, "Bioinspired design of AgNPs embedded silk sericin-based sponges for efficiently combating bacteria and promoting wound healing," *Mater. Des.*, vol. 180, p. 107940, 2019.
- [14] D. Kathiravan, B. R. Huang, A. Saravanan, A. Prasannan, and P. Da Hong, "Highly enhanced hydrogen sensing properties of sericin-induced exfoliated MoS₂ nanosheets at room temperature," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 279, no. August 2018, pp. 138–147, 2019.
- [15] S. Greiff, H. Kutzke, C. Riekkel, P. Wyeth, and S. Lahlil, "Surveying silk fibre

degradation by crystallinity determination: a study on the Tang-Dynasty silk treasure from Famen temple, China,” *Sci. Anal. Anc. Hist. Text. Informing Preserv. Disp. Interpret.*, no. Koch, pp. 38–43, 2005.

[16] X. Dong, S. Zhao, X. Yin, H. Wang, and Z. Wei, “Silk sericin has significantly hypoglycaemic effect in type 2 diabetic mice via anti-oxidation and anti-inflammation,” *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.

[17] S. Patil and N. Singh, “Antibacterial silk fibroin scaffolds with green synthesized silver nanoparticles for osteoblast proliferation and human mesenchymal stem cell differentiation,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 176, no. September 2018, pp. 150–155, 2019.

[18] J. Sparkes and C. Holland, “The rheological properties of native sericin,” *Acta Biomater.*, vol. 69, pp. 234–242, 2018.

[19] M. M. Sayed *et al.*, “Enhancing mechanical and biodegradation properties of polyvinyl alcohol/silk fibroin nanofibers composite patches for Cardiac Tissue Engineering,” *Mater. Lett.*, vol. 255, p. 126510, 2019.

[20] C. M. Srivastava, R. Purwar, and A. P. Gupta, “Enhanced potential of biomimetic, silver nanoparticles functionalized *Antheraea mylitta* (tasar) silk fibroin nanofibrous mats for skin tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 437–453, 2019.

[21] J. P. Kumar and B. B. Mandal, “Antioxidant potential of mulberry and non-mulberry silk sericin and its implications in biomedicine,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 108, no. May, pp. 803–818, 2017.

[22] L. C. P. Araújo, J. M. de Oliveira Júnior, and N. Aranha, “Síntese e caracterização de scaffolds de fibroína,” *Matéria (Rio Janeiro)*, vol. 23, no. 4, 2018.

[23] M. He *et al.*, “Preparation of a bio-composite of sericin-g-PMMA via HRP-mediated graft copolymerization,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 117, pp. 323–330, 2018.

[24] L. K. H. Rocha *et al.*, “Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications,” *Process Biochem.*, vol. 61, no. June, pp. 163–177, 2017.

[25] G. Tao *et al.*, “Bioinspired design of AgNPs embedded silk sericin-based sponges for efficiently combating bacteria and promoting wound healing,” *Mater. Des.*, 2019.

[26] G. Tao *et al.*, “Design and performance of sericin/poly(vinyl alcohol) hydrogel as a drug delivery carrier for potential wound dressing application,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 101, no. September 2017, pp. 341–351, 2019.

[27] D. Bhuyan, G. W. Greene, and R. K. Das, “Dataset on the synthesis and physicochemical characterization of blank and curcumin encapsulated sericin nanoparticles obtained from *Philosamia ricini* silkworm cocoons,” *Data Br.*, vol. 26, p. 104359, 2019.

CAPÍTULO V: FABRICACIÓN DE PELÍCULAS DE FIBROÍNA Y SERICINA

5.1. Introducción

En este capítulo se elaboraron películas de fibroína y sericina, mezcladas con polivinil alcohol PVA con peso molecular de 120 a 130 kDa, se variaron en porcentajes 1:1, 2:1, 3:1 en relación v/v, variando la cantidad de la solución de sericina y fibroína. Para la obtención de las películas se realizaron diferentes metodologías, el primer ensayo consistió en elaborar las películas mezclando las soluciones de fibroína con PVA y sericina con PVA, posteriormente se secaron en horno, se obtuvieron películas quebradizas al tacto, por esto se adiciono a la mezcla de los polímeros un plastificante el cual fue glicerol en 50% w/w con respecto a la concentración de fibroína y sericina respectivamente, y se llevaron a secado en estufa se notó que se disminuía la separación de fases sin embargo la resistencia mecánica era reducida, por esto se optó por realizar un ciclo de congelamiento puesto que se registra que esto mejora propiedades mecánicas del PVA, fue evidente que no hubo separación de fases y la resistencia mecánica mejoro considerablemente, se eligió la película con mejores características tanto en el ensayo de tracción, como por su morfología y degradabilidad y mojabilidad, siendo la composición sericina/PVA sin glicerol y fibroína/PVA con glicerol.

5.2. Materiales y métodos

Para la elaboración de las películas de fibroína y sericina, se partió de las soluciones obtenidas de fibroína al 2.6 % w/v y sericina al 0.5 % w/v, se disolvió el polivinil alcohol (PVA) marca SIGMA ALDRICH al 99%, a una concentración de 5% w/v, este polímero se adicionó como se mencionó anteriormente el PVA mejora las propiedades mecánicas de las películas, se procedió a realizar mezclas de las soluciones de los polímeros en porcentaje volumen/volumen, en las proporciones 1:1, 2:1 y 3:1, variando la relación en volumen de fibroína o sericina y dejando constante el porcentaje de PVA, es decir una película 1:1 contiene 50 % en volumen de la solución de fibroína o sericina y 50 % en volumen de la solución de PVA. La nomenclatura seguida para las películas se presenta en la tabla 1. También se adicionó glicerol como plastificante en una concentración de

50% en relación w/w con respecto a la concentración de los polímeros. La mezcla final de cada concentración se vertió en moldes de 14 ml y los cuales se secaron en una estufa Binder a 40 °C, este proceso se denominó metodología 1. El esquema del procedimiento implementado para la elaboración de las películas se observa en la Figura 1.

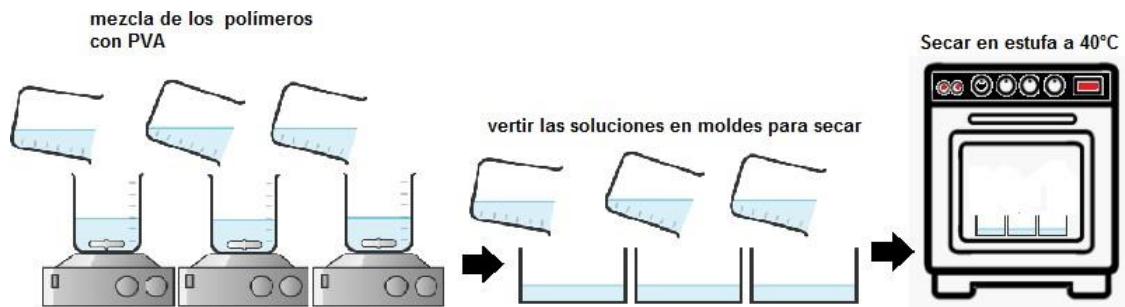


Figura 1 Esquema de la metodología 1 de procesamiento las películas secadas en horno.

Con el objetivo de evaluar el proceso de congelamiento en el cambio de las propiedades del PVA y a su vez en las películas, se propuso una metodología 2, en la cual se realizó un ciclo de congelamiento, siguiendo el mismo procedimiento de la metodología 1, no obstante antes de ser secadas en estufa, las películas se congelaron a -4 °C durante dos horas, posteriormente fueron llevadas a secado en estufa en las mismas condiciones del primer proceso, el esquema el método seguido se observa en la figura 2.

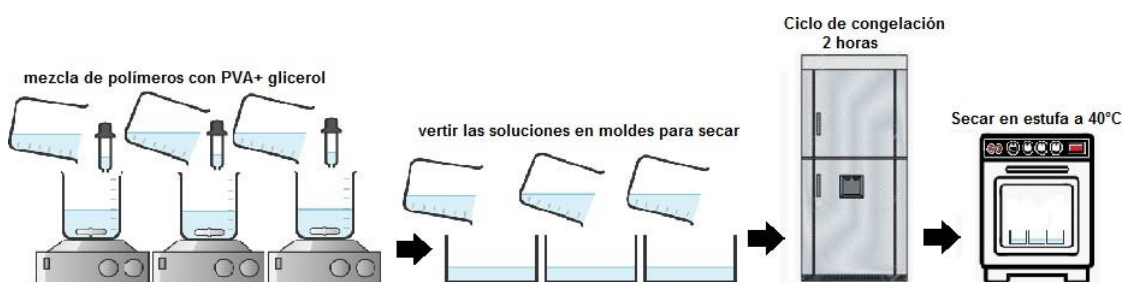


Figura 2 Esquema de la metodología 2 de procesamiento de las películas con ciclo de congelamiento.

La nomenclatura usada se muestra en la tabla 1.

Tabla 1 **Composición y nomenclatura de las películas fabricadas.**

Nomenclatura		Observación
Fibroína o sericina	PVA	A las películas se les varió la fibroína o sericina en proporciones v/v con respecto a la solución de PVA
1	: 1	
2	: 1	
3	: 1	
1:1 SG		La abreviación SG, significa que las películas no poseen adición de glicerol
2:1 SG		
3:1 SG		
1:1 CG		La abreviación CG, significa que las películas tienen adición de glicerol
2:1 CG		
3:1 CG		
1:1 SG SC		La abreviación SC significa que las películas no tienen ciclo de congelamiento
2:1 SG SC		
3:1 SG SC		
1:1 SG CC		La abreviación CC significa que las películas tienen ciclo de congelamiento
2:1 SG CC		
3:1 SG CC		

5.2.1. Caracterización

Para observar la morfología de las películas se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), este ensayo se realizó en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL-JSM 6490 LV, ubicado en la sede de investigación universitaria de la universidad de Antioquia, el cual opera con una aceleración de voltaje de 20 KV en aumentos de 50X, 2000X y 10000 X, con el fin de observar separación de fases, poros y homogenización en la superficie de las películas.

La mojabilidad de las películas se realizó por triplicado y fue medida en el equipo de ángulo de contacto DataPhysics OCA15, con un tamaño de gota de 0.5 uL, este ensayo

se realizó para observar si las películas obtenidas eran hidrofóbicas o hidrofílica, puesto que para la aplicación en apósitos estas deben ser hidrofílicas para que interactúen con el exudado de las heridas [1].

El ensayo de degradabilidad se realizó mediante la norma ASTM F1635-16, en donde se cortaron trozos de las películas de 1x1 cm, los cuales se sumergieron en una solución buffer de fosfato salino (PBS) y se llevaron a 40 °C en una incubadora CO₂ marca Incubator serie BPN, este ensayo se realizó por triplicado para cada una de las muestras y se analizaron periodos 1, 3 y 8 días, esto con el fin de observar como era la pérdida de masa de las películas en el tiempo simulando las condiciones a la que estarían expuestas.

El ensayo de tracción se realizó en una maquina universal de ensayos marca SHIMADZU AGSD 50 KN con una celda de carga de 5 Ton, bajo la norma ASTM D638, se cortaron las películas en trozos de 2 cm de ancho, 5 cm de largo, tenían un espesor de 0.5 mm aproximadamente, la velocidad de carga fue de 20 mm/min, este ensayo se hizo por triplicado para cada película, lo cual permitió ver el comportamiento a la tensión de las películas obtenidas, y sacar información relevante como el esfuerzo máximo y la deformación máxima que poseían las películas.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Fabricación de películas

En la figura 3 se observa como al aumentar el contenido de fibroína con respecto al PVA, se presenta una separación de fases de los dos polímeros tal como se señala en las figuras 3 y 4, lo que provoca que las películas fueran quebradizas al contacto, puesto que no existe una unión entre los componentes que genere buena resistencia mecánica. Este hecho lo reporto Dai et al. 2002 quienes reportaron que este fenómeno se presentaba porque el PVA funcionaba como matriz de la fibroína y no ocurrirá una interacción entre las moléculas de estos polímeros, **es por esto que a dichas formulaciones no se le realizaron los ensayos de tracción y mojabilidad**; optando por implementar el uso de un agente plastificante, el cual ayude a la interacción entre los grupos funcionales de ambos polímeros, lo que produce un cambio estructural

mejorando así propiedades mecánicas, debido a que el agente plastificante induce la aparición de interacciones entre los dos polímeros [2].

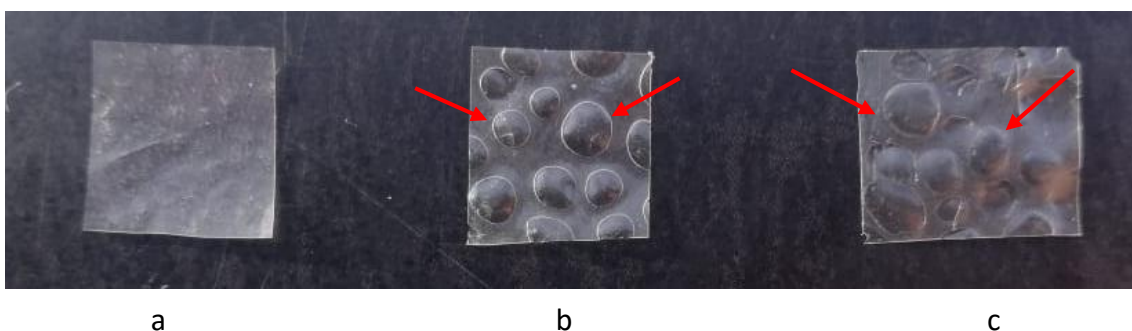


Figura 3 Películas de fibroína sin glicerol metodología 1 a. Fibroína 1:1 PVA v/v;
b. Fibroína 2:1 PVA v/v; c. Fibroína 3:1 PVA v/v.

En la figura 4 se nota como las películas al ser comparadas con las presentadas en la figura 3, muestran una disminución en la separación de fases con la adición de glicerol como plastificante, corroborando así lo descrito anteriormente sobre la actividad del glicerol en la interacción de los dos polímeros [2], aunque para las formulaciones 1:1, esta separación no se presenta y las películas se tornan homogéneas y lisas en la superficie, lo que puede deberse a la interacción de la fibroína y el PVA. En estudios anteriores reportados por Luo y colaboradores (2013) [3] se ha demostrado que la interacción del PVA con este polímero natural genera películas con buenas características y que son estables, que tienen potencial para el uso en aplicaciones médicas; no obstante, se puede presentar segregación en la mezcla y aparición de rugosidades, debido a que la fibroína tiene un alto peso molecular y tamaño, lo que puede obstruir la interacción molecular que se da con el PVA.

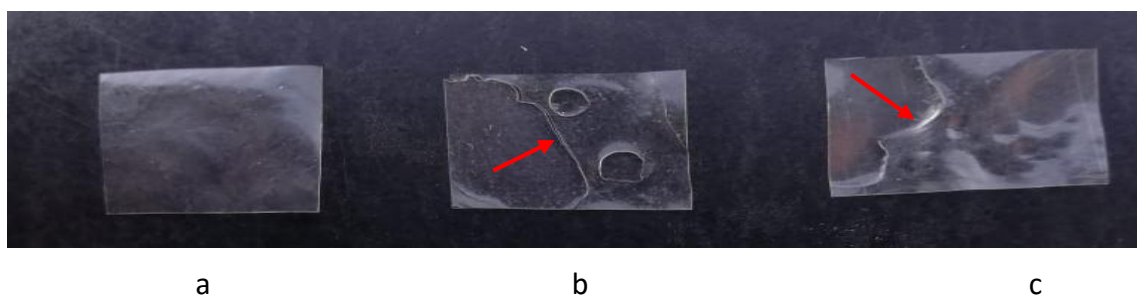


Figura 4 Películas de fibroína con glicerol metodología 1 a. Fibroína 1:1 PVA v/v;
b. Fibroína 2:1 PVA v/v; c. Fibroína 3:1 PVA v/v.

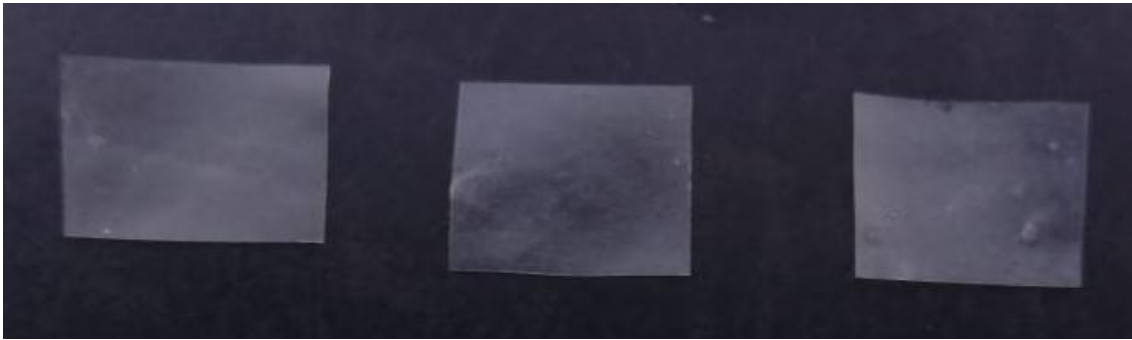
Estudios han demostrado que realizar ciclos de congelamiento sobre el PVA mejora la resistencia mecánica de hidrogeles a base de este [4], [5], es por esto que se decidió someter a un ciclo de congelamiento de dos horas a las películas y posteriormente secarlas en horno, se pudo evidenciar como se muestra en la figura 5, como se

disminuye la separación de fases, no obstante, se notó una aglomeración que fue más notoria en el porcentaje mayor de fibroína 3:1 (figura 5.c). No es claro si este fenómeno se presenta por el PVA o por la fibroína, sin embargo, como aparece en más proporción en las películas cuando se aumenta el porcentaje de fibroína puede dar idea que este comportamiento es por la aglomeración de dicho polímero. Con flechas rojas se señalan estructuras formadas en las películas que dan indicios de la cristalización que ocurrió durante el ciclo de congelamiento, debido al contacto con el aire frío de la muestra.



a b c
Figura 5 Películas de Fibroína congeladas sin cubrir a. Fibroína 1:1 PVA v/v; b. Fibroína 2:1 PVA v/v; c. Fibroína 3:1 PVA v/v.

