



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA QUÍMICA – BIOSEPARACIONES

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE POLI(ÁCIDO GÁLICO)
ENTRECruzADO CON CARBOXIMETIL-CELULOsa CON POTENCIALES
APLICACIONES BIOMÉDICAS.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
IQ. ALEJANDRA ROMERO MONTERO

TUTOR PRINCIPAL
DR. MIQUEL GIMENO SECO, FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. JUNIO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Alberto Tecante Coronel
Secretario: Dr. Joaquín Palacios Alquisira
Vocal: Dr. Eduardo Vivaldo Lima
1 er. Suplente: Dra. Amelia Ma. De G. Farrés González Sarabia
2 d o. Suplente: Dr. Miquel Gimeno Seco

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Laboratorio 314, Conjunto E de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

FIRMA

(Segunda hoja)

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría No. 392896 y al programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP), Facultad de Química de la UNAM No. 5000-9104.

Adicionalmente, agradezco al CONACyT por el apoyo para la realización de una estancia de investigación en el grupo “*Synthetic Polymers: Structure and Properties. Biodegradable Polymers. PSEP*” en la Universidad Politécnica de Catalunya. Tutor: Dr. Jordi Puiggali Bellalta. Barcelona, España 2016.

Se agradece la asesoría técnica de la Dra. Carmina Montiel Pacheco (FQ-UNAM) y la M. en C. Mariana Ramírez Gilly (FQ-UNAM).

A mi familia, en especial a Pablo.

Mi compañero de aventuras.

ÍNDICE:

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO 1. ANTECEDENTES.....	4
1.1 Biopolímeros.....	4
1.2 Biocompósitos	4
1.3 Aplicaciones de polímeros naturales y biocompósitos en biomédicina.....	5
1.3.1 Ingeniería biomédica.....	6
1.3.2 Celulosa.....	6
1.3.3 Carboximetilcelulosa (CMC)	8
1.4 Polifenoles.....	9
1.4.1 Propiedades estructurales	9
1.4.2 Propiedades antioxidantes.....	10
1.4.3 Mecanismo de acción antioxidante.....	11
1.4.4 Métodos de síntesis	12
1.4.4.1 Síntesis enzimática de polifenoles	12
1.4.4.2 Lacasa	13
1.4.4.3 Mecanismo catalítico de las lacasas.....	15
1.4.5 Ácido gálico	17
1.4.6 Poli(ácido gálico)	18
CAPITULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
2.1 Hipótesis.....	20
2.2 Objetivos.....	20
2.2.1 Objetivo general.....	20

2.2.2	Objetivos particulares.....	20
CAPITULO 3. METOLOGÍA EXPERIMENTAL		21
3.1	Materiales.....	21
3.2	Determinación de la actividad enzimática	21
3.3	Síntesis enzimática de PGAL	21
3.4	Reacción de entrecruzado.....	22
3.5.	Caracterización fisicoquímica.....	23
3.5.1	Resonancia Magnética Nuclear	23
3.5.2	Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier	23
3.5.3	Cromatografía de exclusión por tamaño	24
3.6	Pruebas mecánicas y de barrera.....	24
3.6.1	Acondicionamiento.....	24
3.6.2	Medición del espesor	24
3.6.3	Propiedades mecánicas.....	24
3.6.3.1	Ensayo de tracción	25
3.6.3.2	Ensayo de punción	25
3.6.4	Permeabilidad al vapor de agua	26
3.6.5	Ángulo de contacto	27
3.7	Ensayo de capacidad antioxidante por Resonancia Paramagnética Electrónica de sólidos	27
3.8	Ensayos microbiológicos	28
CAPITULO 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....		29
4.1	Síntesis enzimática de PGAL	29
4.2	Reacción de entrecruzado PGAL-CMC.....	31

4.3 Formulación del material	32
4.4 Propiedades mecánicas	33
4.5 Permeabilidad al vapor de agua	41
4.6. Ángulo de contacto.....	43
4.7 Capacidad antioxidante	44
4.8 Actividad antimicrobiana.....	49
CONCLUSIONES	51
TRABAJO FUTURO	51
REFERENCIAS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Diferentes rutas de obtención de biocompuestos.....	5
<i>Figura 2.</i> Estructura molecular de la celulosa (n=DP, grado de polimerización)	7
<i>Figura 3.</i> Propiedades fisicoquímicas básicas de los polifenoles.....	9
<i>Figura 4.</i> Estructura cristalina de Lacasa de <i>Trametes versicolor</i> (Piontek et al., 2002).....	14
<i>Figura 5.</i> Representación del sitio activo de la lacasa donde se indica el flujo de electrones, oxígeno y sustrato (Giardina et al., 2010).....	15
<i>Figura 6.</i> Mecanismo de reducción de O ₂ por núcleos multicobre hacia agua (modificado de Giardina et al., 2010).	16
<i>Figura 7.</i> Estructura tridimensional de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i> mostrando los canales de entrada de oxígeno y salida de agua (esferas rojas) (Piontek, et al., 2002).....	17
<i>Figura 8.</i> Estructura del AG.....	18
<i>Figura 9.</i> Esquema de síntesis de PGAL	19
<i>Figura 10.</i> Sistema de obtención de PGAL, RCT (1,4), matraz (2), baño de glicerol (3), sensor de oxígeno libre (5), electrodo de oxígeno libre (6), salida de oxígeno (7), bombas de aire (8).....	22
<i>Figura 11.</i> Sistema de reacción de entrecruzado, RCT (1,4), matraz (2) y baño de glicerol (3).....	23
<i>Figura 12.</i> Sistema de prueba de tracción. Mordazas (a), Probeta (b).....	25

<i>Figura 13.</i> Sistema de prueba de punción. Superficie punzante (a), anillo metálico (b).....	26
<i>Figura 14.</i> Celda de prueba.....	26
<i>Figura 15.</i> Síntesis de PGAL.....	29
<i>Figura 16.</i> Espectro de RMN- ¹ H para PGAL [D ₂ O, 400 MHz].....	30
<i>Figura 17.</i> Espectro de FT-IR (PGAL).....	30
<i>Figura 18.</i> Entrecruzado PGAL-CMC.....	31
<i>Figura 19.</i> Espectro de FT-IR, PGAL (a), CMC (b), AC (c), PGAL-AC-CMC (d). ...	32
<i>Figura 20.</i> Señal típica obtenida del equipo SINTECH 1/S (muestra 052).	34
<i>Figura 21.</i> Efecto de la concentración de PGAL sobre el esfuerzo de fractura a la tracción.....	36
<i>Figura 22.</i> Efecto de la concentración de glicerol sobre el esfuerzo de fractura a la tracción.....	37
<i>Figura 23.</i> Efecto de la concentración de glicerol sobre el módulo de Young.	38
<i>Figura 24.</i> Efecto de la concentración de PGAL sobre el esfuerzo de fractura a la punción.....	40
<i>Figura 25.</i> Efecto de la concentración de glicerol sobre el esfuerzo de fractura a la punción.....	41
<i>Figura 26.</i> Ángulo de contacto.....	44
<i>Figura 27.</i> Espectro de EPR en sólido para PGAL.....	46

<i>Figura 28.</i> Espectro de EPR en sólido para todas las formulaciones.....	47
<i>Figura 29.</i> Espectro de EPR en sólido, 054 (a), 053 (b) y 052 (c).....	47
<i>Figura 30.</i> Espectro de EPR en sólido, 104 (a), 103 (b) y 102 (c).....	48
<i>Figura 31.</i> Espectro de EPR en sólido, 154 (a), 153 (b), 152 (c).....	48
<i>Figura 32.</i> Halos de inhibición, <i>E. faecalis</i> (a), <i>S. aureus</i> (b), <i>E. coli</i> (c), <i>P. aeruginosa</i> (d).....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Nomenclatura de las muestras</i>	32
Tabla 2: <i>Propiedades mecánicas (ensayo de tracción).</i>	35
Tabla 3: <i>Propiedades mecánicas (ensayo de punción)..</i>	39
Tabla 4: <i>Permeabilidad de vapor de agua</i>	42
Tabla 5: <i>Cantidad de inóculo</i>	49
Tabla 6: <i>Halos de inhibición</i>	50