Al observar los resultados de la figura 5, se optó por realizar el ciclo de congelamiento cubriendo las muestras dentro del congelador. Como se muestra en la figura 6 se evidencia como se mejoró la homogenización de la fibroína con el PVA sin rastros de aglomerados de la fibroína, obteniendo películas resistentes al tacto y sin separación de fases, esto da cuenta que la fibroína quedó distribuida de buena manera en toda la película. Se concluye que la mejor forma de obtener películas de fibroína/PVA es realizando ciclos de congelamiento, cubriendo las películas del aire frío y con la adición de glicerol como plastificante.



a

b

c

*Figura 6 Películas de fibroína congeladas y cubiertas a. Fibroína 1:1 PVA v/v;
b. Fibroína 2:1 PVA v/v; c. Fibroína 3:1 PVA v/v.*

De la figura 7 a la 11, se presentan las diferentes películas obtenidas con sericina, realizando diferentes variaciones como el uso de glicerol como plastificante y ciclo de congelamiento, sin embargo se evidencia que las películas visualmente y al tacto tienen propiedades similares, exceptuando las que se sometieron a un ciclo de congelamiento sin ser cubiertas, figura 9, puesto que es notorio la aparición de una leve separación de fases (ver flechas rojas), esto debido a que a la proteína le pasa el mismo fenómeno que presentó las películas de fibroína al entrar en contacto directo con el frío de la nevera, es por esto que se descartó este ensayo. Es así como estos ensayos no son totalmente concluyentes, siendo necesario observar cómo es el comportamiento de las películas en los otros ensayos propuestos.

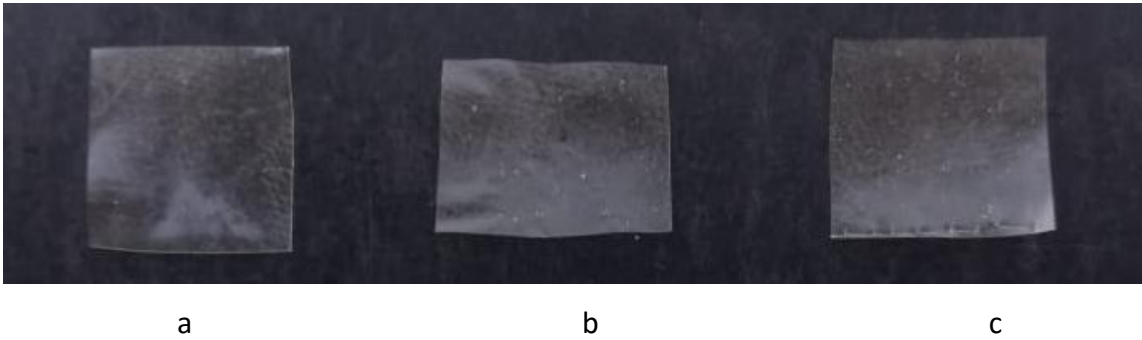


a

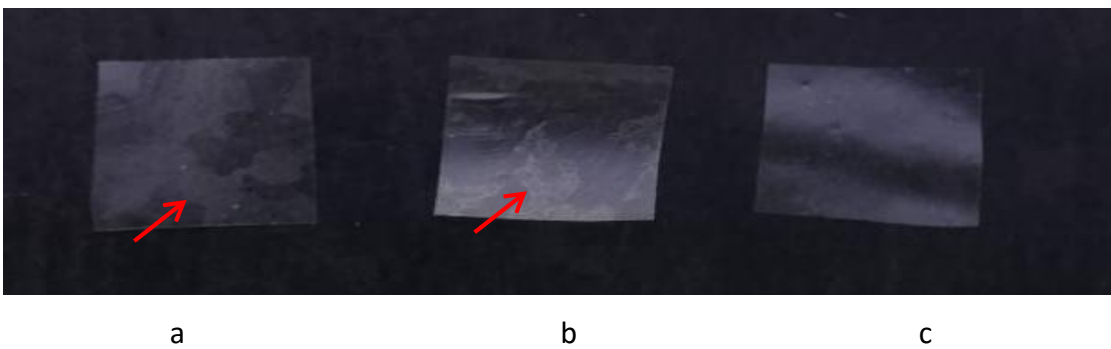
b

c

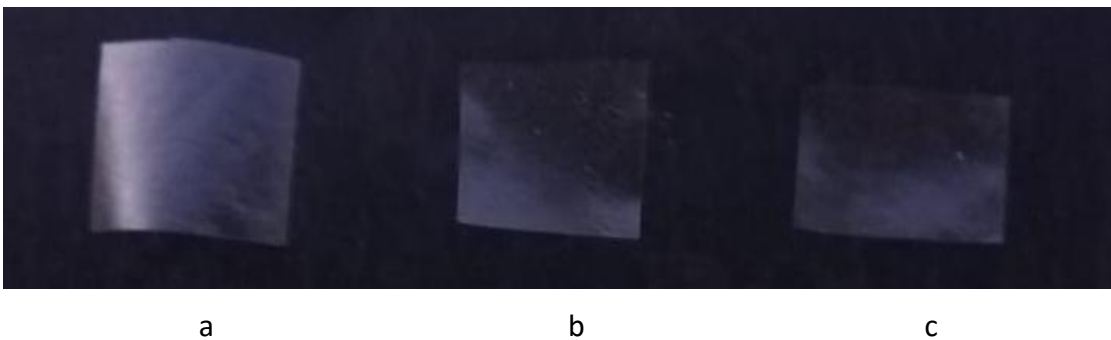
*Figura 7 Películas de sericina sin glicerol y sin congelar a. sericina 1:1 PVA v/v;
b. sericina 2:1 PVA v/v; c. sericina 3:1 PVA v/v.*



*Figura 8 Películas de sericina con glicerol y sin congelar a. sericina 1:1 PVA v/v;
b. sericina 2:1 PVA v/v; c. sericina 3:1 PVA v/v.*



*Figura 9 Películas de sericina congeladas sin cubrir a. sericina 1:1 PVA v/v;
b. sericina 2:1 PVA v/v; c. sericina 3:1 PVA v/v.*



*Figura 10 Películas de sericina sin glicerol y congeladas cubiertas a. sericina 1:1 PVA
v/v; b. sericina 2:1 PVA v/v; c. sericina 3:1 PVA v/v.*

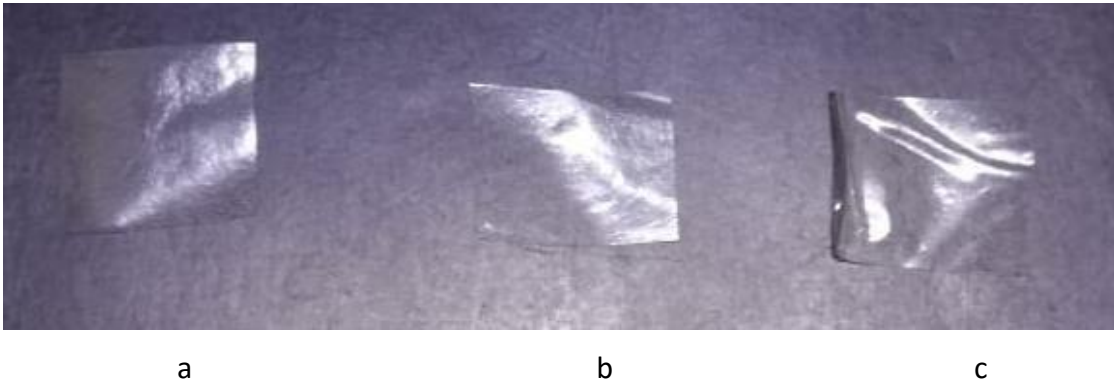


Figura 11 Películas de sericina con glicerol y congeladas cubiertas a. sericina 1:1 PVA v/v; b. sericina 2:1 PVA v/v; c. sericina 3:1 PVA v/v.

5.3.2. Evaluación morfológica de las películas

En la figura 12 se presentan las imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) a 2000 X de las películas de fibroína/PVA relación 1:1 v/v, no se logra evidenciar una diferencia entre los tratamientos esto debido al porcentaje de PVA, puesto que está en la misma proporción con respecto a la fibroína, se logra tener una superficie lisa y homogénea, exceptuando la micrografía de la figura 12.c, donde aparecen unos valles, los puntos blancos son partículas de calcio que no salieron en el proceso de diálisis, tal como lo confirma el EDS de la figura 12. d, si bien existen varios apósitos comerciales que entre sus componentes tienen calcio como por ejemplo el AlgiSite Ag, también a nivel científico se vienen estudiando la creación de apósitos con alginatos de calcio los cuales generan un intercambio iónico con los iones de sodio de las heridas ayudando a mantener húmeda la zona afectada [6][7], sin embargo se ha registrado que pacientes que han usado apósitos a base de algún elemento asociado al calcio han sufrido hipercalcemia debido a la interacción de la herida con el apósito [8], cabe resaltar que la concentración de estas partículas de calcio es muy baja en la película obtenida por lo cual no se esperaría que pase este fenómeno.

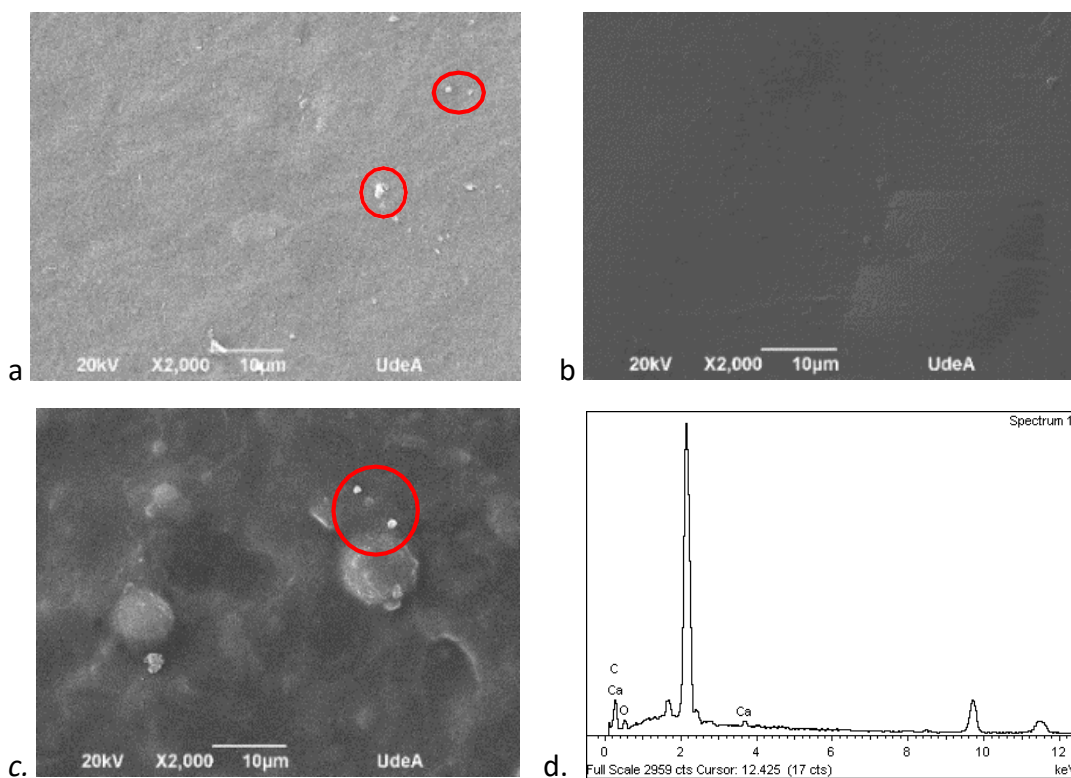


Figura 12 Micrografías SEM de las películas de a. fibroína 1:1 PVA v/v con glicerol sin ciclo de congelamiento b. fibroína 1.1 PVA v/v sin glicerol y sin ciclo de congelamiento c. fibroína 1.1 PVA v/v con glicerol y ciclo de congelamiento d. EDS puntos blancos en la película.

En la figura 13 se presentan las imágenes SEM de las películas de fibroína/PVA relación 2:1, se evidencia que las películas que no tienen el ciclo de congelamiento (figura 13.a y 13. b) presentan una separación de fases siendo más evidente en la película que no tiene glicerol, corroborando lo que se evidenciaba a nivel macro y reportado por [2], además se le nota una fisura lo que indica que el material en esta zona posee propiedades mecánicas bajas, mientras que las películas que poseen el ciclo de congelamiento se observa que existe una mejor homogenización (figura 13.b y 13.d), sin embargo la película que se sometió al ciclo de congelamiento sin ser cubierta presenta zonas donde se aglomero la proteína, al ser observadas en el SEM a 50X se puede notar como la película no es lisa sino rugosa, este comportamiento no se notó en la película que fue cubierta, en la literatura no se registra este detalle del procesamiento y por lo visto en la figura 5 esto se puede deber a la aglomeración de la fibroína.

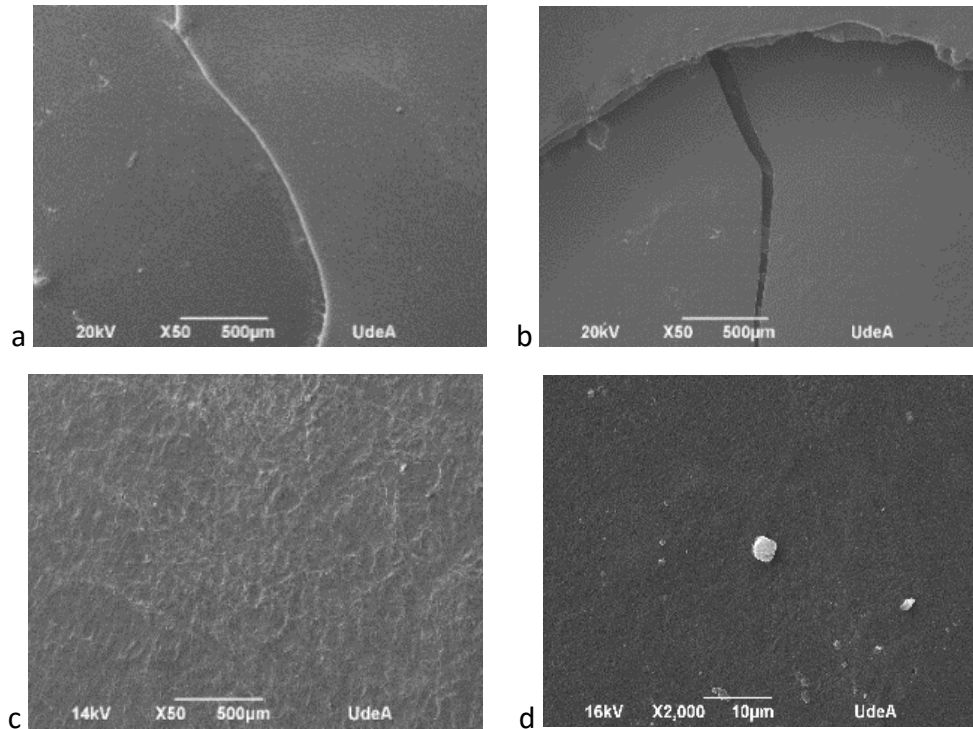


Figura 13 imágenes SEM de las películas de a. fibroína 2:1 PVA v/v con glicerol y sin ciclo de congelamiento; b. fibroína 2:1 PVA v/v sin glicerol y sin ciclo de congelamiento; c. fibroína 2:1 PVA v/v con glicerol y sin cubrir en ciclo de congelamiento; d. fibroína 2:1 PVA con glicerol y cubierta en ciclo de congelamiento.

En la figura 14 la cual corresponde a las películas de fibroína/PVA 3:1 v/v, se puede observar cómo hay una separación de fases en la película que no posee glicerol, que se asemejan a unos surcos dentro de ella, también se evidencia que la que posee glicerol y no tiene ciclo de congelamiento tiene una separación de fases casi imperceptible como se señala con la flecha roja, sin embargo el mejor resultado se obtiene cuando la película posee glicerol y además un ciclo de congelamiento generando una película totalmente homogénea en su superficie, este dato corrobora lo antes descrito con el efecto que tiene el ciclo de congelamiento para las películas de fibroína.

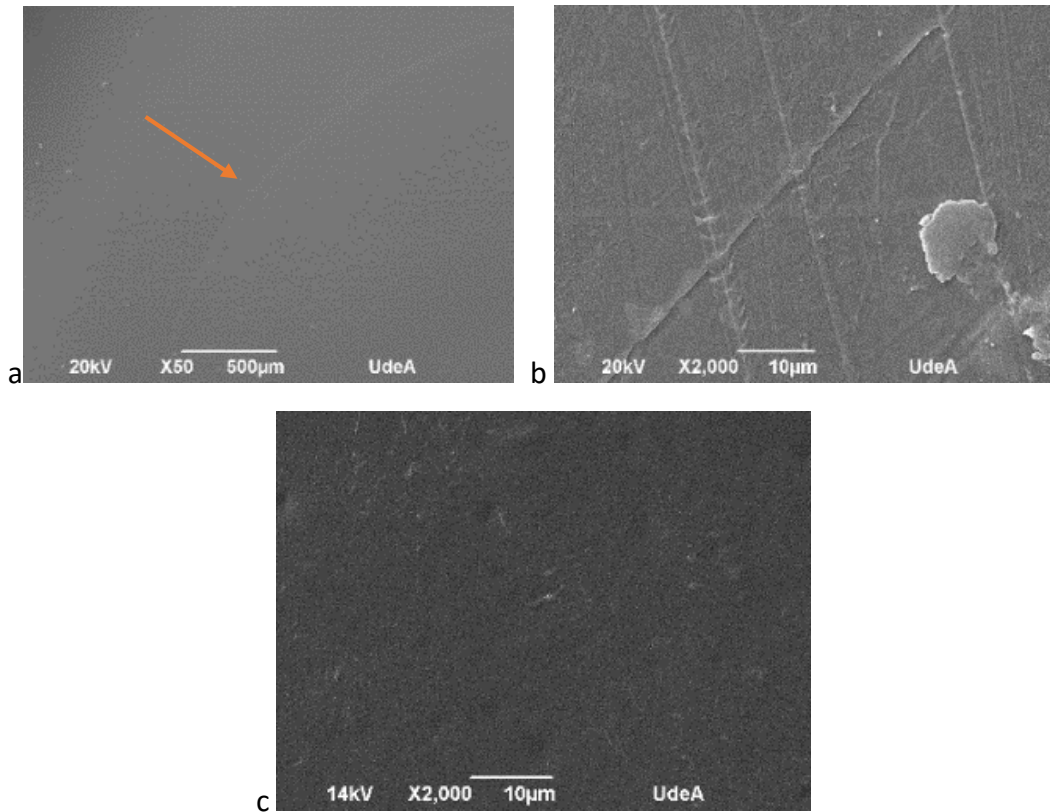


Figura 14 imágenes SEM de las películas de a. fibroína 3:1 PVA v/v con glicerol; b. fibroína 3.1 PVA v/v sin glicerol; c. fibroína 3.1 PVA v/v con glicerol y ciclo de congelamiento.