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

^1H RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AG	Ácido Gálico
ArOH	Polifenoles
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BDE	Entalpía de disociación de enlaces (por sus siglas en inglés)
CMC	Carboximetilcelulosa
CV	Coeficiente de variación
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)
DPPH	2,2- difenilpicrilhidracil
DS	Grado de sustitución (por sus siglas en inglés)
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica (por sus siglas en inglés)
FT-IR (ATR)	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (Reflectancia atenuada)
HAT	Transferencia de un átomo de hidrógeno (por sus siglas en inglés)
IP	Potencial de ionización (por sus siglas en inglés)
LDPE	Polietileno de baja densidad (por sus siglas en inglés)
LTV	Lacasa de <i>Trametes Versicolor</i>
NHE	Electrodo normal de hidrógeno (por sus siglas en inglés)
PGAL	Poli(ácido gálico)
R $^{\bullet}$	Radical Libre
RID	Detector de índice de refracción
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEC	Cromatografía por exclusión de tamaño (por sus siglas en inglés)
SEM	Microscopia electrónica de barrido (por sus siglas en inglés)
SET	Transferencia singular de electrones (por sus siglas en inglés)
U	Unidades de actividad enzimática
UFC	Unidades formadoras de colonias
WVP	Permeabilidad de vapor de agua
σ	Esfuerzo

RESUMEN

El interés en los polímeros biodegradables se ha incrementado debido a su mayor demanda en aplicaciones biomédicas, incluyendo la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos, la liberación controlada de fármacos y la terapia génica. Algunos de los polímeros más utilizados en este campo son la policaprolactona (PCL), poliglicólido y sus copolímeros que son polímeros con origen en la síntesis química.

En este trabajo se utilizó un material polimérico sintetizado enzimáticamente, el poli(ácido gálico) (PGAL), el cual fue desarrollado en el grupo de investigación, que por su origen y método de síntesis es amigable con el ambiente y posee cualidades biológicas benéficas para la salud humana. Con el fin de obtener un material que fuera resistente, manejable y potenciar su uso en biomedicina se usó como matriz la carboximetilcelulosa (CMC) que es el biopolímero más abundante y biocompatible sobre la tierra.

El entrecruzado de PGAL con CMC se obtuvo mediante una reacción de condensación en medio acuoso utilizando como agente entrecruzante al ácido cítrico (AC). Se estudió el efecto de la concentración de PGAL y de glicerol (plastificante) en las propiedades mecánicas, permeabilidad de vapor de agua, actividad antimicrobiana y potencial antioxidante. Mediante FT-IR(ATR) se caracterizó el entrecruzado visualizando la presencia característica de los grupos funcionales de cada componente.

La resistencia a la tracción y la punción se incrementó al aumentar la cantidad de PGAL y glicerol en el material. El valor más alto de esfuerzo de fractura a la tracción fue de 31 MPa y un módulo de Young de 5.85 MPa; mientras que la para la punción, el esfuerzo de fractura fue de 75.8 MPa.

La permeabilidad al vapor de agua del material incremento al aumentar la cantidad de glicerol mientras que los valores de ángulo de contacto obtenidos son característicos de un material hidrófilo.

La capacidad antioxidante del material se obtuvo mediante resonancia paramagnética electrónica y mostró un comportamiento dependiente de la cantidad de PGAL en la muestra. El material muestra potencial antimicrobiano cuando no se neutraliza atacando cepas de Gram positivo y negativo.

En conjunto las características estudiadas del material lo promueven como una opción novedosa a probar dentro de la ingeniería de tejidos.

INTRODUCCIÓN

Los tejidos son estructuras constituidas por un conjunto de células iguales que están organizadas y distribuidas a fin de realizar una función fisiológica específica y que requieren ciertas propiedades mecánicas y de estructura para lograrlo. Como consecuencia del ritmo de vida es común que los tejidos se dañen (huesos, piel, cartílagos y músculos) y que esto tenga severas repercusiones en la salud humana y en algunos casos no se pueda conservar la vida.

La ingeniería de tejidos es una rama de la biomedicina que busca encontrar materiales nuevos que ayuden a reparar o reemplazar tejidos dañados en el cuerpo humano, mediante la combinación de células, ingeniería de materiales, bioquímica y fisicoquímica, incluye términos por demás diversos lo que la convierte en un campo inminentemente multidisciplinario y de gran impacto actualmente.

Los objetivos son encontrar un biopolímero que sea biocompatible, -que no provoque reacciones adversas en el organismo, que se degrade de forma paulatina a medida que se forma el nuevo tejido, transfiriendo así las cargas de forma progresiva, reabsorbible y que genere productos de degradación no tóxicos y fácilmente eliminables por el cuerpo.

En este trabajo se muestran los primeros pasos para el desarrollo de un material con base en una matriz de carboximetilcelulosa y poli(ácido gálico) de origen enzimático que podría potencialmente ser útil en la regeneración de tejido dérmico. Se incluyen las caracterizaciones mecánicas y propiedades de barrera al vapor de agua así como los estudios de microbiología y potencial antioxidante.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas producidas por sistemas biológicos; a sus derivados se les conoce como bioplásticos y son aquéllos que están hechos a partir de fuentes renovables y que pueden ser reciclados por métodos biológicos; no se obtienen de combustibles fósiles por lo que reducen las emisiones de CO₂ al ambiente reduciendo el efecto invernadero. Además de ser sustentables pueden descomponerse por la acción de agentes biológicos y estar en contacto con sistemas vivos sin producir un efecto adverso, es decir, son altamente biodegradables y biocompatibles.

Actualmente los bioplásticos se usan en aplicaciones industriales tales como el empaque de alimentos, la agricultura y la higiene y se prevé el crecimiento exponencial de su uso en campos como la electrónica, la construcción y la biomedicina. La biomedicina es la rama de la ciencia médica que con base en los principios de la biología investiga y promueve el desarrollo de nuevos materiales y métodos aplicables en la práctica clínica.

El estudio de los bioplásticos ha atraído el interés de muchos científicos en el mundo a pesar de poseer cualidades inferiores a sus contrapartes sintéticas y tener una aplicación limitada en áreas dominadas por plásticos obtenidos de combustibles fósiles. Con el fin de mejorar las propiedades de los bioplásticos se considera la introducción de las mezclas de polímeros así como los composites buscando mejorar propiedades como resistencia, propiedades de barrera, estabilidad térmica, etc. (Pilla, 2011).

1.2 Biocompósitos

En el mundo de los materiales los biocompósitos son de gran importancia debido a que presentan propiedades que no existen naturalmente. Se pueden adaptar sus propiedades con un diseño selectivo de su composición y de su proceso de síntesis, por lo que su campo de aplicación es sumamente amplio.

Recientemente el foco de los esfuerzos ingenieriles van ligados al mejoramiento de procesos y materiales con el fin de reducir la huella de carbono por lo que está en boga reforzar polímeros naturales presentando las ventajas de ser naturalmente renovables, de bajo costo, baja densidad, reducen el consumo de energía en su fabricación, resistencia específica y elasticidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad.

Estos biocompósitos hechos a partir de bioplásticos son también llamados biocompósitos verdes y son más amigables con el medio ambiente en comparación con un polímero sintético, en la *Figura 1* se muestran las rutas que llevan a la obtención de biocompósitos.

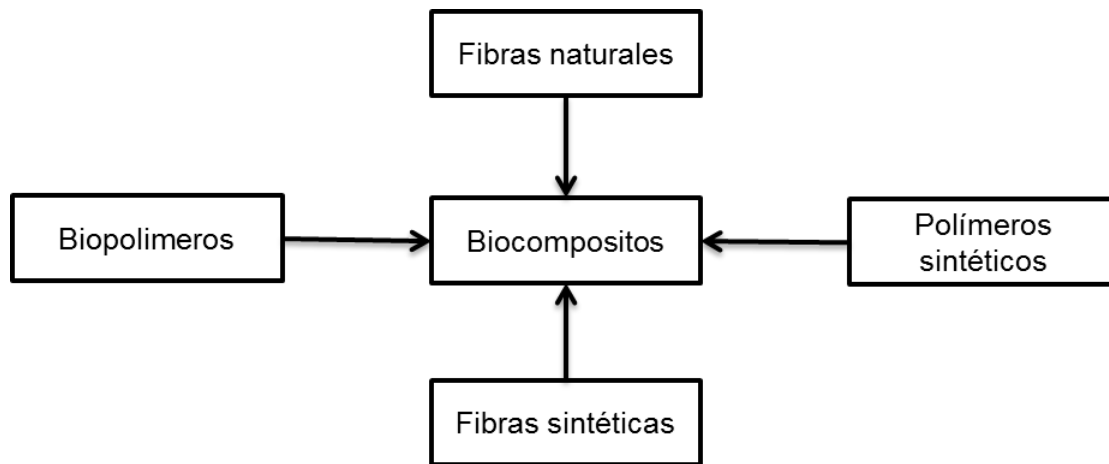


Figura 1. Diferentes rutas de obtención de biocompósitos.

1.3 Aplicaciones de polímeros naturales y biocompósitos en biomédicina

Los bioplásticos verdes o plásticos orgánicos son aquellos que provienen de fuentes naturales renovables especialmente de biomasa; pueden ser degradables o no degradables dependiendo de su origen. Los polímeros naturales o bioplásticos verdes han tenido una importante contribución en las ciencias médicas y la ingeniería. Entre los más estudiados están la celulosa, el almidón, la quitina, el quitosano y los polilactidos.

1.3.1 Ingeniería biomédica

La medicina es una ciencia que ha beneficiado a miles de personas en todo el mundo, reduciendo la tasa de mortalidad. En una perspectiva amplia la medicina es una ciencia multidisciplinaria pues trata aspectos que van desde el diagnóstico hasta la prevención y la cura de enfermedades; lo cual no puede ser logrado sin la ayuda de otras áreas de las ciencias y de la ingeniería.

La ingeniería biomédica es uno de los campos en los que la medicina y la ingeniería están relacionadas; incluye varios tipos de ingeniería como tejidos, genética, neurología, imagen médica, implantes, medicina biónica, biomecánica, bio-nanotecnología, ingeniería clínica entre otras.

La biomedicina en especial la ingeniería biomédica es un campo bastante amplio y diverso por lo que nos enfocaremos en el área donde los polímeros naturales, en especial la celulosa, han tenido un rol más significativo.

1.3.2 Celulosa

La celulosa es el polímero natural más abundante, renovable y biodegradable sobre la tierra. Su descubrimiento data de 1838 cuando fue aislada por Anselme Payen. La celulosa ha sido ampliamente estudiada incluyendo su biosíntesis, análisis estructural, modificaciones químicas, regeneración de materiales celulósicos y sus aplicaciones en varias áreas (Kang et al., 2015).

El entusiasmo por la investigación de la celulosa disminuyó con el renacer del interés por los materiales poliméricos derivados del petróleo, sin embargo, los problemas ambientales y el cada vez mayor desabasto de fuentes fósiles han recuperado la atención en su estudio y en el desarrollo de materiales con bases celulósicas (Klemm et al., 2005).

La elucidación de la estructura polimérica de la celulosa se atribuye a los trabajos de Hermann Staudinger en 1920 que a través de acetilaciones y desacetilaciones de celulosa encontró que no estaba formada por unidades aleatorias de D-

Glucosa, sino que éstas estaban unidas covalentemente formando largas cadenas; esto junto con otros estudios de Staudinger donde demuestra la existencia de otras cadenas moleculares marca el descubrimiento del estado molecular polimérico y sus reacciones únicas dando lugar a la aparición de la ciencia de polímeros.

La fascinación por la celulosa se debe a que es un biopolímero compuesto de unidades de glucosa que presenta estructuras diversas y específicas; con diferente reactividad y funciones. En contraste con los hidratos de carbono de bajo peso molecular la reactividad y propiedades de la celulosa se deben a las interacciones intermoleculares, reacciones de entrecruzamiento, tamaño de cadena y la distribución de los grupos funcionales a lo largo de la cadena.

La celulosa es un polisacárido y su peso molecular depende de la fuente de extracción y método de purificación. La cadena molecular está compuesta por unidades moleculares de β -D-Glucopiranosas que están enlazadas covalentemente mediante enlaces acetal entre el grupo OH del carbono C4 y el átomo de carbono C1 (Habibi et al., 2010). En principio esta es la conformación en la que se produce la celulosa biológicamente (*Figura 2*).

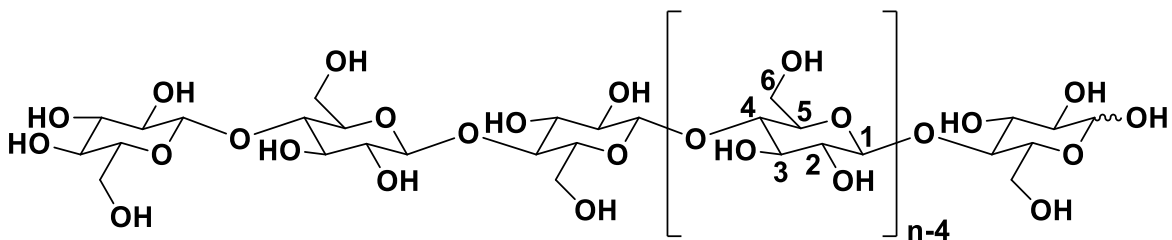


Figura 2. Estructura molecular de la celulosa ($n=DP$, grado de polimerización)

La celulosa es altamente cristalina y generalmente insoluble debido a la redes de enlaces de hidrógeno intermoleculares. Sin embargo, sus usos van desde la industria papelera y de cartón, membranas, tejidos, explosivos, materiales textiles y de construcción.

Las aplicaciones de la celulosa se ven limitadas por su baja o casi nula solubilidad en disolventes convencionales y por la diferencia en características respecto a polímeros sintéticos (o fósiles). Se han hecho importantes esfuerzos por modificar químicamente la estructura de la celulosa a fin de beneficiar ciertas características como la resistencia térmica, la mecánica, a la abrasión e incrementar su actividad antibacteriana y su solubilidad.

1.3.3 Carboximetilcelulosa (CMC)

La CMC es un polisacárido de cadena lineal, soluble en agua, aniónico que en su estado puro es blanco, cremoso, insípido y sin olor (Mario P. Adinugraha, 2005). La CMC es el éter iónico más importante de la celulosa, se obtuvo y se comenzó a producir en gran escala después de la segunda década del siglo XX.

Su alta demanda se debe a sus múltiples aplicaciones que van desde la producción de productos de aseo personal, la industria alimentaria (producto de relleno, emulsionante, fibra dietética), perforación de pozos petroleros, papel, pintura, industria farmacéutica (productos oftálmicos) y la medicina (cirugías de corazón, tórax y cornea así como diversas aplicaciones ortopédicas) (Klemm et al., 1998).

La CMC es un polielectrolito aniónico, soluble en agua, biocompatible, no tóxico, disponible y barato. Se obtiene mediante la alcalinización de la celulosa con sosa y su posterior carboximetilación con monocloroacetato de sodio. El grado de sustitución (DS, por sus siglas en inglés) depende de la activación de la celulosa, el medio de reacción, tiempo de reacción, la concentración de los reactivos y la temperatura; alcanzando valores de DS entre 0.4-1.4 (Reuben et al., 1983). La solubilidad en agua es directamente proporcional al DS, para valores por debajo de 0.4 es totalmente insoluble. (Adinugraha et al., 2005)

1.4 Polifenoles

Los compuestos fenólicos se definen químicamente como aquellas sustancias que tienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Watson et al., 2013)). Estos componentes se han relacionado con actividad biológica antiinflamatoria, anticancerígena y por prevenir las enfermedades cardiovasculares. Está reportado que los polifenoles tienen una fuerte actividad antioxidante asociada con su habilidad de atrapar radicales libres, evitar reacciones en cadena de radicales y quelar metales (Liu, et al., 2015). La acumulación de ciertos polifenoles (taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, entre otros) es benéfica para la salud.

1.4.1 Propiedades estructurales

Son sustancias anfífilas combinan el carácter hidrofóbico de su núcleo aromático plano y el carácter hidrófilo del sustituyente polar hidroxilo, que puede actuar como un donador o aceptor de enlaces de hidrógeno (*Figura 3*).

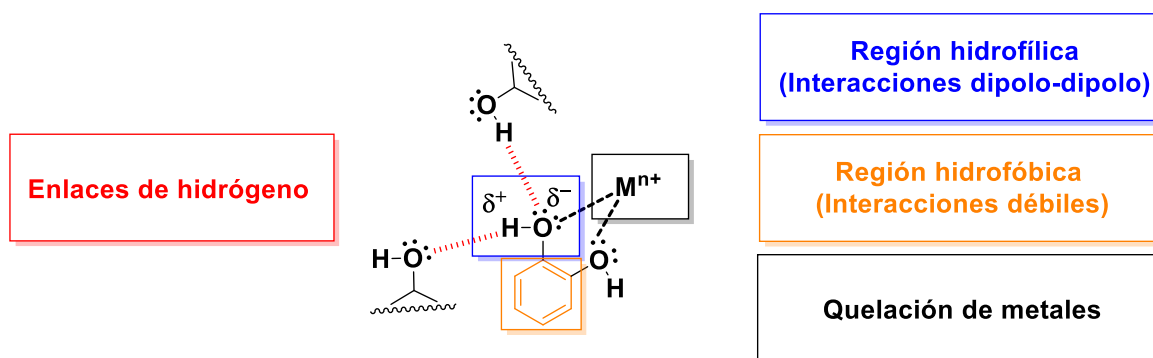


Figura 3. Propiedades fisicoquímicas básicas de los polifenoles.