La figura 15 muestra las películas obtenidas con sericina/PVA 1:1 v/v, para los diferentes tratamientos no se observa separación de fases, solo para la figura 15.b que corresponde a la película que no posee glicerol y no tiene ciclo de congelamiento se da una aparición de valles, lo cual se puede asociar a que no hubo la mejor interacción entre los dos polímeros, debido a la falta de glicerol como plastificante, los puntos blancos se pueden asociar a la presencia de iones de sodio que no se eliminó en las diálisis, tal como pasó con el calcio en las películas de fibroína, este elemento no es nocivo puesto que existe apósitos obtenidos con alginato de sodio [9][10], además en los exudados uno de sus iones es sodio [7].

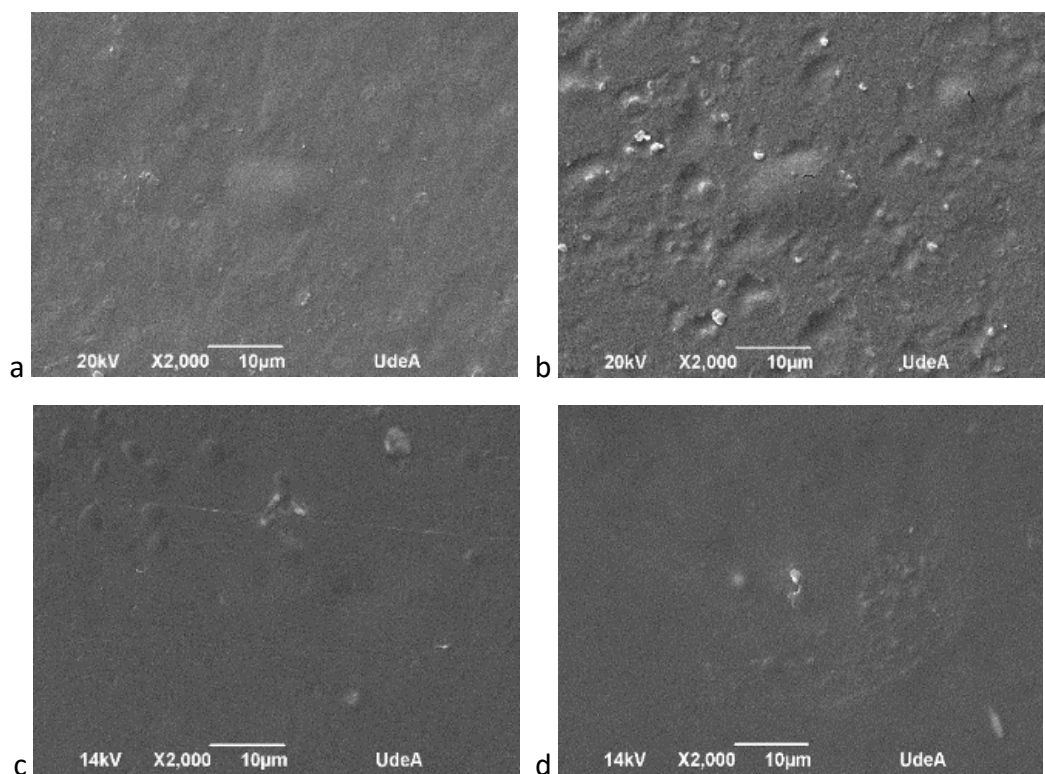


Figura 15 imágenes SEM de las películas de a. sericina 1:1 PVA v/v con glicerol; b. sericina 1.1 PVA v/v sin glicerol; c. sericina 1.1 PVA v/v con glicerol y ciclo de congelamiento cubierta; d. sericina 1.1 PVA v/v sin glicerol y ciclo de congelamiento cubierta.

La figura 16 la cual corresponde a las películas de sericina/PVA 2:1 v/v, se logra evidenciar como los ciclos de congelamiento mejora la homogenización de la película, observándose películas más homogéneas, lo que no sucede con las películas que no tienen este tratamiento (figura 16.a y 16.b) puesto que reflejan una especie de separación entre los polímeros, formando una textura rugosa, también se nota que las películas que tiene glicerol tienden a formar aglomerados en la películas, este fenómeno puede darse debido a las cargas tanto de los polímeros como del glicerol, puesto que la sericina está compuesta de aminoácidos polares como no polares [11].

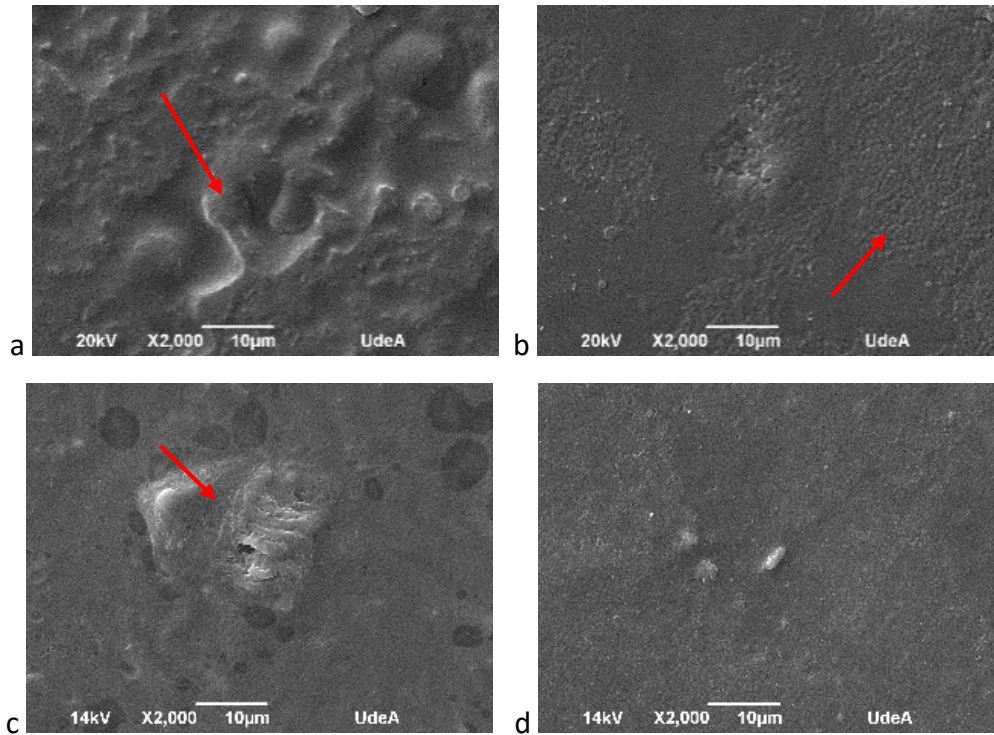


Figura 16 imágenes SEM de las películas de a. sericina 2:1 PVA v/v con glicerol; b. sericina 2.1 PVA v/v sin glicerol, c. sericina 2.1 PVA v/v con glicerol y ciclo de congelamiento, d. sericina 2.1 PVA V/V sin glicerol y ciclo de congelamiento.

En la figura 17 se muestran las películas obtenidas con sericina/PVA 3:1 v/v, se puede distinguir que la película que no tiene glicerol ni ciclo de congelamiento (figura 17. b), hay una separación de los polímeros y aglomeración de la sericina, mientras que para las películas que poseen glicerol independiente que no tengan ciclo de congelamiento este fenómeno no se presenta.

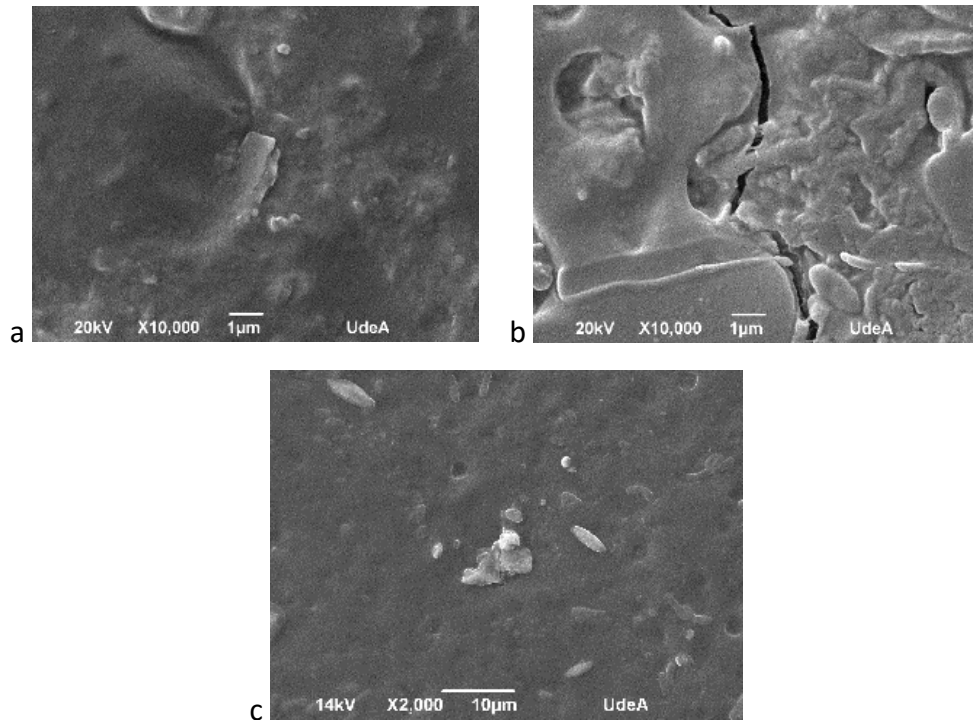


Figura 17 imágenes SEM de las películas de a. sericina 3:1 PVA v/v con glicerol; b. sericina 3.1 PVA v/v sin glicerol; c. sericina 3.1 PVA v/v sin glicerol y ciclo de congelamiento cubierta.

Las imágenes obtenidas mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM), corroboraron lo que se observaba a una escala del ojo humano, además se pudo notar como la adición del plastificante mejoró considerablemente la interacción entre los polímeros, esta técnica permitió observar cómo se obtenía películas homogéneas para fibroína como para sericina sometiéndolas a un ciclo de congelamiento, siendo la introducción del proceso más relevante para la fibroína, puesto que sin este tratamiento se genera una separación de fases aun con la presencia de glicerol, este elemento en la películas de sericina ayuda a tener mayor absorción de agua [12], películas compuestas de fibroína adicionando glicerol generaron películas más flexibles tal como se verificó en este estudio [13].

Las micrografías mostradas en las anteriores figuras, para películas monocapa, indicaron que no habían poros esta propiedad es necesaria para la elaboración de apósitos puesto que se necesita que haya un intercambio gaseoso para ayudar al crecimiento de células que están encargadas del proceso de cicatrización [14].

5.3.3. Mojabilidad

En la figura 18 se encuentran los datos para el ángulo de contacto inicial, tanto para las muestras congeladas como sin congelar, este ángulo de contacto fue dinámico, puesto que fue variando en el tiempo hasta llegar a cero. Las muestras poseen un comportamiento hidrofílico, existe una tendencia para las muestras de fibroína congeladas de poseer un mayor ángulo de contacto inicial, esto se debe a la homogeneidad de la muestra y al tipo de estructura que posee la fibroína, para las muestras de sericina tanto congeladas como sin congelar y con glicerol o sin glicerol, se evidencia que a mayor porcentaje de la solución de sericina se presenta un mayor ángulo de contacto inicial, cabe resaltar que después de 30 segundos la película de sericina absorbió la gota depositada, teniendo un ángulo de contacto de cero, lo que indica que estas películas tienen alta mojabilidad o super hidrofiliidad.

Al comparar el ángulo de contacto entre las muestras de fibroína y sericina este es mayor para las muestras de fibroína, lo cual posiblemente es debido a la presencia de láminas β , este resultado tiene similitud con lo encontrado por Sayed , M.M. et al 2019 [15], el cual registró el ángulo de contacto para un compuesto de nanofibras de PVA y fibroína, si bien este estudio no registra un ángulo de contacto dinámico o equilibrio de hinchamiento para este compuesto, es debido a la forma de elaboración de los parches obtenidos, puesto que la fibroína queda estructuralmente en láminas β y registran ángulos de contacto de 85°, el valor máximo obtenido en este estudio para el compuesto de fibroína/PVA es de 73°, cercano al valor registrado por Sayed , M.M. et al 2019, R. Artheet al (2019) registró un valor similar para una película de fibroína alrededor de los 80 ° [16], confirmando así lo obtenido en este estudio

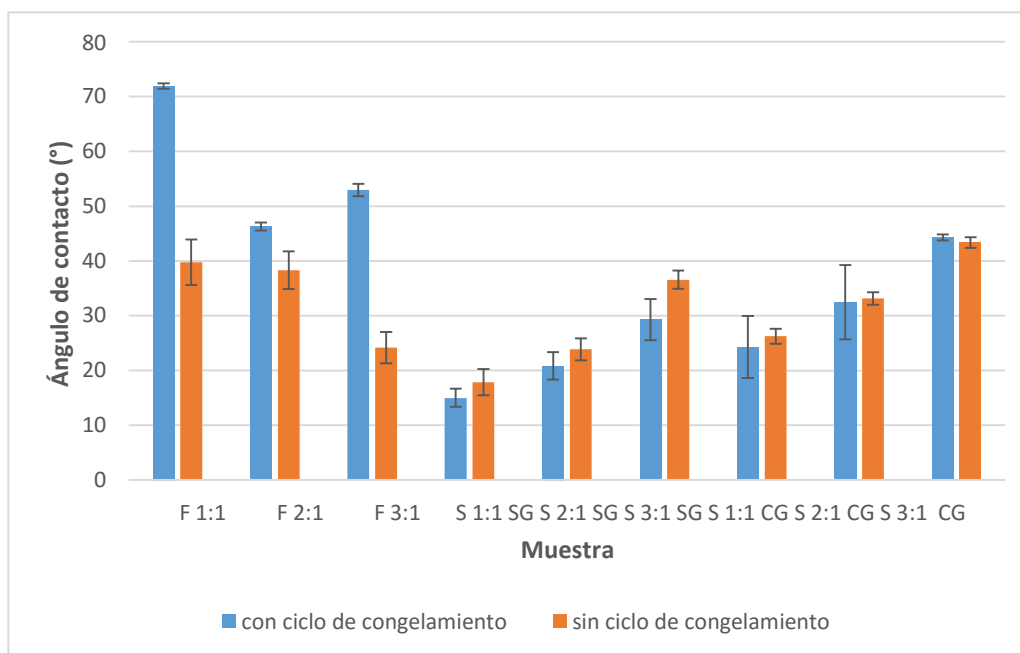


Figura 18 Valores de ángulo de contacto para las diferentes formulaciones de películas

De la figura 19 y 20, se puede observar el comportamiento hidrofílico de las películas preparadas, notando un ángulo de contacto dinámico tendiente a cero, con una velocidad mayor para las películas de sericina como lo registra Tao, G et al 2019, donde se logra evidenciar un tiempo de 2 segundos para alcanzar el equilibrio de hinchamiento [1], en las películas obtenidas en este estudio este tiempo fue de 30 segundos, mientras que para la fibroína tarda aproximadamente 16 minutos, esto se debe al tipo de estructuras en la que se puede encontrar la fibroína sean laminas β o helicoidal, esta propiedad de hidrofiliidad es de gran relevancia debido a que se requiere que el apósito final se mantenga adherido a la herida, lo que ayuda a retener el exudado de las heridas mejorando el tiempo de cicatrización [1].

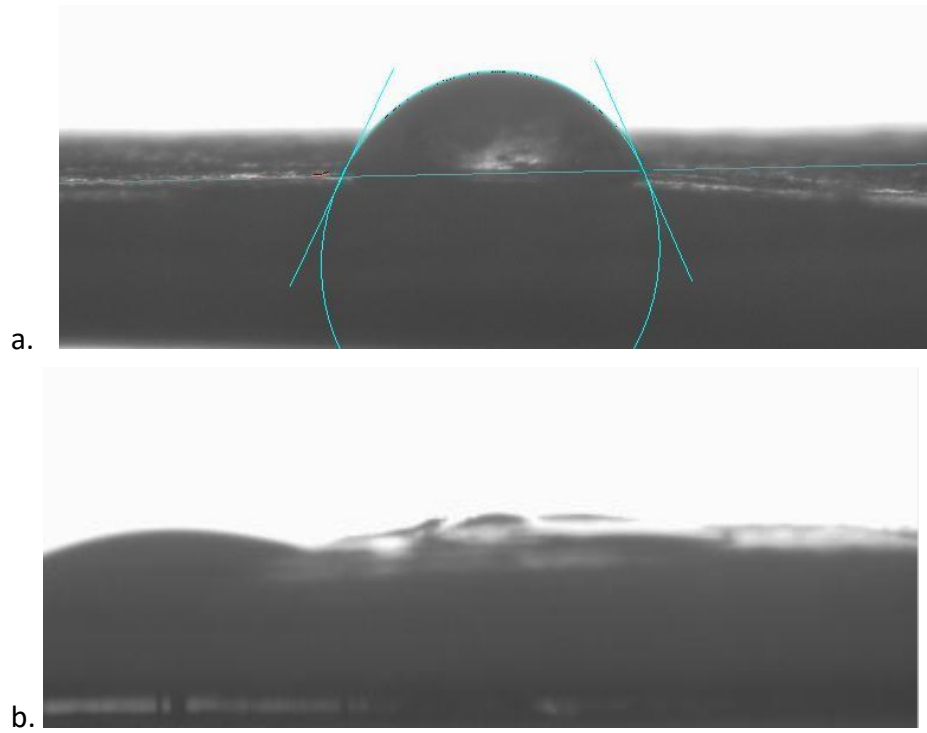


Figura 19 Ángulo de contacto película de fibroína a. Contacto inmediato b. Contacto 16 minutos después.

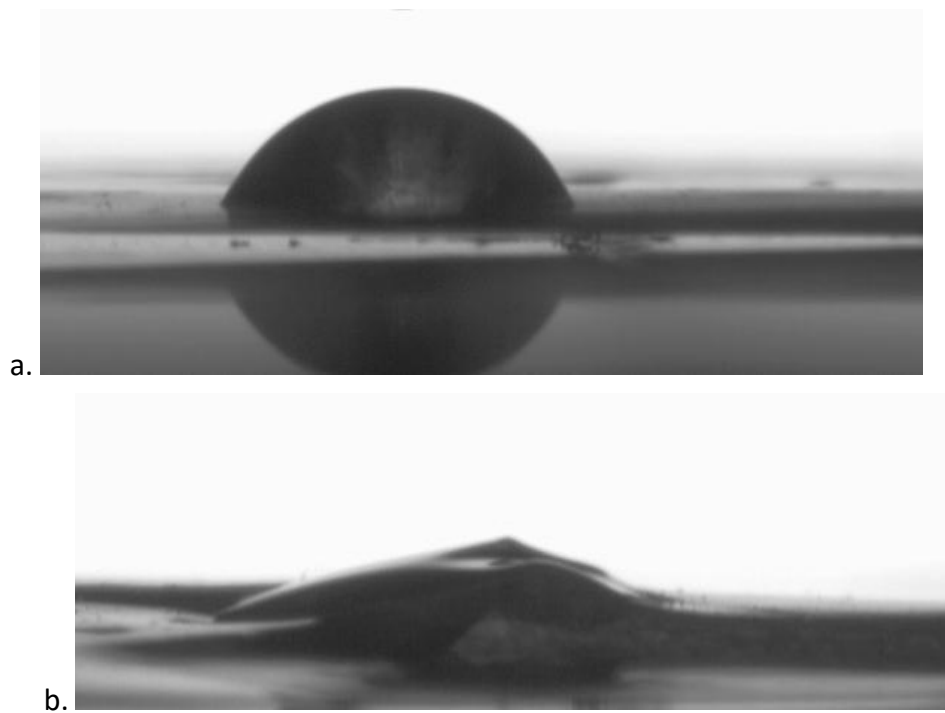


Figura 20 Ángulo de contacto película de sericina a. contacto inmediato b. contacto 30 segundos después.

5.3.4. Ensayo de degradabilidad

El ensayo de degradabilidad es de gran relevancia puesto que se busca que la degradabilidad sea controlada, si esta se da rápidamente provoca que aparezca gran cantidad de exudado lo que favorece el crecimiento de bacterias, y si es muy lenta se genera un estrés en los tejidos, es por esto que este proceso debe ser óptimo y que coincida con los procesos de regeneración del tejido para la reparación de la herida [17]. En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de degradabilidad para las películas compuestas de fibroína con y sin ciclo de congelamiento, se observa que para ambos ensayos y las diferentes formulaciones en las primeras 24 horas es donde se presenta incremento **sustancial de la pérdida** de masa similar, para las muestras obtenidas sin el ciclo de congelamiento no superan el 20% de degradabilidad, caso contrario con una de las muestras obtenidas con el ciclo de congelamiento, este ensayo fue de carácter destructivo puesto que cada dos días se retiraban un lote de muestras para ser medido, el tiempo máximo que duraron las muestras en PBS con recambio de PBS cada dos días fue de 8 días siendo este el último valor registrado, este ensayo se rigió bajo la norma ASTM F1635 [18], el tiempo de permanencia de un apósito en una lesión está asociado con la gravedad de la lesión y las condiciones del paciente [19].

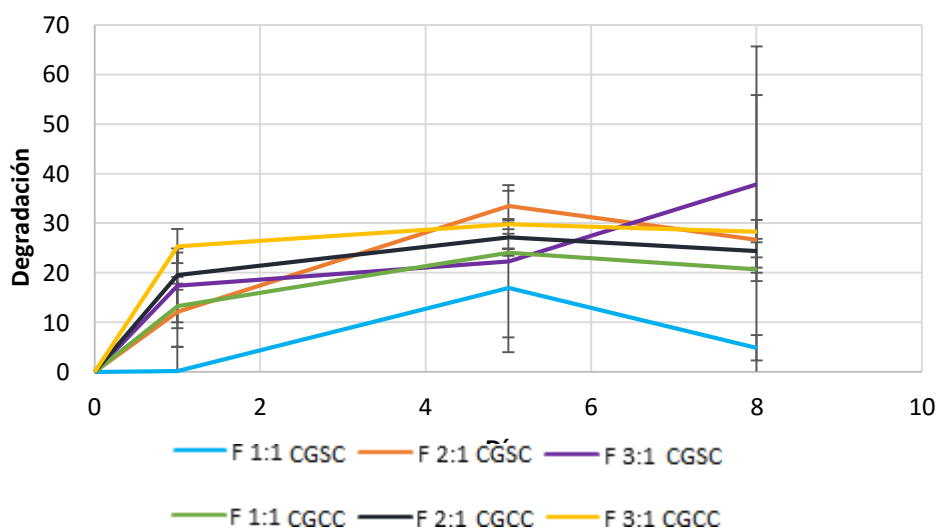


Figura 21 Degradación de películas de fibroína con ciclo de congelamiento con glicerol y sin ciclo de congelamiento con glicerol.

En las figuras 22, se observan los ensayos de degradación para las películas de sericina, estas difieren en un ciclo de congelamiento, se evidencia que las muestras tienen un comportamiento creciente y similar de pérdida de masa a las 24 horas, se puede notar como la muestra obtenida por el ciclo de congelamiento con el mayor porcentaje de sericina presenta una mayor pérdida de masa **en las primeras 24 horas** alcanzado un 29 % en este tiempo, sin embargo esta muestra presenta una barra de error considerable es decir los valores con los cuales se obtuvo el promedio de esta difieren de gran manera, tanto para las muestras con y sin ciclo de congelamiento la pérdida de masa no supera el 35 % resultado de gran relevancia puesto que la estructura del apósito se puede garantizar en los primeros ocho días donde ocurre el proceso de inicio de la cicatrización, **cabe resaltar que la muestra S 3:1 SG con ciclo de congelamiento tiene un comportamiento diferente al resto de las muestras, esto se pudo presentar por la deposición de sales, que no se desprendieron después de lavarlas con agua destilada, también se puede notar que la muestra con mejor comportamiento es la se S 1:1 SG sin ciclo de congelamiento, manteniendo los niveles de perdida muy bajos.**

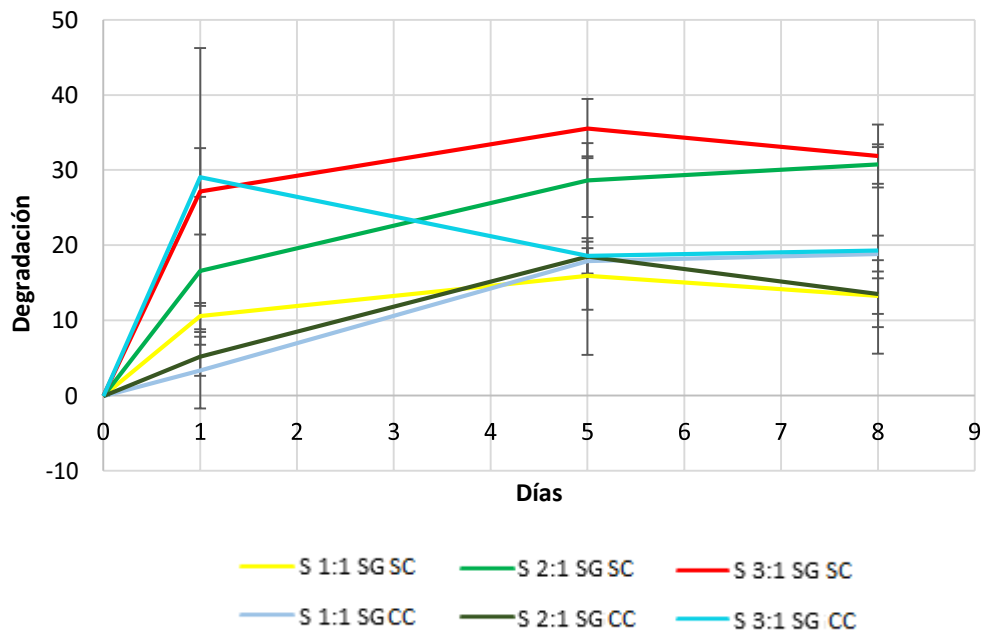


Figura 22 Degradación de películas de sericina sin glicerol con ciclo de congelamiento y sin ciclo de congelamiento.

En las figura 23 se observan los ensayos de degradación para las películas de sericina **con la adición de glicerol**, estas difieren en un ciclo de congelamiento a las cuales se les

adicionó glicerol como plastificante, se nota que para ninguno de los tratamiento en las primeras 24 horas se supera el 30 % de degradabilidad, y que la pérdida de masa es directamente proporcional al aumento de la solución de sericina usado, se puede observar que la muestra S 1:1 CG con ciclo de congelamiento, tiene un comportamiento diferente a los valores obtenidos, esto se puede deber a que las muestras cuando se lavaron con agua destilada para retirar las sales del PBS, perdieron su integridad y parte de la muestra. Con respecto al ciclo de congelamiento, no se puede concluir que disminuya la pérdida de masa, puesto que los valores para cada composición son muy similares, al comparar los resultados obtenidos en la figura 22 y 23, no se puede definir que el glicerol afecte los resultados en el ensayo de degradación, puesto que se obtienen valores similares para las muestras de las mismas proporciones.

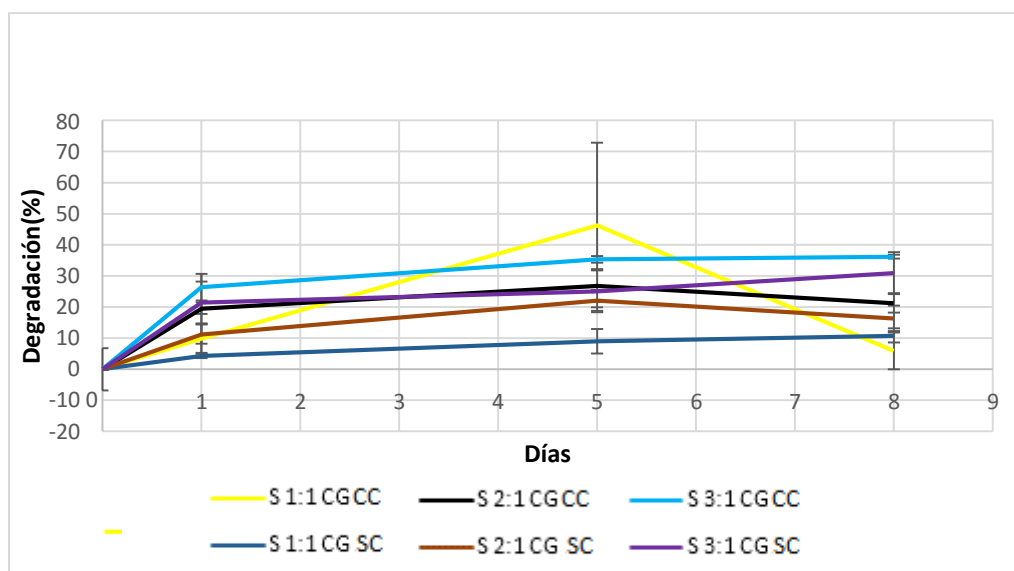


Figura 23 Degradación películas de sericina con glicerol con ciclo de congelamiento y sin ciclo de congelamiento.

En los resultados mostrados para el ensayo de degradabilidad se puede observar la tendencia, tanto para las películas de fibroína como de sericina, se da una pérdida más rápida de masa inicial en las primeras 24 horas, sin embargo en el día 5 y 8, algunas de las muestras no presentan pérdida de masa, por el contrario tienen una ganancia de masa, esto se asocia a las sales presentes en la solución de PBS, las cuales se adhieren a la superficie de las películas arrojando así este resultado.

Para todas las formulaciones se evidenció que no existe una pérdida de masa superior al 40%, exceptuando la muestra de sericina/PVA 2:1 v/v con glicerol obtenida con ciclo de congelamiento (figura 23), esto se debe a la variabilidad del resultado de las réplicas por lo que se da una barra de error tan amplia, esta pérdida de masa obtenida es conveniente puesto que las películas son estables y permiten tener un tiempo adecuado en contacto con la herida [20].

También se observó que a mayor cantidad de polímero ya sea fibroína o sericina aparecía una mayor cantidad de pérdida de masa, lo que lleva a inferir que lo que se está degradando en las diferentes películas son estos polímeros y no el PVA, quien ayuda a darle propiedades mecánicas a las diferentes películas, tal como lo describe Sayed, M.M et al 2019, donde para compuestos electro hilados de fibroína/PVA ocurre el mismo fenómeno [15].

Para las películas de sericina las cuales tuvieron la variaciones del uso de glicerol como plastificante y el ciclo de congelamiento, se comparó las muestras que no tenían ciclo de congelamiento sin glicerol con las que si lo contenían (figuras 23 y 25), se puede notar como las películas con glicerol presentan menor porcentaje de degradabilidad, esto debido a que se genera una mayor interacción entre los polímeros dejando menor cantidad de moléculas libres [2], mientras que para las películas congeladas la menor degradabilidad la tiene las películas sin glicerol, sin embargo, los valores son muy semejantes para todas las formulaciones; por lo cual esta variable no se considera con un efecto apreciable en las características de las películas.

5.3.5. Resistencia mecánica

Tanto la deformación como el esfuerzo se realizaron bajo la norma ASTM D 638 [21], y se trataron como polímeros elastómeros, debido a que se dejan deformar en gran proporción. La figura 24 muestra cual fue el máximo esfuerzo que alcanzaron las películas de fibroína en sus diferentes formulaciones, al comparar el esfuerzo máximo obtenido en las películas de fibroína con y sin ciclo de congelamiento, es notorio que las que tienen congelamiento poseen una mayor resistencia a la tracción, Priyanka P et al (2019), evaluó la resistencia mecánica para hidrogeles compuesto de fibroína y PVA y

encontró resistencia a la tracción no mayor a los 10 MPa, este valor fue inferior a lo obtenido en este estudio, pero se puede confirmar que la composición fibroína/PVA sin ciclos de congelamiento posee menores propiedades mecánicas que si se les realiza el ciclo de congelamiento [22], siendo la película con la composición fibroína/PVA 2:1 v/v la de mayor valor con aproximadamente 42 MPa, puesto que para aplicación en apósitos se debe tener una resistencia mayor a 1 MPa [12].

Al observar los resultados para las muestras de sericina que no tienen adición de glicerol se evidencia que se tienen resultados muy semejantes tanto con y sin ciclo de congelamiento, con una leve tendencia a ser mayor en las películas que no tienen ciclo de congelamiento, pero para ambas metodologías se evidencia que el aumento de sericina hace que disminuyan las propiedades mecánicas de las películas; para las películas de sericina con la adición de glicerol, estudios registran la fabricación de películas de sericina/PVA y sericina/PVA/ glicerol, la cualidad más importante que registran con la adición de glicerol es el mejoramiento en la flexibilidad de las películas obtenidas[12][23], sin embargo lo obtenido en este estudio revela que la flexibilidad con o sin la adición de glicerol es similar, cabe resaltar que todos los resultados obtenidos son adecuados debido a que la piel registra una resistencia a la tracción entre 1 y 32 MPa [12].

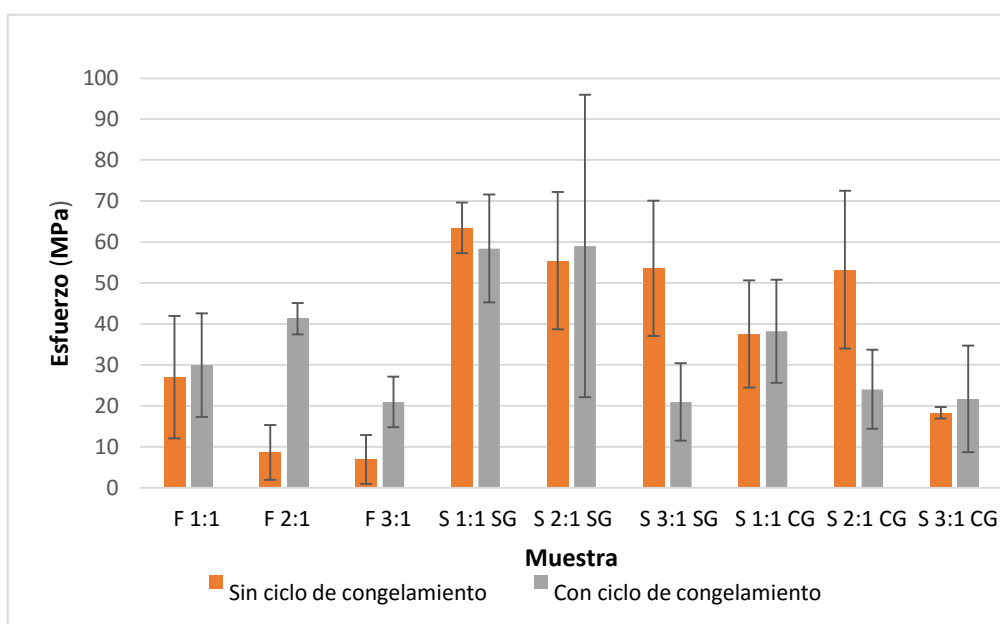


Figura 24 Esfuerzo máximo de las diferentes películas.

La figura 25 se observa cómo fue la deformación de las películas en el ensayo de tracción, se evidencia que el ciclo de congelamiento mejoró esta propiedad en las películas obtenidas; este mismo resultado fue descrito en un estudio donde realizaban ciclos de congelamiento y descongelamiento de hidrogeles de sericina/PVA, sin embargo, este estudio realiza tres ciclos de congelamiento y descongelamiento, obteniendo un esfuerzo máximo de 2.8 MPa y una elongación máxima de 135 % [1], dichos valores que son menores a los obtenidos con un solo ciclo de congelamiento en el presente estudio. En los resultados de la figura 27 se nota para cada composición que existe una gran diferencia en los valores máximos. Los mejores resultados los presenta la composición fibroína/PVA 2:1 v/v con una deformación de 220 %, para las películas de sericina sin glicerol la formulación que mejores resultados presentó fue sericina/PVA 2:1 v/v, mientras que las que poseían glicerol la mejor formulación fue sericina/PVA 3:1 v/v, esta propiedad es de gran importancia debido a que los apósitos deben tener la capacidad de moldearse a la geometría de la zona afectada, estudios registran una deformación menor al 90% en compuestos de sericina/PVA sin adición de glicerol [24], cabe resaltar que las películas obtenidos en estos no poseen ciclos de congelación lo que corrobora que este tratamiento mejora tanto la resistencia al esfuerzo como la deformación, para películas de fibroína/PVA se registran porcentajes de elongación alrededor del 100% [22], en este estudio las películas de fibroína 1:1 v/v fue aproximadamente del 40%, sin embargo cuando se realizó el ciclo de congelamiento este porcentaje se incrementó al 170%, lo cual confirma que también para este polímero el ciclo de congelamiento mejora esta propiedad.