Las interacciones hidrofóbicas de los apilamientos π y la formación de enlaces de hidrógeno son aparentemente dicotómicos, sin embargo, son efectos complementarios con los que los polifenoles interactúan con otras moléculas biológicas principalmente con proteínas (Dangles, 2008). La presencia de al

menos dos grupos hidroxilo en el mismo anillo aromático les brinda la característica de ser buenos quelantes de metales (Quideau et al., 2011)

1.4.2 Propiedades antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas, bajos niveles de antioxidantes o inhibición de enzimas antioxidantes, causan estrés oxidativo y puedan dañar o matar a las células (Nimmi et al., 2012)

Los radicales libres causan estrés oxidativo que a su vez está ligado con el origen de patologías como artritis, gastritis, cáncer y diabetes. Los antioxidantes naturales como la vitamina C, vitamina E y los polifenoles son ampliamente usados en el tratamiento de estas enfermedades.

La exposición a radicales libres es inevitable ya que muchas especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) son generadas en el proceso metabólico normal, sin embargo, hay muchas fuentes exógenas de radicales libres como la contaminación, el humo del cigarro, el ozono, la comida procesada y la radiación ultravioleta (Ji et al., 1997).

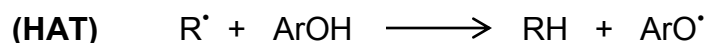
Los radicales libres son moléculas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual los convierte en moléculas inestables y altamente reactivas que pueden reaccionar con macromoléculas como el ADN, ARN, lípidos y proteínas resultando en daños a las estructuras celulares (Moller et al. 1996).

Los polifenoles son los mejores estabilizadores de radicales libres entre los compuestos provenientes de plantas. Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos están estrechamente ligadas con su estructura química, mientras que el potencial de estabilizar radicales libres de los ácidos fenólicos y sus derivados depende del número de grupos hidroxilo (Watson et al., 2013).

1.4.3 Mecanismo de acción antioxidante

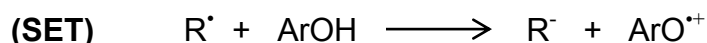
La reconocida capacidad antioxidante de los polifenoles se debe a que pueden actuar de diversas formas previniendo la oxidación celular; son capaces de quelar iones metálicos como Fe(II)/Cu(I) y Fe(III)/Cu(II) que están involucrados en la transformación de H₂O₂ y O₂⁻ en el altamente agresivo HO· a través de reacciones tipo Haber-Weiss/Fenton, también pueden bloquear la acción de algunas enzimas responsables de la generación de O₂⁻ como la xantina oxidasa y la proteína quinasa C. (Pietta, 2000).

Sin embargo, el rol más protector de los polifenoles (ArOH) se da al extinguir directamente a los radicales ROS o radicales libres (R·) mediante dos mecanismos propuestos; el primero se basa en la ya mencionada capacidad del grupo funcional fenol de donar un átomo de hidrógeno a un radical libre (HAT, *hydrogen-atom transfer*) convirtiéndose en un radical libre como se ilustra a continuación:



La eficiencia de este mecanismo depende de la rapidez con que el átomo de hidrógeno pueda ser donado así como la estabilidad del radical fenoxi formado, lo cual es altamente dependiente de la estructura del compuesto original (ArOH). Los factores más determinantes son la presencia, el número y la posición relativa de los grupos hidroxilo adicionales que se verán implicados en la formación de enlaces hidrógeno intramoleculares así como la posibilidad conformacional de permitir la deslocalización electrónica a lo largo de la mayor parte de la molécula. Todos estos factores afectan la energía de disociación (BDE) del enlace fenólico (O-H); la debilidad del enlace O-H hace más factible la donación del átomo de hidrógeno (Leopoldini et al, 2004).

El segundo mecanismo es la transferencia singular de electrones (SET) del ArOH al radical libre R· con la formación de un radical catión estable ArOH^{•+}.



El potencial de ionización (IP) del ArOH es otro factor fisicoquímico importante para determinar la eficiencia de los polifenoles como antioxidantes, mientras más bajo mejor será la transferencia de electrones.

1.4.4 Métodos de síntesis

Los polifenoles más simples, como los flavonoides, están disponibles comercialmente y son extraídos y purificados de fuentes naturales. Sin embargo la síntesis química juega el papel central en la obtención de polifenoles naturales puros así como estructuras moleculares más complejas. Lejos de ser trivial la síntesis de polifenoles constituye un reto en síntesis orgánica por la imposibilidad de controlar el grado de polimerización y las características regio y estereoquímicas de los enlaces entre flavonoides (Ferreira et al. 2000)

La síntesis orgánica de polifenoles se basa en reacciones de autocondensación de flavonoides en medio ácido, en las que se obtiene invariablemente una mezcla de oligómeros, con el fin de mejorar la síntesis se ha implementado el uso de activadores del tipo ácido de Lewis, entre ellos TiCl_4 , TMSOTf , AgBF_4 , $\text{Sc}(\text{OTf})_3$.

En contraste a la síntesis orgánica, la síntesis enzimática de polifenoles ha sido estudiada arduamente en los últimos 25 años, ya que es un proceso amigable para el medio ambiente y da lugar a materiales poliméricos evitando el contenido de sustancias altamente tóxicas, como catalizadores químicos u otros aditivos de síntesis, los cuales requieren generalmente procesos costosos para su eliminación y en la mayoría de los casos son perjudiciales para la salud y el medio ambiente

1.4.4.1 Síntesis enzimática de polifenoles

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de reacciones bioquímicas asociadas con funciones vitales para los organismos, actúan rompiendo, ensamblando o modificando moléculas en condiciones de reacción suaves (temperatura ambiente, presión atmosférica, pH neutro), son altamente

selectivas(enantio, regio y quimioselectivas) además de ser no tóxicas y provenir de fuentes renovables. A partir del siglo XIX, cuando su mecanismo de acción fue descubierto, se convirtieron en herramientas irremplazables para la industria y la vida diaria (Talens-Perales et al., 2015).

La polimerización catalizada por enzimas ha sido descubierta como un nuevo método de polimerización y sus características propias son lo que la hacen un método novedoso que permite la obtención de materiales poliméricos que no podrían ser obtenidos por síntesis química convencional.

Los inicios de la polimerización enzimática se marcan cuando la síntesis de celulosa fue alcanzada mediante la polimerización de fluoruros de β -Celobiosa en disolución acuosa de acetonitrilo catalizada por la celulasa, lo cual es una hidrólisis enzimática de celulosa que se da de forma natural. Este concepto que utiliza la catálisis en reversa de hidrolasas para polimerización ha sido utilizado para la obtención de polisacáridos como celulosa, quitina y quitosano (Oguchi et al., 2000).

La síntesis enzimática de polifenoles ha sido propuesta usando oxidorreductasas, principalmente peroxidasa de rábano (HRP) así como cloro peroxidasa (CPO) y lacasas (López et al., 2013). Las peroxidasas inducen la polimerización oxidativa de derivados fenólicos, lo que permite obtener compuestos con estructuras novedosas, siendo este proceso una alternativa a la convencional obtención de polímeros fenólicos y una vía para evitar el uso de reactivos tóxicos como el formaldehído (Uyama et al., 1994)

1.4.4.2 Lacasa

Las lacasas son metaloproteínas con actividad fenoloxidasa que contienen átomos de cobre en su sitio activo y que se incluyen en el grupo de las oxidasas multicobre, las cuales combinan la reducción de cuatro electrones de dioxígeno hacia agua con la oxidación de un electrón de cuatro moléculas de sustratos

reductores sin la formación de intermediarios tóxicos como el peróxido de hidrógeno (Bertrand et al., 2002).

Dentro de las oxidasas multicobre se encuentran la lacasa, la ascorbato oxidasa y la ferroxidasa, que son producidas por hongos, plantas y ciertos tipos de bacterias e insectos y se ha encontrado que están relacionadas con procesos de polimerización de la lignina (plantas) y con su degradación (hongos, bacterias).