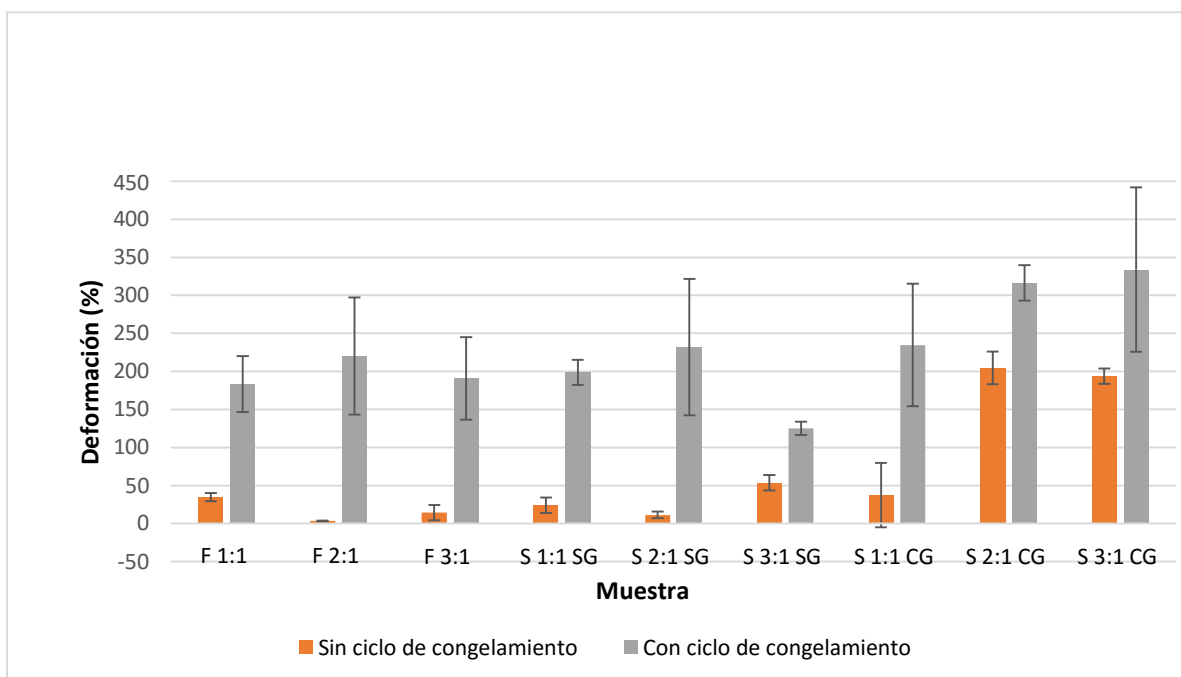


Figura 25 Porcentajes de deformación de las diferentes películas.

Dados los resultados anteriores de morfología, mojabilidad, degradación y resistencia mecánica se procedió a escoger la mejor película tanto para sericina como fibroína, con el fin de realizar el apósito multicapa. Para las películas de fibroína se eligió la composición fibroína/PVA 2:1 v/v con glicerol y ciclo de congelamiento, debido a que posee buena resistencia mecánica, su deformación es la mejor de todas las películas con 220 %, para el ensayo de degradabilidad en las primeras 24 horas tiene una pérdida de masa del 20 % y a los ocho días no alcanza un 25 %, porcentaje que es intermedio para este ensayo; no obstante se considera un resultado favorable, el ángulo de contacto al ser cero a los 16 minutos para todas las películas no tienen incidencia para la escogencia de las películas. Para las películas de sericina se eligió la composición sericina/PVA 2:1 v/v sin glicerol y con ciclo de congelamiento puesto que posee una deformación del 200 % y además tiene la mayor resistencia a la tracción, en el ensayo de degradabilidad esta película a las 24 horas es de 5 % y a los ocho días del 15 % de pérdida de masa. Se destaca el hecho de que, si bien otras películas tenían valores cercanos en las diversas propiedades, también se tuvo en cuenta en la selección que tuviera la mayor cantidad de fibroína o sericina, **cabe resaltar que el ensayo de mojabilidad dio resultados bastante favorables; puesto que el ángulo de contacto tendió a cero, lo que indica que las**

películas son súper hidrofílicas tanto para las películas compuestas de sericina y como para las películas de fibroína.

Conclusiones

- El compuesto de fibroína/PVA tiende a formar separación de fases, es necesario el uso de un plastificante para mejorar la interacción entre los dos polímeros, por lo tanto, con la adición de glicerol las películas modifican su morfología quedando homogéneas.
- El compuesto de sericina/PVA tiende a formar películas homogéneas aun sin el uso de un plastificante.
- Las películas de fibroína/PVA y sericina/PVA son súper hidrofílicas y alcanzan un equilibrio de hinchamiento en el tiempo, condición que las hace óptimas para el uso en apósitos.
- La pérdida de masa tanto para las películas de sericina y de fibroína, se da de forma más rápida en las primeras 24 horas, esto debido a la cantidad de moléculas libres de los dos polímeros, para tiempos más prolongados se inicia una degradación más estable llegando a valores cercanos al 40 %.
- Ambos compuestos fibroína/PVA y sericina/PVA poseen propiedades mecánicas óptimas en todas sus formulaciones para ser usados como apósitos.
- Realizar un ciclo de congelamiento durante la fabricación de las películas mejora las propiedades mecánicas de las películas finales, además de la interacción entre los polímeros eliminando la separación de fases.

Bibliografía

- [1] G. Tao *et al.*, "Design and performance of sericin/poly(vinyl alcohol) hydrogel as a drug delivery carrier for potential wound dressing application," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 101, no. September 2017, pp. 341–351, 2019.
- [2] L. Dai, J. Li, and E. Yamada, "Effect of glycerin on structure transition of PVA/SF blends," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 86, no. 9, pp. 2342–2347, 2002.
- [3] Q. Luo, Z. Chen, X. Hao, Q. Zhu, and Y. Zhou, "Preparation and properties of nanometer silk fibroin peptide/polyvinyl alcohol blend films for cell growth," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 61, pp. 135–141, 2013.
- [4] S. Gupta, S. Goswami, and A. Sinha, "A combined effect of freeze-thaw cycles and polymer concentration on the structure and mechanical properties of transparent

- PVA gels," *Biomed. Mater.*, vol. 7, no. 1, 2012.
- [5] S. Ma, S. Wang, Q. Li, Y. Leng, L. Wang, and G. H. Hu, "A Novel Method for Preparing Poly(vinyl alcohol) Hydrogels: Preparation, Characterization, and Application," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 56, no. 28, pp. 7971–7976, 2017.
 - [6] N. Akhavan-Kharazian and H. Izadi-Vasafi, "Preparation and characterization of chitosan/gelatin/nanocrystalline cellulose/calcium peroxide films for potential wound dressing applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 133, pp. 881–891, 2019.
 - [7] J. A. P. Dutra *et al.*, "Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 113, pp. 11–23, 2017.
 - [8] H. Asai *et al.*, "Burns Open Case Report A case of extensive burn injury with hypercalcemia caused by calcium ion absorption from the wound dressing," *Burn. Open*, no. xxxx, pp. 10–12, 2019.
 - [9] S. G. Jin *et al.*, "Development of a novel sodium fusidate-loaded triple polymer hydrogel wound dressing: Mechanical properties and effects on wound repair," *Int. J. Pharm.*, 2016.
 - [10] S. Li, L. Li, C. Guo, H. Qin, and X. Yu, "A promising wound dressing material with excellent cytocompatibility and proangiogenesis action for wound healing: Strontium loaded Silk fibroin/Sodium alginate (SF/SA) blend films," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 969–978, 2017.
 - [11] A. Watthanaphanit and R. Rujiravanit, "Sericin-binded-deprotenized natural rubber film containing chitin whiskers as elasto-gel dressing," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017.
 - [12] S. Ghalei, J. Nourmohammadi, A. Solouk, and H. Mirzadeh, "Enhanced cellular response elicited by addition of amniotic fluid to alginate hydrogel-electrospun silk fibroin fibers for potential wound dressing application," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2018.
 - [13] M. Gholipourmalekabadi, S. Sapru, A. Samadikuchaksaraei, R. L. Reis, D. L. Kaplan, and S. C. Kundu, "Silk fibroin for skin injury repair: Where do things stand?," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019.
 - [14] D. Simões, S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, P. Coutinho, A. G. Mendonça, and I. J. Correia, "Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018.
 - [15] M. M. Sayed *et al.*, "Enhancing mechanical and biodegradation properties of polyvinyl alcohol/silk fibroin nanofibers composite patches for Cardiac Tissue Engineering," *Mater. Lett.*, vol. 255, p. 126510, 2019.
 - [16] R. Arthe, D. Arivuoli, and V. Ravi, "Preparation and Characterization of bioactive Silk Fibroin / Paramylon Blend Films for chronic wound healing," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.

- [17] C. M. Srivastava, R. Purwar, and A. P. Gupta, "Enhanced potential of biomimetic, silver nanoparticles functionalized *Antheraea mylitta* (tasar) silk fibroin nanofibrous mats for skin tissue engineering," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.
- [18] F1635-16, "Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants," pp. 1–7, 2018.
- [19] M. Farokhi, F. Mottaghitlab, Y. Fatahi, A. Khademhosseini, and D. L. Kaplan, "Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings," *Trends in Biotechnology*. 2018.
- [20] L. Xing *et al.*, "Alginate membrane dressing toughened by chitosan floccule to load antibacterial drugs for wound healing," *Polym. Test.*, 2019.
- [21] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, "D638 – 14," *Stand. Test Method Tensile Prop. Plast.*, p. 17, 2014.
- [22] P. P. Patil, R. A. Bohara, J. V. Meshram, S. G. Nanaware, and S. H. Pawar, "Hybrid chitosan-ZnO nanoparticles coated with a sonochemical technique on silk fibroin-PVA composite film: A synergistic antibacterial activity," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.
- [23] S. Tyeb, N. Kumar, A. Kumar, and V. Verma, "Flexible agar-sericin hydrogel film dressing for chronic wounds," *Carbohydr. Polym.*, 2018.
- [24] G. Tao *et al.*, "Bioinspired design of AgNPs embedded silk sericin-based sponges for efficiently combating bacteria and promoting wound healing," *Mater. Des.*, 2019.

CAPÍTULO VI: ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE APÓSITOS MULTICAPA

6.1. Introducción

En este capítulo se presentan la metodología y los resultados del proceso de fabricación de apósitos compuestos de fibroína, sericina, PVA y AgNPs. Se obtuvieron apósitos multicapas a los cuales se les evaluó resistencia a la tracción, mojabilidad, porcentaje de hinchamiento, poder antimicrobiano y citotoxicidad; además se caracterizaron mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y microscopia electrónica de barrido (SEM), con el fin de determinar ciertas propiedades requeridas para su aplicación en curación de heridas. Se pudo determinar que los apósitos obtenidos tenían buena porosidad, además de una capacidad de retener fluidos bastante elevada, además de ayudar a la proliferación celular; en la prueba antimicrobiana se pudo determinar que si bien no poseía un halo de inhibición considerable no existía una adición de los microorganismos al disco impregnado con las soluciones de los apósitos trabajados, lo que sugiere que el apósito tiene cierta capacidad antimicrobiana. Como resultado importante, los apósitos evaluados no presentaron efecto citotóxico sobre fibroblastos, mostrando el potencial de aplicación de este biomaterial.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Elaboración de apósitos

Para la elaboración de los apósitos multicapa, se fabricó primero la película de sericina la cual fue seleccionada como presentado en el capítulo 5, cuya composición fue sericina-PVA 2:1 v/v sin la adición de glicerol, cuando esta película estuvo completamente seca, se vertió sobre ella la solución de fibroína con la composición fibroína-PVA 2:1 v/v con la adición de glicerol en un 50% **con respecto a la concentración del polímero ya sea fibroína o sericina en peso**. Para verificar la influencia del porcentaje de nanopartículas de plata AgNPs, a la solución de fibroína se le adicionaron porcentajes de AgNPs en 1% y 2 %con respecto al volumen total de la película, y se realizó el tratamiento de congelación y secado.

En la figura 1 se ilustra el procedimiento seguido para la elaboración de los apósitos.

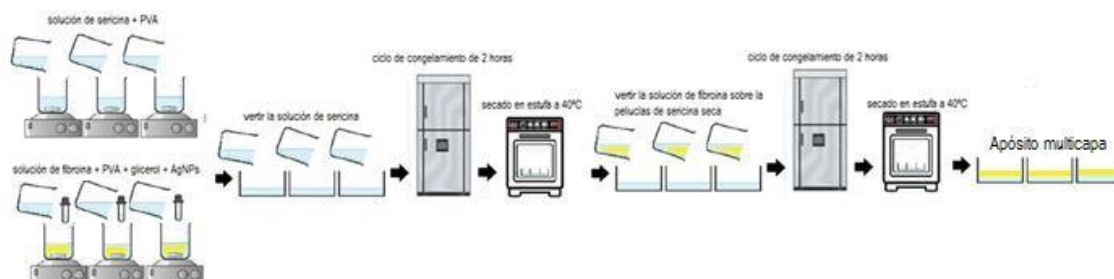


Figura 1 Metodología para la elaboración de los apósitos multicapa.

6.2.2. Caracterización

6.2.2.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Con la finalidad de determinar cómo variaban los grupos funcionales y componentes principales de la fibroína y sericina con la adición de las AgNPs, se procedió a realizar un análisis infrarrojo de una porción de un scaffold mediante ATR usando un equipo SHIMATZU IR-TRACER 100 en un rango de barrido entre 400 y 4000 cm^{-1} y un número de ciclos de 24.

6.2.2.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para observar la morfología de las películas y verificar si en los apósitos obtenidos se lograban apreciar las diferencias en las capas se utilizó la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM). Este ensayo se realizó en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL-JSM 6490 LV, el cual opera con una aceleración de voltaje de 20

6.2.2.3. Mojabilidad

La mojabilidad de las películas fue evaluada usando el equipo de ángulo de contacto DataPhyysics OCA15, con un tamaño de gota de 0.5 μL , este ensayo se realizó para observar si los apósitos obtenidos eran hidrofóbicos o hidrofílicos, puesto que para la aplicación en apósitos estas deben ser hidrofílica para que interactúen con el exudado de las heridas.

6.2.2.4. Propiedades mecánicas

El ensayo de tracción se realizó en una máquina universal de ensayos marca SHIMADZU AGSD 50 KN con una celda de carga de 5 ton, bajo la norma ASTM D638. Se cortaron las películas en trozos de 2 cm de ancho y 5 cm de largo, la velocidad de carga fue de 20 mm/min, este ensayo se hizo por triplicado para cada tipo de película, lo cual permitió ver el comportamiento a la tensión de las películas obtenidas, y sacar información relevante como el esfuerzo máximo y la deformación máxima que poseían las películas.

6.2.2.5. Capacidad de hinchamiento

Este ensayo se hizo bajo la norma ASTM-D570 durante 48 horas, con la finalidad de observar cual era la capacidad de los apósitos obtenidos de retener fluidos, para ello se recortaron trozos de los apósitos de 1 x 1 cm, y se sumergieron en agua destilada, posteriormente se observaron las variaciones en el peso húmedo, hasta que este fuera estable.

6.2.2.6. Ensayo antimicrobiano

El ensayo antimicrobiano se realizó siguiendo el manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (NCCLS), mediante la técnica de difusión por disco, para esto se recortaron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro de papel filtro y se impregnaron con las soluciones de los apósitos; se trabajaron con cepas ATCC de *Escherichia coli* como bacteria Gram negativa y *Staphylococcus aureus* como bacteria Gram positiva a una concentración de 0.6 en escala de McFarland. Los triplicados del ensayo se hicieron en tres días diferentes para garantizar independencia entre los resultados y tener una validez estadística, el cultivo se hizo en agar nutritivo, teniendo como control positivo la clorhexidina y como control negativo solución salina, cada disco fue impregnado con 8 uL de las diferentes formulaciones.

6.2.2.6. Ensayo de citotoxicidad

La evaluación de la viabilidad celular se realizó sobre las películas de fibroína y sericina, evaluando si los polímeros eran tóxicos de manera individual y funcionando estos como grupos control, también se hizo evaluación sobre de las películas de fibroína con concentraciones de plata al 1 y 2 % esto para determinar si la fibroína era nociva con la adición de AgNPs como control negativo se utilizó la sal precursora de las AgNPs la cual es AgNO_3 , puesto que si esta no se redujo completamente los apósitos no tendrán la viabilidad celular esperada. Los apósitos multicapa SS/SF 1 % y 2 % Ag también fueron ensayados. Todas las muestras se colocaron en contacto con células NiH3T3, fibroblastos de ratón, en una cantidad de 5×10^5 células NiH3T3, cultivadas con medio DMEM 10 % SFB, en atmósfera de CO_2 5 % y un tiempo total de cultivo celular de 24 h. La viabilidad se determinó mediante el reactivo de resazurina, si este se torna rosado existe viabilidad celular, mientras que si se torna azul no hay viabilidad celular.

En la figura 2 se puede observar cómo fue la distribución de las muestras en los platos de cultivo.

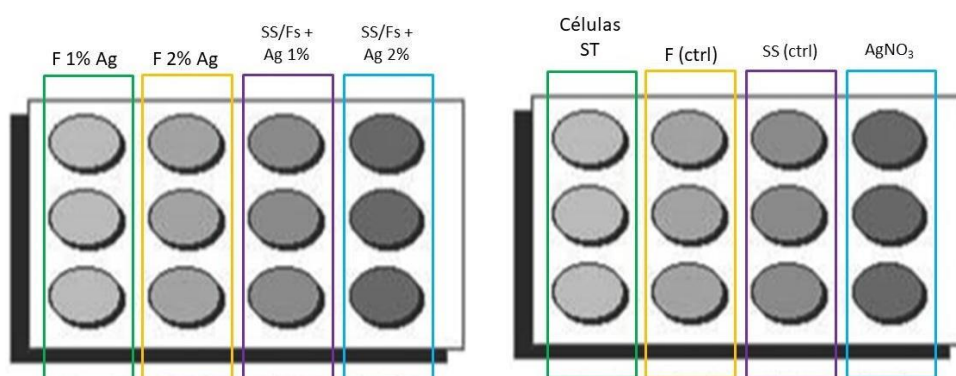


Figura 2 Esquema de trabajo perteneciente a los diferentes tratamientos evaluados en línea celular NiH3T3.