Las lacasas contienen cuatro iones de cobre repartidos en sus tres sitios activos, clasificados de acuerdo con sus propiedades espectroscópicas y paramagnéticas y de los que se conoce su ubicación gracias a estudios de rayos X (*Figura 4*). El sitio T1 contiene cobre azul del tipo (CuI) el cual está ligado estrechamente a la cisteína y es responsable de una banda de absorción a los 600 nm que le da color azul a la enzima. El sitio T2 contiene cobre tipo 2 (CuII) que tiene una resonancia paramagnética electrónica (EPR) característica y muestra afinidad por aniones como F^- , N_3^- y CN^- que son inhibidores de la enzima. En el sitio T3 está un par de iones de cobre acoplados tipo 3 (Cu3a y Cu3b) que son silenciados en EPR en la presencia de dioxígeno pero presentan un máximo de adsorción a los 330nm.

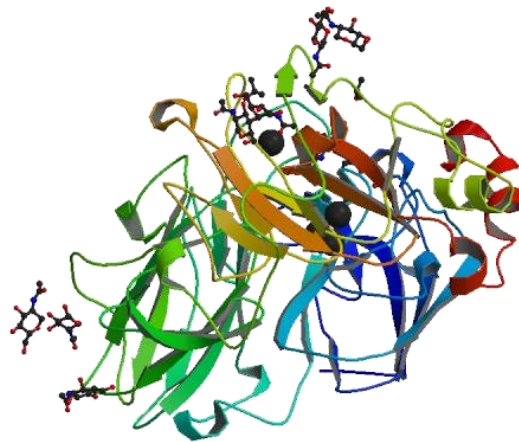


Figura 4. Estructura cristalina de Lacasa de *Trametes versicolor* (Piontek et al., 2002)

1.4.4.3 Mecanismo catalítico de las lacasas

El cobre T1 de las lacasas está coordinado con el átomo de azufre de la cisteína y con dos nitrógenos procedentes de dos histidinas, debido a su elevado potencial es ahí donde tiene lugar la oxidación del sustrato y a continuación son transferidos los electrones a través del tripeptido (Hys-Cys-Hys) hacia el centro con tres núcleos donde ocurre la reducción del oxígeno a agua (Solomon et al., 1996)

El sitio T1 se localiza en una cavidad a 7 Å por debajo de la superficie de la enzima lo que hace posible que sea el aceptor primario de electrones (Komori et al., 2010), tiene un potencial que varía entre 420 y 790 mV frente al electrodo normal de hidrógeno (NHE) y en este sentido las lacasas pueden ser clasificadas como de alto, medio o bajo potencial redox (Christenson et al., 2004).

Los cobres T2 y T3 forman un centro con tres núcleos cuyos ligandos son átomos de nitrógeno correspondientes a ocho histidinas. En este centro es donde tiene lugar la reducción del oxígeno molecular (*Figura 5*), este proceso tiene lugar cuando la enzima en un estado totalmente reducido, por la aceptación de cuatro electrones del sustrato, reacciona con el oxígeno donándole un par de electrones y formando el intermediario peróxido, en el que los dos átomos de cobre T3 y el cobre T2 están unidos por un grupo peróxido.

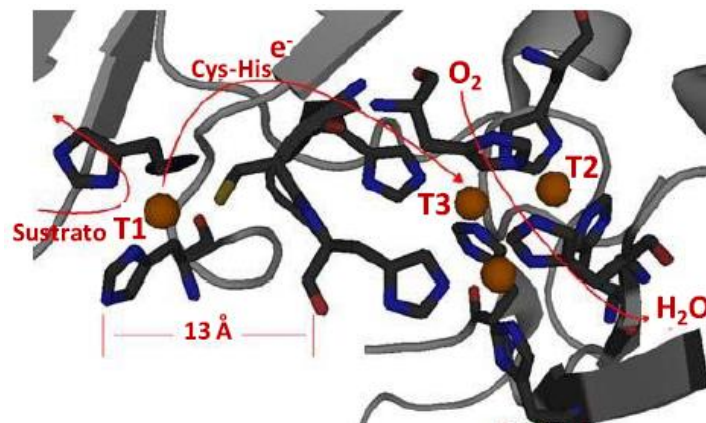


Figura 5. Representación del sitio activo de la lacasa donde se indica el flujo de electrones, oxígeno y sustrato (Giardina et al., 2010)

A través de una segunda transferencia de electrones el intermediario peróxido es reducido al intermediario nativo que puede estar en forma oxo o hidroxilo y este se reduce rápidamente por la presencia del sustrato en la reacción de catálisis; por el contrario en ausencia de sustrato pasa lentamente al estado de reposo oxidado en el que uno de los átomos de oxígeno está unido al cobre T2 como un grupo hidroxilo (Solomon et al., 1996)

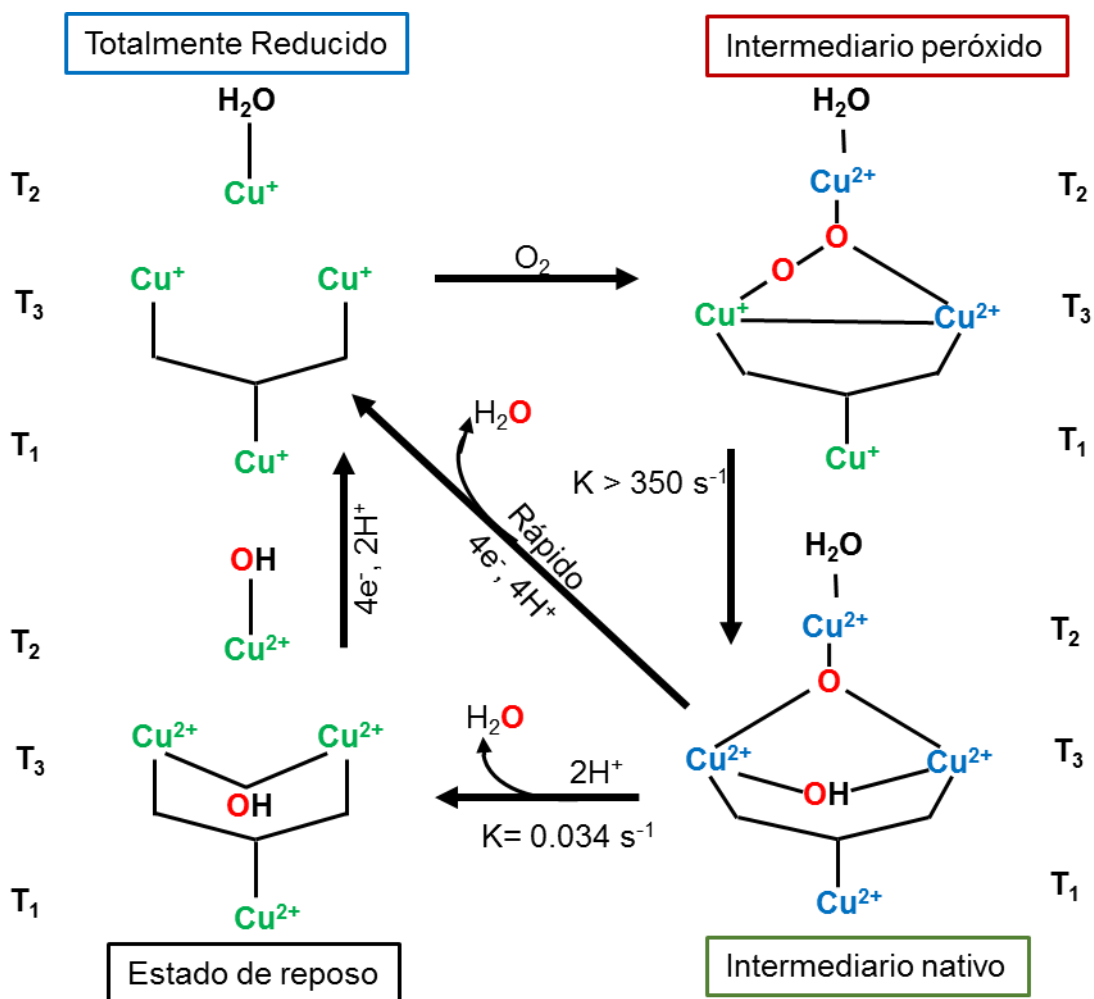


Figura 6. Mecanismo de reducción de O_2 por núcleos multicobre hacia agua (modificado de Giardina et al., 2010).

En otras palabras el sitio T1 mononuclear extrae electrones desde el sustrato reductor y media la transferencia al sitio trinuclear T2/T3 donde se reduce el oxígeno molecular (*Figura 6 y 7*). Los principales sustratos de las lacasas son fenoles y arilaminas, estas enzimas tienen poca selectividad por los sustratos así que pueden oxidar una variedad de sustratos sin importar su origen. Las lacasas de origen fúngico son ampliamente utilizadas como decolorantes en la industria textil y de la coloración, en la industria del papel y en la oxidación de contaminantes ambientales.

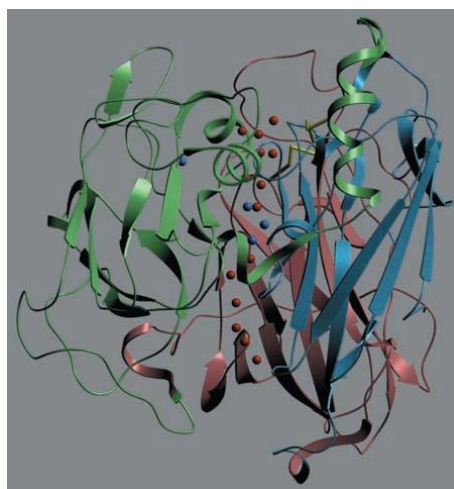


Figura 7. Estructura tridimensional de la lacasa de *Trametes versicolor* mostrando los canales de entrada de oxígeno y salida de agua (esferas rojas) (Piontek, et al., 2002)

1.4.5 Ácido gálico

Es bien conocido que los polifenoles naturales presentan actividad biológica benéfica para la salud humana ya sea como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios entre otras. El ácido gálico (AG) es un polifenol natural que presenta una fuerte actividad antioxidante sobre todo en lípidos o emulsiones (Madsen et al., 1995).

El AG es un ácido fenólico orgánico también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (*Figura 8*) que se encuentra en las agallas y corteza de roble, en las hojas de té y otras plantas en las que se puede encontrar en forma libre o formando parte de los taninos. Las sales y los ésteres de este ácido se denominan galatos.

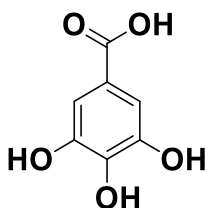


Figura 8. Estructura del AG

El AG es usado en alimentos procesados, empaques de alimentos y cosméticos para prevenir el enranciamiento causado por la peroxidación lipídica y el deterioro; es un antioxidante casi tan potente como el Trolox y más efectivo que la mayoría de los polifenoles solubles en agua entre ellos el ácido ascórbico (vitamina C) (Cholbi et al., 1991).

1.4.6 Poli(ácido gálico)

El poli(ácido gálico) (PGAL) fue obtenido por primera vez en 2013 (López et al., 2013) es un polímero de AG sintetizado enzimáticamente mediante el uso de lacasa de *Trametes versicolor*, a pH=5, temperatura ambiente y oxigenación (*Figura 9*), tiene un peso molecular de aproximadamente 6000 Da y presenta una alta y atípica solubilidad en agua (500 mg/mL) lo que potencializa su campo de aplicación.

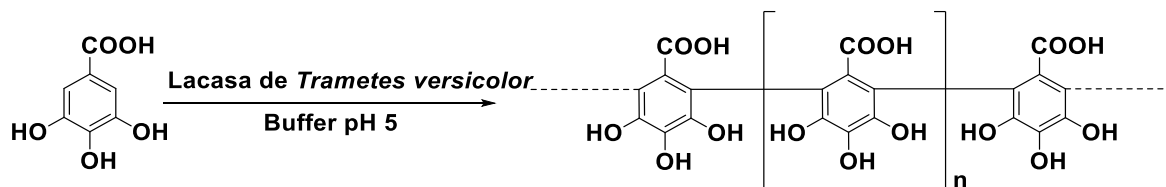


Figura 9. Esquema de síntesis de PGAL

Según lo reportado por nuestro grupo de trabajo (López et al., 2013) el crecimiento de cadena se da mediante enlaces fenilo- fenilo (C-C), enlaces que benefician la transferencia de electrones y por lo cual este polímero muestra buena conductividad en estado sólido (superior a 10^{-4} Sm^{-1}) estando dentro del intervalo de los polifenoles semiconductores ya reportados con el beneficio de provenir de una síntesis limpia y de fuentes naturales, abundantes y de bajo costo.

CAPITULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El material formado por la reacción de entrecruzamiento de carboximetilcelulosa (CMC) y poli(ácido gálico) (PGAL) podrá usarse en ingeniería de tejidos.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar películas de PGAL entrecruzado con CMC con el fin de determinar su viabilidad para su uso en ingeniería de tejidos.

2.2.2 Objetivos particulares

- Realizar la síntesis de entrecruzado de PGAL con CMC utilizando ácido cítrico como ligante para obtener un material insoluble en agua.
- Analizar los cambios en las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua de películas de CMC-PGAL como resultado de la adición de glicerol como plastificante a fin de comparar las propiedades del material con las de la piel.
- Conocer la capacidad antioxidante del material mediante Resonancia Paramagnética Electrónica para evaluar y comparar las diferentes formulaciones con el propósito de analizar un posible beneficio celular al evitar el deterioro celular a causa del estrés oxidativo.
- Conocer el poder antibacteriano del material mediante pruebas de sensibilidad en disco para evaluar y comparar su capacidad antimicrobiana.

CAPITULO 3. METOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los materiales y técnicas utilizadas para obtener y caracterizar los productos de este trabajo de investigación.

3.1 Materiales

Los reactivos utilizados fueron LTV con una $U > 6 \text{ U mg}^{-1}$ (proteína liofilizada almacenada de 2 a 8°C, Sigma Aldrich, USA), GA (Sigma Aldrich, USA), 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS, Fluka, USA), alcohol metílico (Química Suastes S.A. de C.V., México), glicerol (Sigma Aldrich, USA), CMC (Sigma Aldrich, USA), AC ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, J.T. Baker, México), fosfato monobásico de sodio (J.T. Baker, Mexico), cloruro de calcio (CaCl_2 , J.T. Baker, México), medio Muller Hinton (J.T. Baker, México)

3.2 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la LTV fue determinada agregando 50 μL de una disolución de enzima (10 mg/mL) a 2.9 mL de disolución de ABTS (9.1mM) disuelto en buffer de fosfatos (pH=5, 100 mM); las soluciones se mezclaron por inversión de la celda y se registró la variación de la absorbancia a 405 nm (25 °C) en un espectrofotómetro Lambda 2S UV-Vis (Perkin Elmer, EUA). La U fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar un 1.0 μmol de ABTS por minuto a 25 °C y pH=5 utilizando el coeficiente de extinción molar del ABTS de $36.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.3 Síntesis enzimática de PGAL

La síntesis enzimática del PGAL se realizó según lo descrito por López (2013) (*Figura 10*), disolviendo 8.5 g de GA en 250 mL de buffer de acetatos (pH=5, 0.25 M) agregando 20 mL de NaOH (2 M) esta mezcla se coloca en un matraz ámbar de 500 mL y se controla la temperatura (25 °C) y agitación ($\approx 500 \text{ rpm}$) (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) mientras se burbujea aire mediante una bomba Elite 800 (Hagen Inc, Canadá). Una vez establecidas estas condiciones se agregó

cantidad suficiente de LTV para alcanzar 26.5 U y se dejó transcurrir la reacción por 48 h.

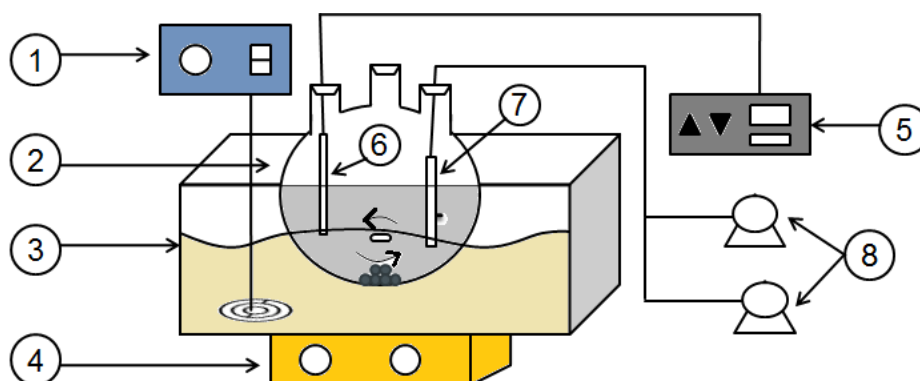


Figura 10. Sistema de obtención de PGAL, RCT (1,4), matraz (2), baño de glicerol (3), sensor de oxígeno libre (5), electrodo de oxígeno libre (6), salida de oxígeno (7), bombas de aire (8).