6.3. Resultados y análisis

6.3.1. Soluciones de fibroína con AgNPs

En la figura 3 se puede observar las soluciones de fibroína con AgNPs, se evidencia que a mayor porcentaje de AgNPs la solución se torna más café, esto debido a que la solución de AgNPs es de color marrón como se mostró en el capítulo 3.

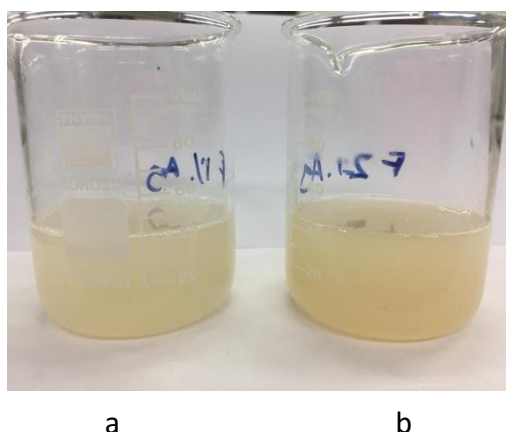


Figura 3 Soluciones de a. fibroína con AgNPs al 1% v/v; b. fibroína con AgNPs 2% v/v.

6.3.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Se evidencia en la figura 4 que no apareció el pico alrededor de 1277 cm^{-1} el cual corresponde a NO_3 libre en la solución, elemento presente en la sal precursora y el cual es citotóxico, al no aparecer este pico se puede confirmar que el AgNO_3 , fue reducido a su totalidad a AgNPs, además se observa los bandas características de las amidas I, II y III. [1].

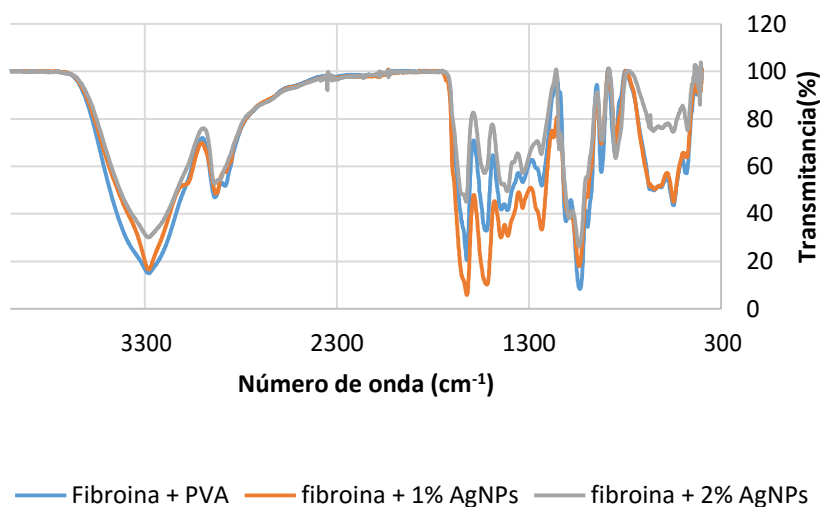


Figura 4 FTIR de las películas con adición de AgNPs.

6.3.3. Apósitos obtenidos

En las figuras 5 y 6 se observan los apósitos obtenidos, en la figura 5 se visualizan los apósitos compuestos de fibroína y AgNPs al 1 y 2 % respectivamente, los cuales tenían un espesor aproximado de 0.03 mm, estos son porosos debido posiblemente a la adición de AgNPs, estos apósitos al tacto son resistentes y flexibles: Los apósitos mostrados en la figura 6 son los constituidos de fibroína/sericina + AgNPs al 1 y 2%, los cuales son multicapa, tenían un espesor de 0.07 mm aproximadamente, en ellos se observa un lado rugoso que corresponde a la capa más externa compuesta de fibroína y AgNPs, el lado contrario compuesto de sericina es liso, lo cual ayudaría a la adherencia con la herida debido a que la sericina posee un componente pegajoso puesto que esta ayuda a unir los hilos de seda, además de su excelente hidrofiliidad [3], al tacto se sintió que a mayor porcentaje de AgNPs se presentaba una mayor rugosidad.

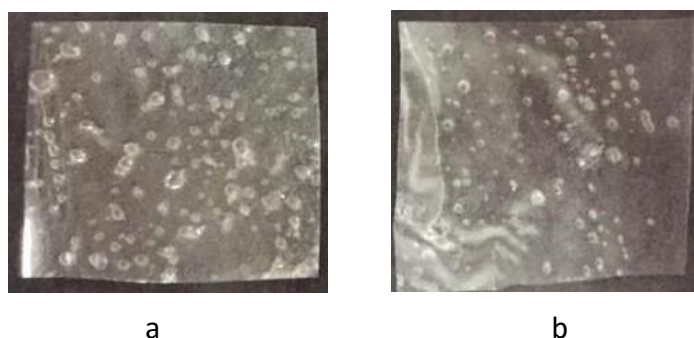


Figura 5 apósitos compuestos de a. fibroína + AgNPs 1%; b. fibroína + AgNPs 2%.



Figura 6 Apósito compuesto de a. fibroína/ sericina + AgNPs 1%; b. fibroína/sericina + AgNPs 2%.

6.3.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En la figura 7 se observa la superficie del apósito de fibroína con AgNPs al 1 y 2 % respectivamente, es notorio que no existe una diferencia entre los apósitos, formando apósitos lisos y homogéneos en la superficie, lo cual muestra como es realmente el apósito a nivel micro, esto puede deberse que lo generado eran burbujas de aire generadas en la superficie del apósito, las fisuras presentadas no se deben al proceso de elaboración de estos sino al haz de electrones producido por el equipo para observación, que deteriora la muestra. No se logran visualizar las AgNPs debido a que este equipo alcanza a una resolución máxima de 100 nm, y las AgNPs están por debajo de este valor, sin embargo, se logran ver puntos con mayor intensidad de luz para las AgNPs al 2 % como se señala en la figura 7.b, esto puede indicar que es una nanopartícula mayor a los 100 nm o calcio proveniente del proceso de extracción de la fibroína; no obstante, no pudo ser verificado.

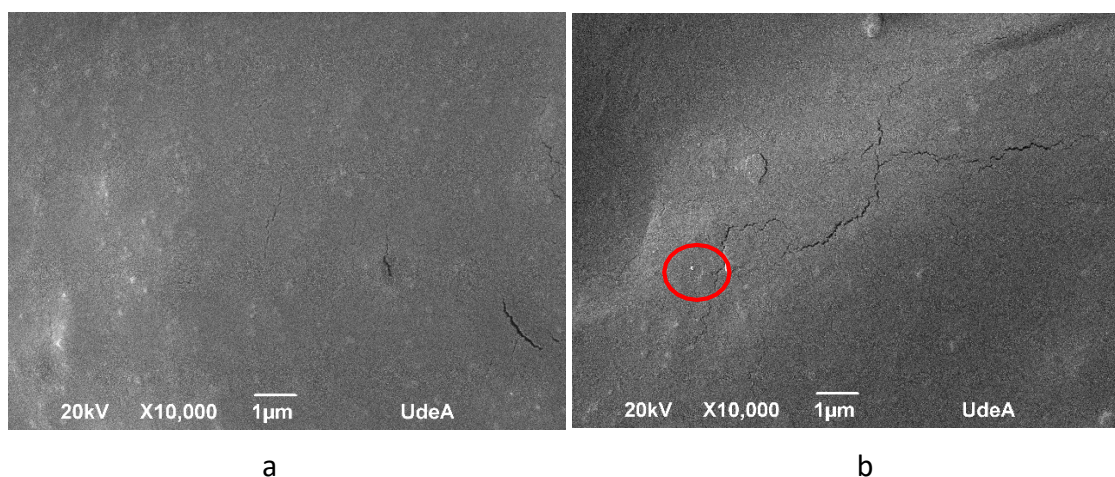


Figura 7 Apósito de a. fibroína + PVA + AgNPs 1% v/v; b. fibroína + PVA + AgNPs 2% v/v.

En las figuras 8 y 9 se observan las micrografías en un corte transversal, donde se evidencia la aparición de dos capas, una característica que se buscaba en los apósitos, la capa superior está compuesta por fibroína y AgNPs al 1% esta es de apariencia rugosa, mientras que la inferior se compone de sericina y es lisa, se logra apreciar la aparición de poros, en las dos capas, cualidad importante a la hora de elaborar apósitos [2], estos poros no se apreciaban en las películas presentadas en el capítulo 5, si bien el corte de la muestra favorece observar los poros, en la figura 11 se evidencia que en la superficie

también existen poros, por lo cual se puede afirmar que proceso de elaboración de los apósitos multicapa crea poros en su estructura. Para la capa compuesta de fibroína se tiene un poro de un tamaño aproximado a los $0.8\ \mu\text{m}$ y para la de sericina de $0,5\ \mu\text{m}$, se evidencia que los poros estas distribuidos de manera aleatoria en las capas lo que favorece el intercambio gaseoso. La figura 9 muestra la separación de las capas esto se hizo elevando el flujo de electrones hacia la película con lo que tiende a degradarse, se logró confirmar que existen dos capas, además que al interior de la capa de sericina se evidencia la presencia de los poros antes mencionados.

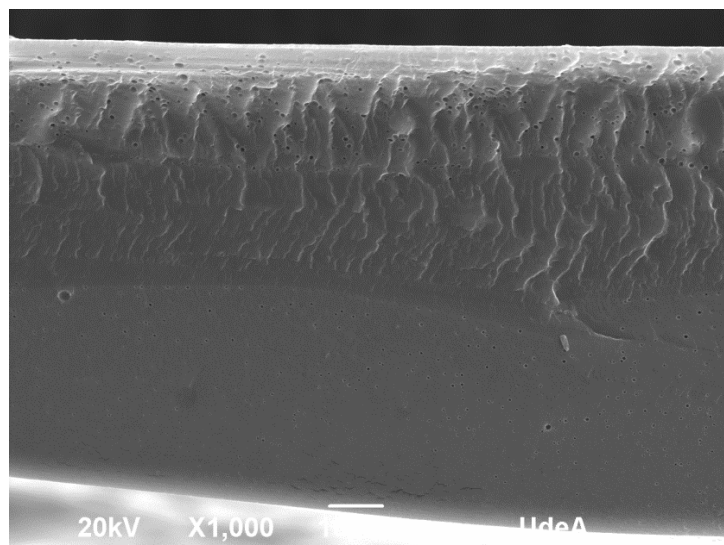


Figura 8 Apósito multicapa de fibroína / sericina + AgNPs 1% a 1000 X

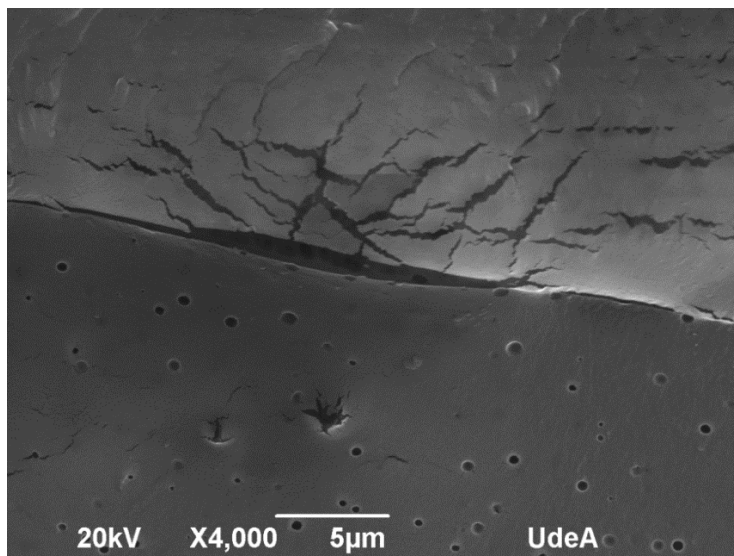


Figura 9 Apósito multicapa de fibroína / sericina + AgNPs 1% a 4000 X

En las figuras 10, 11 se presentan los apósitos generados con la adición de 2% de AgNPs, se observa en la figura 10 que al igual que al 1% de AgNPs el material se compone de dos capas, además de la diferencia en su textura siendo más rugosa la que está compuesta de fibroína, para este apósito se observa en la figura 11 una porosidad mayor en la región superior del apósito que corresponde a la fibroína de aproximadamente 4.5 μm , y para la parte de sericina de aproximadamente de 1 μm , estas medidas fueron tomadas con el software del microscopio electrónico de barrido, en la figura 12 se puede observar la textura superficial del apósito es notorio la porosidad además de una textura rugosa.

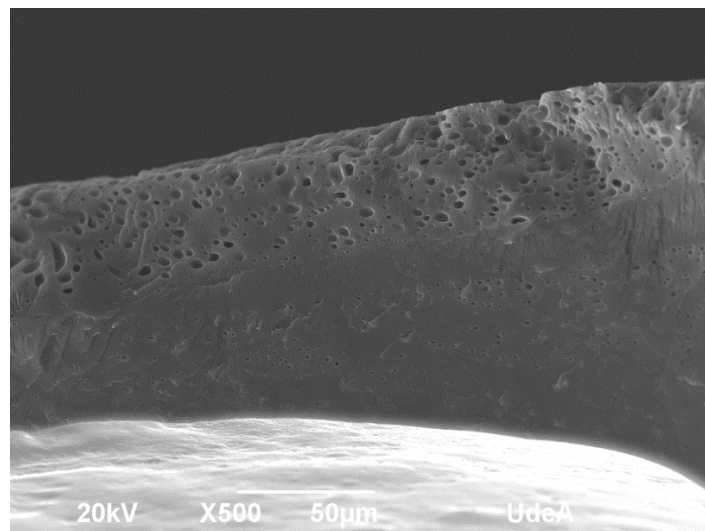


Figura 10 Apósito multicapa de fibroína / sericina + AgNPs 2% a 500X

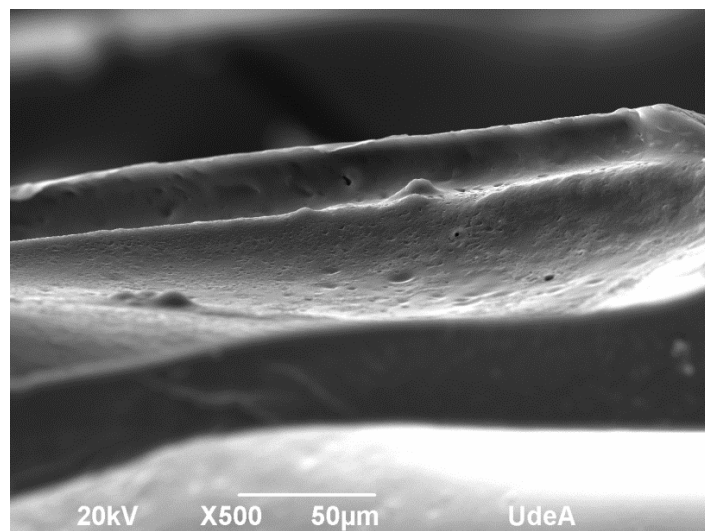


Figura 11 Apósito multicapa de fibroína / sericina + AgNPs 2% a 500X

Tanto para los apósitos con 1 % como para los de 2 % de AgNPs, se pudo observar claramente la formación de un apósito multicapa, así se puede aislar la herida de mejor manera puesto que la capa de sericina ayuda a adherir el apósito a la herida, mientras que la capa exterior compuesta de fibroína y AgNPs protege a la herida de microorganismos, cabe resaltar que no se registra en la literatura con la búsqueda realizada a la fecha, ningún estudio donde se elabore apósitos multicapa con polímero naturales como se obtuvieron este trabajo, además de garantizar una porosidad para el intercambio gaseoso y ayudar a la regeneración del tejido, propiedad que no se registraba en las películas compuestas de fibroína/ PVA y sericina/PVA, mostradas en el capítulo 5, esta propiedad fue registrada por Gang T et al (2019), donde elaboraron apósitos compuestos de sericina/PVA y AgNPS, donde obtenían un porosidad entre los 20 a 90 μm [3], Raho R et al (2019) registro que la adición de AgNPs cambia la morfología de hidrogeles compuestos de fibroína y carboximetilcelulosa (CMC).

6.3.5. Mojabilidad

Para el ensayo de mojabilidad se obtuvieron los resultados presentados en la figura 12, este fue el ángulo de contacto inicial en donde se evidencia que en el apósito de fibroína con AgNPs, el ángulo de contacto es directamente proporcional al aumento del porcentaje de AgNPs, cabe resaltar que con el paso del tiempo este ángulo tendió a cero, para la fibroína en aproximadamente 10 min, y para la sericina 30 segundos. Se evaluó en el apósito multicapa cada una de las capas, se pudo notar que no existe un patrón definido para cada capa, sin embargo al volverse cero se confirma que los apósitos obtenidos son hidrofílicos [4] corroborando los resultados obtenidos en el capítulo 5, para la fibroína se evidencia la presencia de grupos hidrofóbicos debido al ángulo inicial y al tiempo en que el ángulo de contacto se vuelve cero tal como se registró en el capítulo 5 corroborando así lo descrito por Sayed, M.M et al (2019) M. M. [5], se pudo notar que la primera capa tenía un ángulo de contacto más bajo que la segunda, lo que da un indicio de que la segunda capa es de fibroína y la primera de sericina, además del tiempo en que este ángulo sea cero, que para la parte compuesta de sericina siempre es menor, el comportamiento de la capa de sericina es importante puesto que esto

ayuda a retener el exudado y a adherir el apósito a la herida [3]. Un aspecto positivo de este tipo de apósitos es que no es necesario retirarlo constantemente puesto que al ser elaborados con polímeros naturales estos son biocompatibles y pueden estar en contacto con la piel durante largo plazo, esta es una ventaja con respecto a los polímeros sintéticos los cuales deben ser retirados y si estos se adhieren a las heridas y los pacientes sufren gran dolor cuando se retira el vendaje o apósito [6].

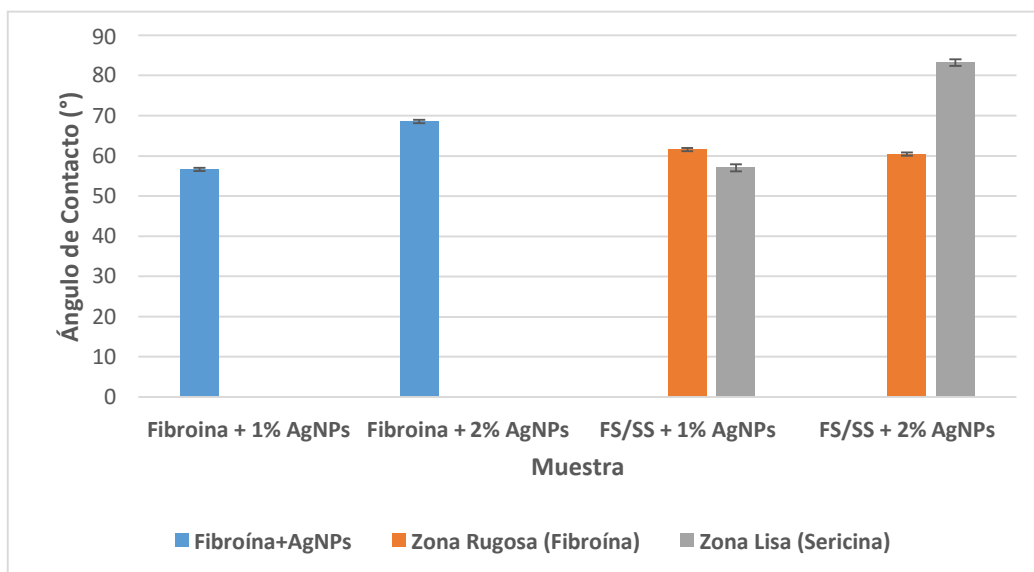


Figura 12 Ángulo de contacto de los apósitos.

6.3.6. Resistencia mecánica

La figura 13 permite observar cómo fue la deformación de los apósitos en el ensayo de tracción, se evidencia que a menor concentración de AgNPs hay una mayor deformación del material, y que al estar en multicapa no hay una diferencia entre los valores llegando a un máximo para estos de 132 %. En relación con lo obtenido en el capítulo 5 se puede observar que la adición de AgNPs disminuye considerablemente la deformación puesto que la película de fibroína 2:1 con glicerol, congelada y sin esta adición de AgNPs (Figura 25, capítulo 5, el valor de deformación es de 220 % y para 1% y 2% de AgNPs los valores son de 195.3 y 139.2 % respectivamente, además se logra evidenciar que no se tiene un efecto sinérgico cuando se tiene los dos materiales juntos puesto que tanto para sericina-PVA y fibroína-PVA en las composiciones trabajadas que fue 2:1 v/v, se tienen valores por encima del 200 % de deformación, y los apósitos obtienen un máximo de 132 %, sin embargo son valores de deformación altos, se evidencia que la adición de

AgNPs disminuye esta propiedad. Este hecho se debe a que las partículas metálicas son más duras que el polímero y actúan como inhibidores de la deformación del material.

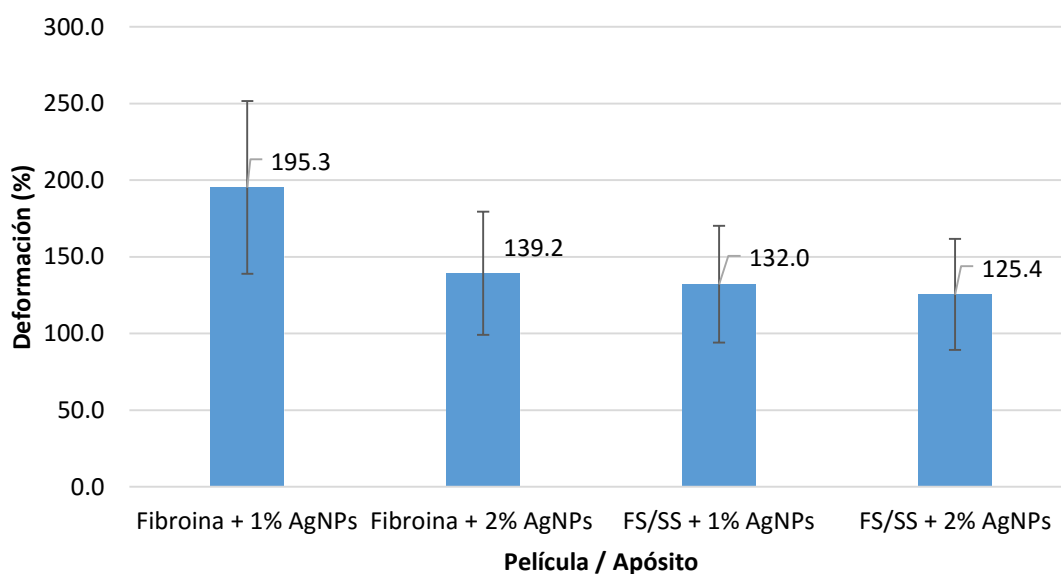


Figura 13 Deformación máxima de los apósitos obtenidos.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos para el esfuerzo máximo de los apósitos obtenidos, se evidencia el mismo comportamiento que en el ensayo de deformación donde a mayor porcentaje de AgNPs se disminuye la resistencia a la tracción, al observar el comportamiento del apósito multicapa se evidencia una disminución al adicionar mayor contenido de AgNPs, al comparar los resultados para el apósito de fibroína con AgNPs con los resultados obtenidos en el capítulo 4 se evidencia una disminución considerable puesto que pasa de 42 MPa a 12.7 MPa y entre más porcentaje de AgNPs se da una mayor disminución, esto debido a que se generan burbujas de aire en la superficie y en los apósitos multicapas se generan poros lo cual hace que exista esta disminución [7], se evidencia que el apósito multicapa tiene una resistencia baja con respecto a las películas individuales, sin embargo, para el uso en apósito se requiere que la resistencia a la tracción sea mayor a 1 MPa puesto que la piel registra una resistencia de 1 a 32 MPa [8], y los apósitos multicapas obtenidos superan este valor.

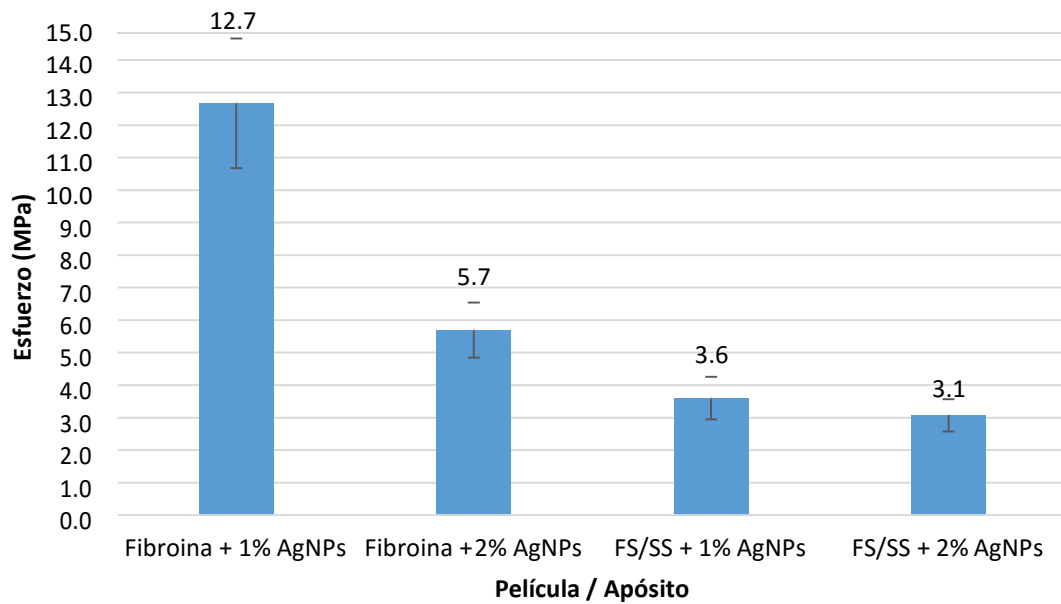


Figura 14 Esfuerzo máximo de los apósitos obtenidos.

En los dos resultados tanto en deformación y esfuerzo se evidenció que la adición de AgNPs disminuyen las propiedades de los apósitos obtenidos en comparación con las películas por separado, este fenómeno puede pasar porque las AgNPs generaron porosidad en el apósito como se observó en la figuras 5, 6, 8 y 10 y los poros generados provocan fallas a nivel estructural de cualquier material en este caso del apósito obtenido [7].

6.3.7. Hinchamiento

De la figura 15 se puede observar que el porcentaje de hinchamiento de los apósitos obtenidos supera el 200 %, este comportamiento es muy relevante debido a que ayudará a retener el exudado en la herida, estudios han demostrado que apósitos constituidos de sericina y PVA tienen un porcentaje de hinchamiento entre el 300 % y 500 %, el entrecruzamiento de los polímeros genera una flexibilidad entre las cadenas de los polímeros donde puede entrar el agua y retenerse [9], **el resultado obtenido en este estudio si bien está por debajo de lo observado en la literatura, se podría decir que es un resultado adecuado para esta aplicación** y como se mencionó anteriormente retener el exudado estimula a la regeneración del tejido en menor tiempo, puesto que este elemento ayuda a la formación de colágeno en la herida [10], se observa también

que cuando se aumenta la concentración de AgNPs se disminuye levemente el porcentaje de hinchamiento puesto que pasa de 239 % a 221%.

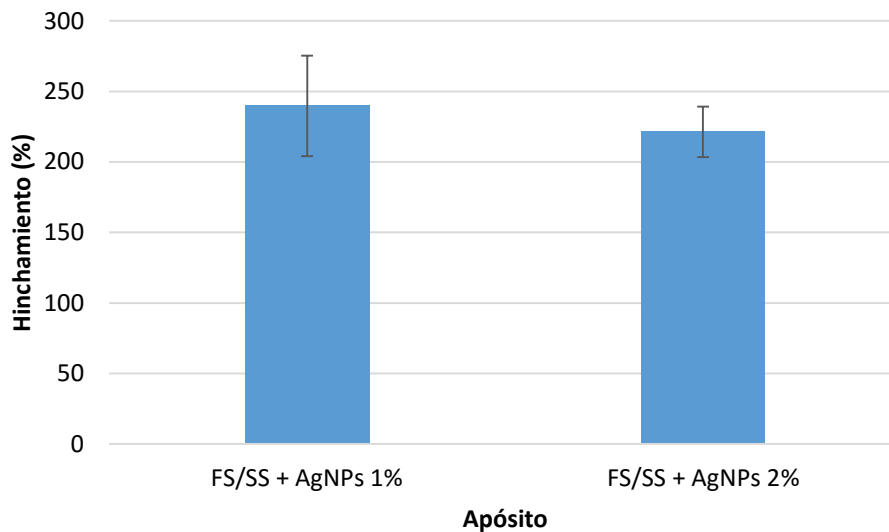


Figura 15 Porcentaje de hinchamiento para los apósitos obtenidos.

6.3.8. Ensayo antimicrobiano

En la figuras 16 se observan las colonias de *E. Coli* y *S. aureus* con las cuales se realizó el ensayo antimicrobiano, se realizó una inoculación mediante el método de estriado de placas con el fin de determinar si existe alguna contaminación del medio que lleven a una afectación sobre las bacterias, además de observar las colonias discretas con el fin de ver características que ayudan a identificar las colonias, se puede apreciar que las colonias no presentan ningún tipo de contaminación.

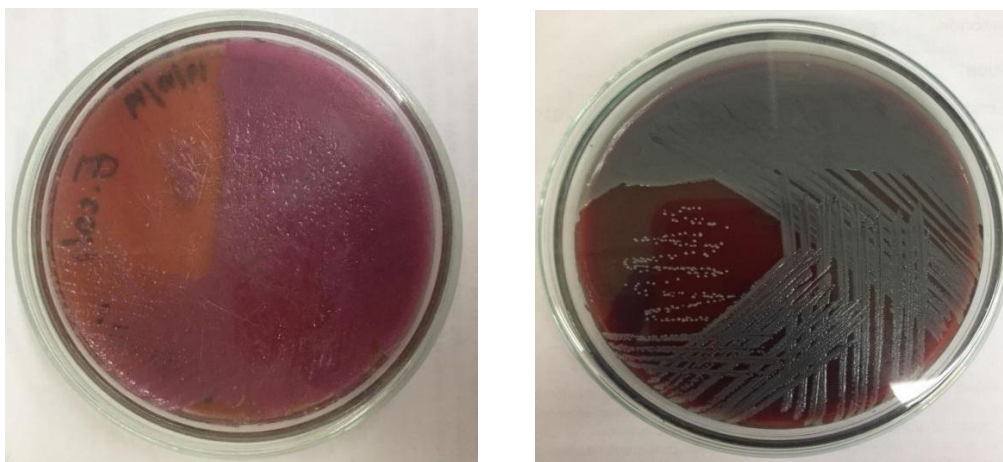


Figura 16 Colonias de A. E. Coli B. S. Aureus en agar sangre.

En la figuras 17 y 18 se observan 5 discos con diámetros de 5 mm, entre los cuales se cuanta el control positivo para el cual se usó clorhexidina, como control negativo se usó solución salina, en el centro se tiene la solución de AgNPs la cual fue usada en concentraciones del 1% y 2% para elaborar los apósitos, también se tiene un disco para fibroína y sericina con PVA, puesto que estos son los elementos que constituyen los apósitos, se puede evidenciar que existe un halo de inhibición para el control positivo y para la solución de AgNPs, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, también es notorio que los polímeros no generan un halo de inhibición al igual que el control negativo para las dos cepas trabajadas. Este resultado para la sericina ya había sido registrado con estas mismas bacterias por Gang T et al (2019), quienes trabajaron este polímero como hidrogel para la liberación controlada de fármacos [11]; por otro lado un estudio realizado por Roli P et al (2019) mostró que la fibroína ante estas dos bacterias no posee ningún efecto inhibitorio. Se corrobora entonces los resultados obtenidos para sericina y fibroína en este proyecto. No obstante, es notorio que la solución de AgNPs tiene un efecto inhibitorio sobre bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas tal como lo registro Nassima D et al (2019) donde se evidenció este mismo comportamiento de las AgNPs, confirmando así la capacidad antibacteriana de este material [12].

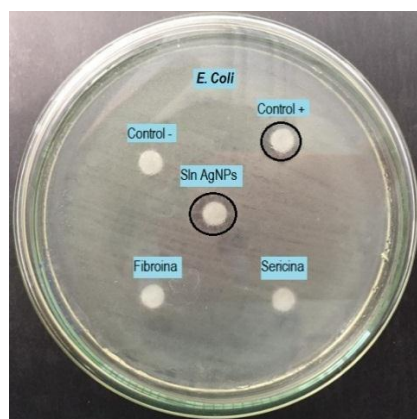


Figura 17 Prueba antimicrobiana con *E. coli* para materiales individuales.

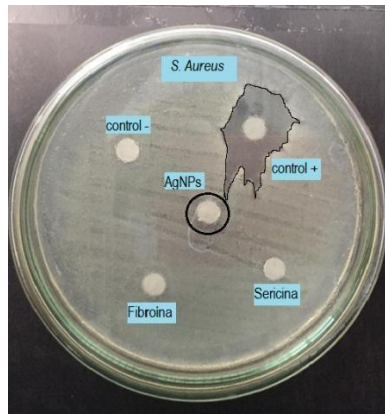


Figura 18 Prueba antimicrobiana con *S. aureus* para materiales individuales.

Como se evidencia en la figura 19 el control positivo posee un halo de inhibición de gran proporción, al observar los halos obtenidos para los apósitos obtenido se pudo determinar que tenían un diámetro de 0,51 mm para todos las composiciones, sin embargo se observó una especie de halo alrededor de los discos, no se puede afirmar que sea un halo de inhibición debido al método usado, pero sí que se redujo la cantidad de las colonias bacterianas en este lugar en comparación con el agar, algunos autores que han obtenido resultados similares afirman que existe un comportamiento inhibitorio leve [13].

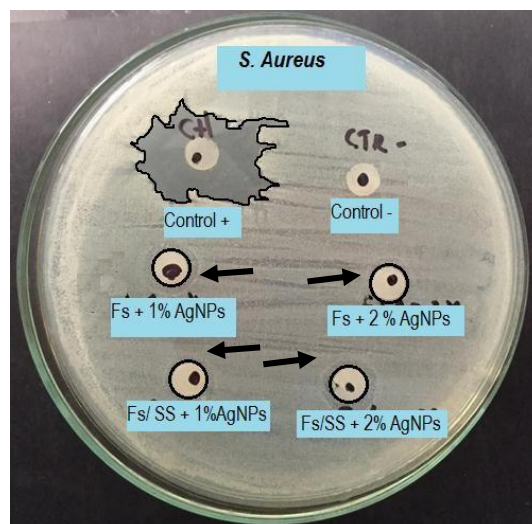


Figura 19 Halos de inhibición ante *S. aureus* de los apósitos obtenidos.

En la figura 20 se muestra como 2 colonias de bacterias crecieron justo después de la zona observada en la figura 19, la cual se le atribuye una leve capacidad inhibitoria, esta muestra fue tomada a los 4 días después del registro de las 24 h, si bien este dato no hace parte del ensayo puesto que los resultados por triplicado siempre se tomaron a las 24 horas luego del cultivo, si se pudo evidenciar con este registro que si existe un inhibición pequeña en la zona más clara que da cuenta de una disminución del crecimiento de bacterias, y que en el disco y alrededor del aproximadamente 0.01 mm existe inhibición del crecimiento bacteriano.

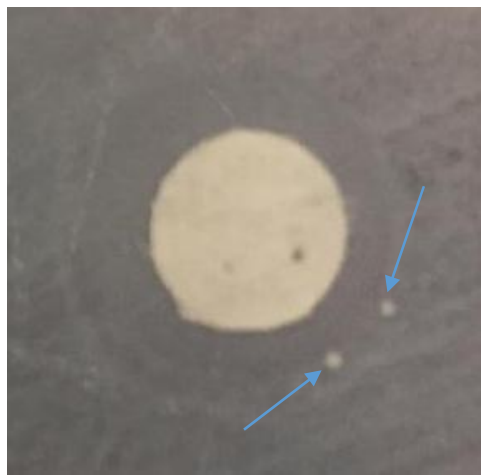


Figura 20 Apósito compuesto de fibroína/sericina + AgNPs 2% 4 días después del ensayo antibacteriano.