El producto de reacción fue precipitado gota a gota en 2 L de metanol grado técnico (5 °C), se dejó sedimentar por un día en frío y el polímero se separó de la mezcla por filtración al vacío (filtros de membrana Durapore® 0.45 µm). Finalmente la torta resultante se secó al vacío por dos horas y se calculó el rendimiento en peso en relación a la cantidad de sustrato. El polímero obtenido fue siempre un polvo negro brillante.

3.4 Reacción de entrecruzado

El método utilizado para la reacción de entrecruzado es una modificación de lo propuesto por Alonso et al. (2009). La metodología consistió en disolver 1 g de CMC en 50 mL de agua caliente (80 °C) con ayuda de agitación magnética (500 rpm) en un matraz de 100 mL (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) (Figura 11); una vez disuelta completamente se agregaron las cantidades de PGAL para tener proporciones de 5, 10 y 15 % w/w (0.05 g, 0.10 g y 0.15 g) hasta tener una mezcla homogénea. A la mezcla de reacción se agregaron 6.5×10^{-3} mol (1.25 g) de AC y 30 mg de fosfato monobásico de sodio y se dejó correr la reacción por dos horas a 80°C y 500 rpm. Y transcurrido el tiempo se agregó el glicerol en

proporciones de 2, 3 y 4% (base húmeda) y se mantuvo en agitación y calentamiento por 15 min para asegurar su incorporación a la mezcla.

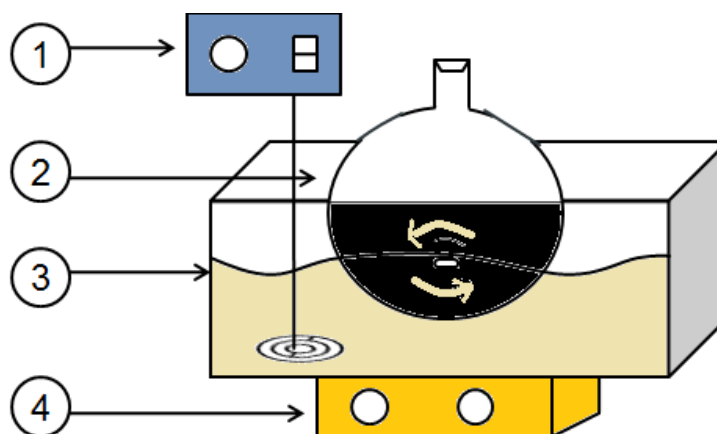


Figura 11. Sistema de reacción de entrecruzado, RCT (1,4), matraz (2) y baño de glicerol (3).

El producto de reacción se vertió en cajas Petri (25 mL por tapa) y se dejó secar a temperatura ambiente (método de casting). El resultado fueron películas negras y elásticas que se caracterizaron por FT-IR (ATR), SEM y EPR.

3.5. Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica de los productos de reacción consistió en experimentos RMN e FT-IR (ATR).

3.5.1 Resonancia Magnética Nuclear

Los experimentos de RMN fueron realizados en un espectrómetro Varian MR-400; en solución de H₂O deuterada. Los desplazamientos químicos son relativos a las señales del disolvente, fijadas en $\delta = 4.82$ ppm para RMN¹H.

3.5.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier

Con el fin de determinar los grupos funcionales presentes en los productos de reacción, se analizaron las muestras por FT-IR (ATR). Los datos fueron obtenidos en un equipo Perkin-Elmer Spectrum 400.

3.5.3 Cromatografía de exclusión por tamaño

A fin de determinar el peso molecular del PGAL se examinaron mediante SEC muestras de cada producto de reacción en un cromatógrafo Agilent 1210 series (EUA), una columna Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm, Waters, EUA) y una fase de elución de LiCl (0.1 M) a un flujo de 0.8 mL/min y 30 °C, en conjunto con un detector de índice de refracción (RID). Los estándares de calibración fueron de polietilenglicol, que al igual que las muestras se disolvieron en fase móvil (1 mgmL⁻¹) y filtradas (45 µm) antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

3.6 Pruebas mecánicas y de barrera.

Las pruebas mecánicas se realizaron con base en normas ASTM y los datos obtenidos se procesaron según lo estipulado en las mismas.

3.6.1 Acondicionamiento

Las películas obtenidas por evaporación del disolvente en cajas Petri, se desprendieron de las cajas Petri con ayuda de una navaja procurando evitar fisuras en los bordes y se colocaron en una cámara de humedad controlada (50 % HR) de acuerdo a lo establecido en la norma ASTM D618 (50 ± 5 %HR y 23 ± 2 °C), manteniendo las películas al menos 24 h antes de las determinaciones de las propiedades mecánicas y de barrera.

3.6.2 Medición del espesor

El espesor de las películas fue medido después de la etapa de acondicionamiento con un micrómetro (Cole-Parmer Modelo 08204-80) en cinco puntos diferentes y aleatorios (4 en el perímetro y uno en el centro) y se calculó el valor promedio para utilizarlo en la determinación de las pruebas mecánicas y de barrera.

3.6.3 Propiedades mecánicas

Las películas fueron sometidas a ensayos de tracción y punción utilizando un equipo SINTECH 1/S (MTS, USA) con una celda de carga de 100 N cambiando únicamente las abrazaderas entre un ensayo y otro. Todas las películas utilizadas

fueron previamente acondicionadas y cortadas según las especificaciones de la prueba.

3.6.3.1 Ensayo de tracción

El ensayo de tracción o fractura a la extensión se realizó a temperatura ambiente con base en la norma ASTM D882-97. Las películas se cortaron en probetas de 1 cm de ancho por 8 cm de largo (*Figura 12-b*) y se sujetaron en las mordazas para tener una longitud de evaluación de 5 cm (*Figura 12-a*). Las probetas se estiraron a una velocidad de extensión de 150 mm/min y el equipo registró la resistencia del material hasta su ruptura. Se probaron 5 muestras por cada formulación.

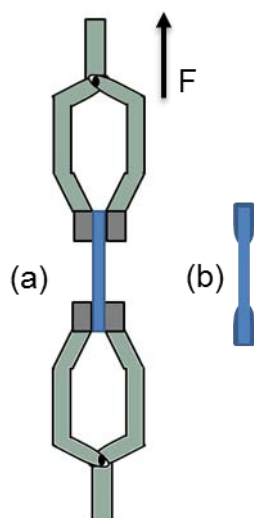


Figura 12. Sistema de prueba de tracción. Mordazas (a), Probeta (b).

3.6.3.2 Ensayo de punción

La fuerza de fractura en punción fue determinada de acuerdo al método descrito por Gontard et al. (1993), que especifica un ajuste para materiales de matrices de polisacáridos y el uso de glicerol como plastificante.

Las películas previamente acondicionadas se cortaron en círculos de 10 cm de diámetro, se sujetaron a un anillo metálico (*Figura 13-b*) y se sometieron a la fuerza de una superficie punzante de 1.3 cm de diámetro a una velocidad de

descenso de 50 mm/min (*Figura 13-a*). La resistencia a la ruptura de las películas fue registrada en el equipo. Se analizaron 5 muestras de cada formulación.

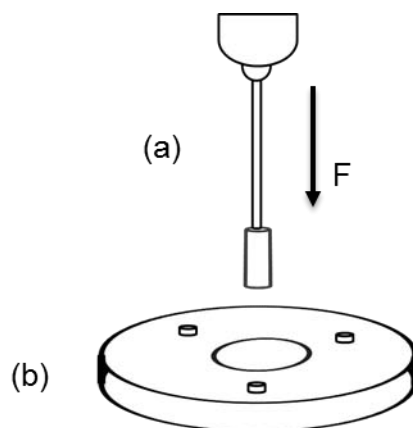


Figura 13. Sistema de prueba de punción. Superficie punzante (a), anillo metálico (b).

3.6.4 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó según la técnica gravimétrica establecida en la norma ASTM E96-00, la cual se basa en el coeficiente de transmisión del vapor de agua mediante el seguimiento del incremento de peso en el tiempo con relación a la humedad que atraviesa la película. Las películas acondicionadas fueron cortadas y colocadas en las celdas de prueba (*Figura 14*), las cuales fueron llenadas con cloruro de calcio (anhidro, secado a 200 °C para asegurar 0 %HR) dejando un espacio de aire de 0.5 cm sobre su superficie.