Como se evidencia en la figura 21 el control positivo posee un halo de inhibición menor con respecto al *S. aureus*, al observar los halos obtenidos para los apósitos obtenido se pudo determinar que tenían un diámetro de 0,51 mm para todas las composiciones, este resultado es igual al obtenido contra el *E. coli* pero en este caso no se tuvo el indicio de un halo de inhibición leve, sin embargo el halo formado alrededor del disco era más notorio cómo se logra observar en la figura 19, la cual es un zoom a las cuatro muestras donde se logra apreciar lo que cubre el círculo negro en la figura 22.

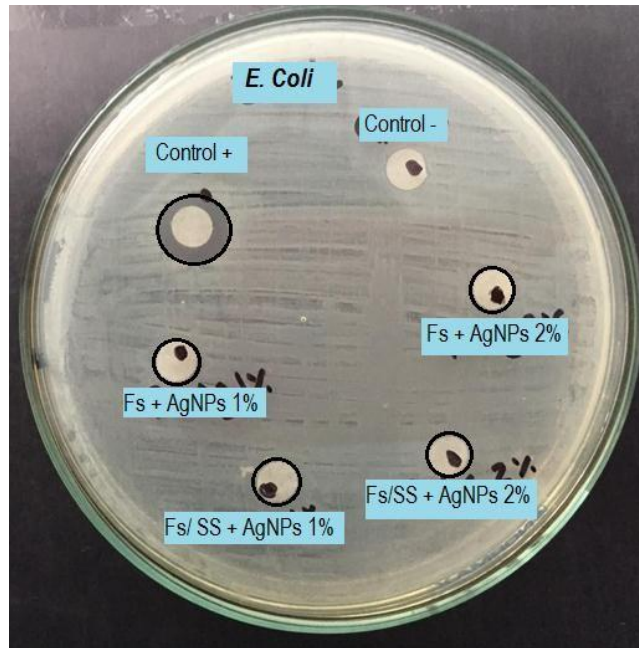


Figura 21 Halos de inhibición ante *E. coli* de los apósitos obtenidos.

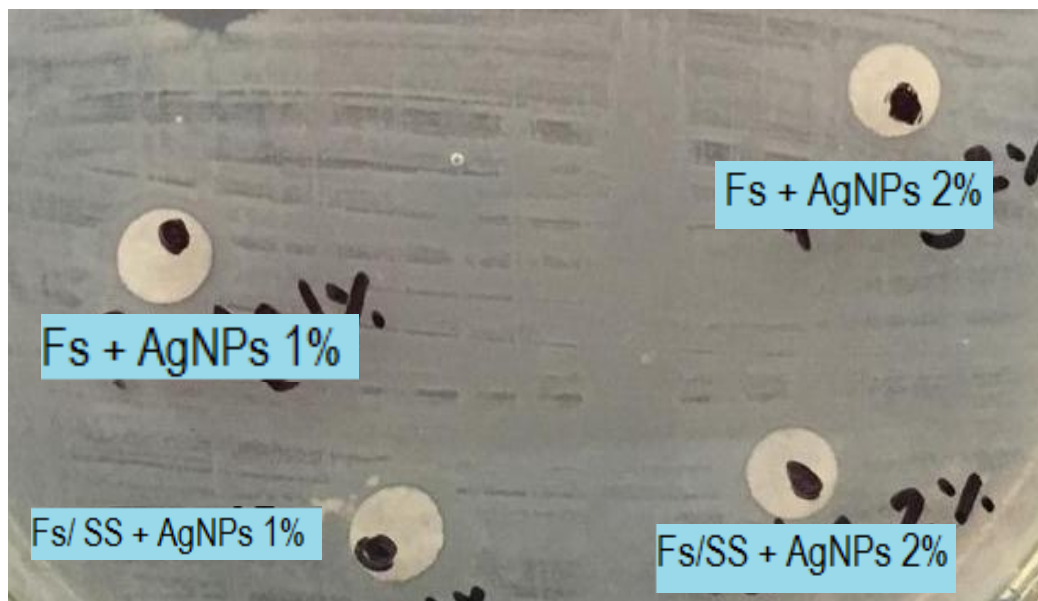


Figura 22 Aumento de halos de inhibición ante *E. coli* de los apósitos obtenidos.

Si bien los resultados obtenidos no presentan un halo de inhibición considerable al adicionar AgNPs y tampoco cuando se aumenta la concentración de estas en los apósitos, si se pudo determinar que no existía bacterias en el disco ni alrededor de el en aproximadamente 0.01 mm, algunos autores registran grandes halos de inhibición en apósitos de sericina o fibroína suplementados con AgNPs[14][9][15], sin embargo existen otros estudios donde los halos de inhibición son bajos pero son atribuidos a las

AgNPs [16], tal como es el caso de este proyecto, debido a que los polímeros individualmente no poseen esta capacidad como se evidenció en la figuras 17 y 18.

Existen diversas hipótesis del porque al adicionar las AgNPs al apósito se pierde de gran manera la capacidad antibacteriana, una de ellas es que la fibroína tiene la capacidad de funcionar como agente reductor [17] y están cubriendo las AgNPs de tal forma que no les permite el contacto con el exterior, otro factor que puede ocasionar el resultado es que al igual que lo sucedido con el ensayo de UV-Vis que se enmascaraban las AgNPs a altos porcentajes de PVA, esté sucediendo el mismo fenómeno puesto que la capa generada por la fibroína donde están embebidas las AgNPs tiene un 5 % de PVA con un peso molecular elevado, lo que ocasiona que las AgNPs al estar en menor proporción sean embebidas completamente por este polímero, de igual forma lo que se busca es proteger a la herida de contaminación por microorganismo y quedó evidenciado que si bien el halo de inhibición es pequeño sobre el disco que hace semejanza al apósito no hubo crecimiento bacteriano, cumpliendo así con la propiedad de tener un apósito antimicrobiano.

6.3.9. Citotoxicidad

Como se observa en la figura 23 existe una coloración rosa en el plato de cultivo, lo que indica que las composiciones fibroína + AgNPs al 1% y 2% y el apósito compuesto de fibroína/ sericina + AgNPs al 1% y 2% son positivos para viabilidad celular.

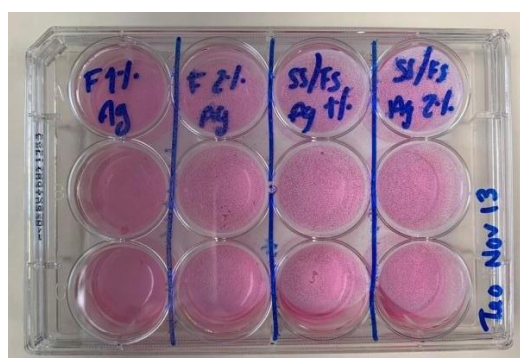


Figura 23 Placa de cultivo perteneciente a las diferentes películas poliméricas adicionadas con resazurina (2 horas de incubación).

Como se puede notar en la figura 24, las tres primeras columnas de pozos que pertenecen a células solas, fibroína y sericina respectivamente muestran una tonalidad rosa lo que indica que existe viabilidad celular, sin embargo la cuarta columna correspondiente al control negativo que es AgNO_3 (0.1M), muestra una tonalidad azul lo cual indica una pérdida de viabilidad celular, este resultado es muy importante puesto que esta es la sal precursora de las AgNPs y si esta existe en los apósitos generaría una pérdida celular, por lo cual se puede afirmar que la sal fue reducida a AgNPs.



Figura 24 Placa de cultivo perteneciente a las películas control y células sin tratamiento adicionadas con resazurina (2 horas de incubación).

La figura 25 la cual muestra cómo fue la viabilidad celular de los diferentes compuestos del apósito, se puede notar claramente como el control negativo disminuye significativamente la viabilidad celular, sin embargo al observar el apósito generado con fibroína + AgNPs al 1% aumenta la viabilidad celular, un resultado importante puesto que se evidencia que esta composición ayuda a la proliferación celular, cabe notar también que el resto de formulaciones no tiene una diferencia significativa con el control positivo, lo que indica que los apósitos generados no disminuyen la viabilidad celular y al contrario mantienen estables o mejoran esta condición. Los estudios generados para sericina, fibroína y AgNPs muestran que la adición de AgNPs ayuda a la proliferación celular siempre y cuando esté en pequeños porcentajes, para la sericina se tiene un efecto positivo sobre la proliferación celular llegando a aumentar la viabilidad celular en un 145 %, un estudio realizado en ratones demostró que este polímero aceleró el proceso de cicatrización. Para la fibroína se ha reportado que ayuda a la

adherencia celular, además que aumenta la proliferación celular influenciado también por la porosidad de los apósitos, histológicamente se ha encontrado que el uso de apósitos con fibroína tienen una aparición de apéndices cutáneos como vasos sanguíneos y folículos pilosos, una característica que ayuda a mejorar el aspecto del tejido después de la lesión [1], [11], [18], [19] lo reportado en la literatura confirma los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, además resulta de gran importancia el hecho de obtener apósitos porosos puesto que esto ha evidenciado un aumento en la proliferación celular. Este ensayo es vital puesto que a la hora de usar el apósito en una herida no solo se espera que se disminuya la probabilidad de tener una contaminación por microorganismos, sino que la herida sane en menor tiempo y el tejido reestructurado tenga condiciones similares al tejido sano.

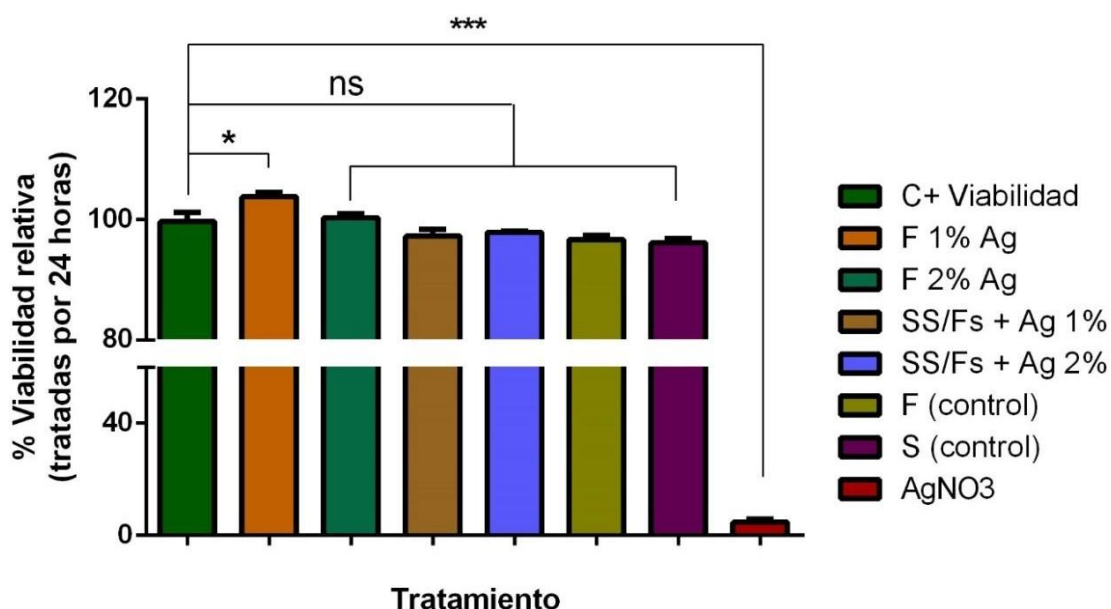


Figura 25 Evaluación de la citotoxicidad de los apósitos obtenidos en células NiH3T3 por un tiempo de 24 horas mediante resazurina.

Conclusiones

- Mediante el protocolo propuesto para la elaboración de los apósitos se lograron obtener con estructura multicapa, compuesta de dos capas porosas y que parecen tener una unión adecuada. Este apósito presenta buena capacidad de hinchamiento y un comportamiento mecánico influenciado por la adición de nanopartículas de plata.

- La resistencia mecánica de los apósitos multicapa disminuyó respecto a las películas individuales, posiblemente por la presencia de nanopartículas que actúan como concentradores de tensión.
- La fibroína y sericina no poseen un comportamiento antimicrobiano, pero si presentan un buen comportamiento en el ensayo de viabilidad celular.
- Las AgNPs presentan una capacidad antimicrobiana igual que la clorhexidina, sin embargo, al ser embebidas por los polímeros pierden esta capacidad, no siendo evidente dicha propiedad en los apósitos fabricados.
- Se obtuvieron apósitos con alta viabilidad celular y con una capacidad antimicrobiana leve.

Bibliografía

- [1] S. Patil and N. Singh, "Antibacterial silk fibroin scaffolds with green synthesized silver nanoparticles for osteoblast proliferation and human mesenchymal stem cell differentiation," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 176, no. September 2018, pp. 150–155, 2019.
- [2] J. S. Oh and E. J. Lee, "Engineered dressing of hybrid chitosan-silica for effective delivery of keratin growth factor and acceleration of wound healing," *Mater. Sci. Eng. C*, 2019.
- [3] G. Tao *et al.*, "Bioinspired design of AgNPs embedded silk sericin-based sponges for efficiently combating bacteria and promoting wound healing," *Mater. Des.*, 2019.
- [4] G. Tao *et al.*, "Design and performance of sericin/poly(vinyl alcohol) hydrogel as a drug delivery carrier for potential wound dressing application," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 101, no. May 2018, pp. 341–351, 2019.
- [5] M. M. Sayed *et al.*, "Enhancing mechanical and biodegradation properties of polyvinyl alcohol/silk fibroin nanofibers composite patches for Cardiac Tissue Engineering," *Mater. Lett.*, vol. 255, p. 126510, 2019.
- [6] S. Asghari, S. Logsetty, and S. Liu, "Imparting commercial antimicrobial dressings with low-adherence to burn wounds," *Burns*, 2016.
- [7] Z. Chen, S. Niazi, and F. Bobaru, "A peridynamic model for brittle damage and fracture in porous materials," *Int. J. Rock Mech. Min. Sci.*, 2019.
- [8] S. Ghalei, J. Nourmohammadi, A. Solouk, and H. Mirzadeh, "Enhanced cellular response elicited by addition of amniotic fluid to alginate hydrogel-electrospun silk fibroin fibers for potential wound dressing application," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2018.
- [9] H. He *et al.*, "Preparation and characterization of silk sericin/PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol.

104, pp. 457–464, 2017.

[10] B. Lanel, D. Barthès-Biesel, C. Regnier, and T. Chauvé, “Swelling of hydrocolloid dressings,” *Biorheology*, 1997.

[11] G. Tao *et al.*, “Bioinspired design of AgNPs embedded silk sericin-based sponges for efficiently combating bacteria and promoting wound healing,” *Mater. Des.*, vol. 180, p. 107940, 2019.

[12] N. Dairi, H. Ferfera-Harrar, M. Ramos, and M. C. Garrigós, “Cellulose acetate/AgNPs-organoclay and/or thymol nano-biocomposite films with combined antimicrobial/antioxidant properties for active food packaging use,” *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.

[13] L. K. H. Rocha *et al.*, “Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications,” *Process Biochem.*, vol. 61, no. June, pp. 163–177, 2017.

[14] C. M. Srivastava, R. Purwar, and A. P. Gupta, “Enhanced potential of biomimetic, silver nanoparticles functionalized *Antheraea mylitta* (tasar) silk fibroin nanofibrous mats for skin tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019.

[15] P. J. Babu, M. Doble, and A. M. Raichur, “Silver oxide nanoparticles embedded silk fibroin spuns: Microwave mediated preparation, characterization and their synergistic wound healing and anti-bacterial activity,” *J. Colloid Interface Sci.*, 2018.

[16] M. Shahid, Y. Zhou, X. W. Cheng, M. S. Zar, G. Chen, and R. C. Tang, “Ferulic acid promoted in-situ generation of AgNPs@silk as functional colorants,” *J. Clean. Prod.*, 2018.

[17] S. Patil, T. George, and K. Mahadik, “Green synthesized nanosilver loaded silk fibroin gel for enhanced wound healing,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 30, pp. 30–36, 2015.

[18] D. Zhang *et al.*, “In vivo study of silk fibroin/gelatin electrospun nanofiber dressing loaded with astragaloside IV on the effect of promoting wound healing and relieving scar,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 52, no. October 2018, pp. 272–281, 2019.

[19] S. Chao *et al.*, “Synthesis and characterization of tigecycline-loaded sericin/poly(vinyl alcohol) composite fibers via electrospinning as antibacterial wound dressings,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 44, no. February, pp. 440–447, 2018.

Conclusiones y consideraciones finales

- La realización de un diseño de experimentos para la síntesis de nanopartículas de plata AgNPs, concluyo con la síntesis de un tipo de partículas con características de tamaño y concentración optimizadas. Además, que la solución de AgNPs tenían una gran capacidad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*
- Se pudo estandarizar un protocolo para la obtención de sericina y fibroína, en los cuales siempre se obtuvo el mismo valor de concentración del polímero. Se identificaron los grupos funcionales propios de cada biopolímero lo cual verifíco los procesos adecuados de extracción.
- Para las películas fabricadas se concluye que realizar un ciclo de congelamiento mejora considerablemente las propiedades mecánicas de las películas de fibroína y sericina, que la adición de glicerol disminuye la separación de fases entre la fibroína y el PVA, puesto que mejora la interacción entre los materiales. Finalmente, que el PVA ayuda a mejorar las propiedades mecánicas de películas compuestas de fibroína y sericina.
- Fue posible fabricar apósitos multicapa de fibroína y sericina, aprovechando al máximo cada una de las propiedades de los materiales. Los apósitos obtenidos tuvieron poros lo cual ayuda a mejorar el crecimiento celular, puesto que ayuda al intercambio gaseosos. Los apósitos obtenidos tienen alta viabilidad celular en fibroblastos, y poseen una actividad antimicrobiana leve, lo cual los hace un candidato prometedor para su aplicación con quemaduras.

Como consideraciones finales se recomienda usar un PVA de menor peso molecular, puesto que este podría estar disminuyendo la capacidad antibacteriana de los apósitos obtenidos debido a que embebe las AgNPs. También se recomienda realizar estudios con los apósitos obtenidos con otras bacterias para hacer un espectro de acción más grande para estos, y pasar a un nivel de experimentación *in vivo* para observar cómo es el comportamiento del apósito obtenido en condiciones semejantes al de su aplicación en el tejido humano.