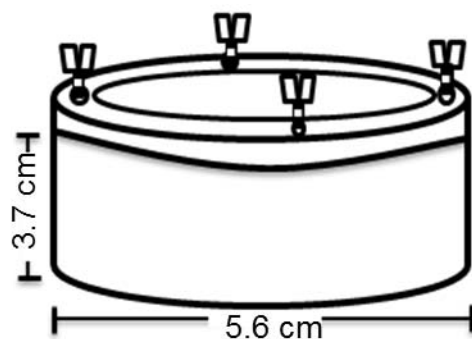


Figura 14. Celda de prueba

Las películas se sujetaron con un anillo de acrílico con ayuda de cuatro tornillos colocados simétricamente y una capa de silicón para mantener la hermeticidad.

Una vez colocada la película se tomó el peso inicial y se colocaron en una cámara de humedad controlada (50 %HR y 22 °C), la diferencia de humedad entre el interior de la celda y la cámara proporcionarían la fuerza impulsora para que el vapor de agua atravesara la película y llegara al desecante. Las celdas fueron retiradas cada 24 h para registrar la ganancia de peso en una balanza analítica (OHAUS, Modelo GA200, Alemania) con una precisión de 0.0001 g hasta alcanzar el equilibrio.

Se analizaron cinco muestras por cada formulación y los datos se trataron de acuerdo a lo especificado en la norma ASTM E96-00 y agregando una corrección para materiales hidrófilos (Gennadios et al., 1994).

3.6.5 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se midió a temperatura ambiente usando un microscopio OCA 15 Plus (Dataphysics, USA) y el software SCA 2.0 usando agua como solvente. Las muestras se cortaron en cuadros de 2 x 2 cm y se tomaron 10 medidas en la superficie de cada muestra, los ángulos a la izquierda y derecha de la gota (1 µL) se promediaron.

3.7 Ensayo de capacidad antioxidante por Resonancia Paramagnética Electrónica de sólidos

La resonancia paramagnética electrónica es una espectroscopia de absorción que permite la detección de electrones desapareados. Esta técnica se basa en la absorción de microondas por parte de sustancias paramagnéticas, especies químicas que contengan al menos un electrón desapareado, inmersa en un campo magnético. Para efectuar esta prueba se cortaron las películas en hilos y se colocaron dentro de un tubo de cuarzo. Los experimentos fueron realizados en un espectrómetro de EPR Elexsys E500 (Bruker) a temperatura ambiente en un

rango de campo de magnético de 80 a 4080 G y una frecuencia de microondas de 9.861759×10^9 Hz.

3.8 Ensayos microbiológicos

Los ensayos microbiológicos se hicieron mediante pruebas de difusión en agar (Jorgensen et al., 2015) utilizando cuatro cepas de referencia farmacológica: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 que requieren como máximo de un laboratorio con nivel de bioseguridad dos. Los inóculos de las cepas fueron incubados a 37 °C por 24 h en caldo de cultivo Mueller Hinton (MH).

Las muestras se esterilizaron previamente con luz UV, se cortaron asépticamente en círculos de 1 cm de diámetro y se colocaron en cajas Petri de agar MH previamente inoculadas con 100 µL de inóculo (aproximadamente 1×10^6 UFC), las placas se incubaron por 24 h a 37 °C. El diámetro de la zona de inhibición se midió con un calibre de 1 mm. Lo que se registra como zona de inhibición es la diferencia entre el área total restando el área de la muestra.

CAPITULO 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Síntesis enzimática de PGAL

Para realizar la síntesis de PGAL previamente se determinó la actividad enzimática de la LTV siendo ésta de 2.35 U/g, el AG se utilizó puro y el oxígeno provino del aire (*Figura 15*).

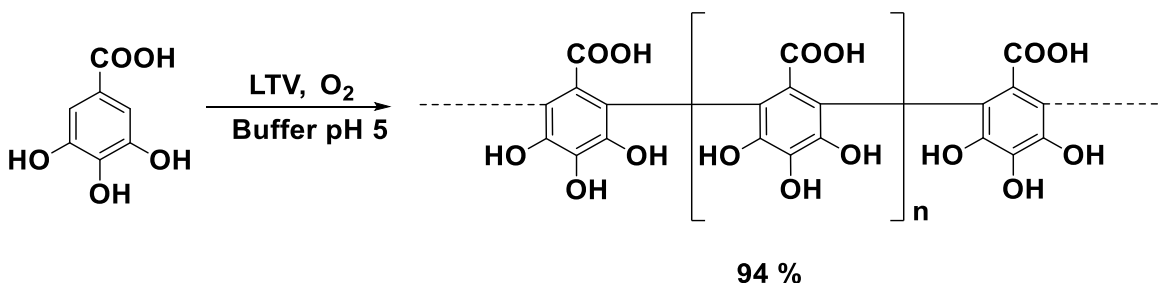


Figura 15. Síntesis de PGAL

La reacción produjo un polvo negro brillante con un peso molecular de 6000 Da determinado a través de SEC, es decir, alcanza hasta las 25 unidades de repetición. El PGAL es un polímero soluble en agua (500 mgmL⁻¹) en contraste con su unidad monomérica de AG, esto debido al incremento de grupos funcionales -OH en su estructura que propician la formación de puentes de hidrógeno.

En el espectro de RMN-¹H (*Figura 16*) se aprecia la ausencia de señales de hidrógenos en la zona aromática, lo cual es indicativo de una estructura polimérica conectada mediante enlaces fenilo-fenilo.

Evidencia adicional para corroborar este tipo de conectividad en el polímero fue observada en su espectro de FT-IR (ATR) (*Figura 17*), que se caracteriza por la presencia de una banda ancha (característica de polimerización) entre los 3000 y los 3400 cm⁻¹ que indica la abundancia de grupos hidroxilo presentes en la estructura polimérica, así como por la ausencia de la banda característica de enlaces C-O-C aromáticos que aparece entre los 1230 y 1270 cm⁻¹, lo que

corroboró la elongación de la cadena polimérica vía enlaces fenilo-fenilo entre los carbonos 2 y 6 de la unidad de repetición.

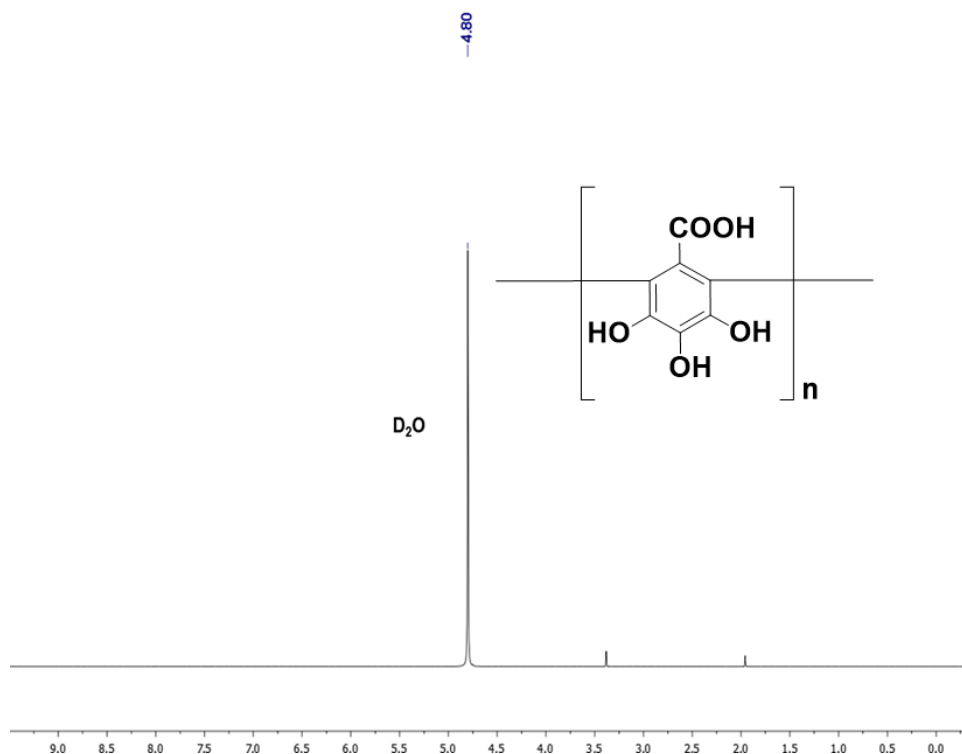


Figura 16. Espectro de RMN-¹H para PGAL [D₂O, 400 MHz]

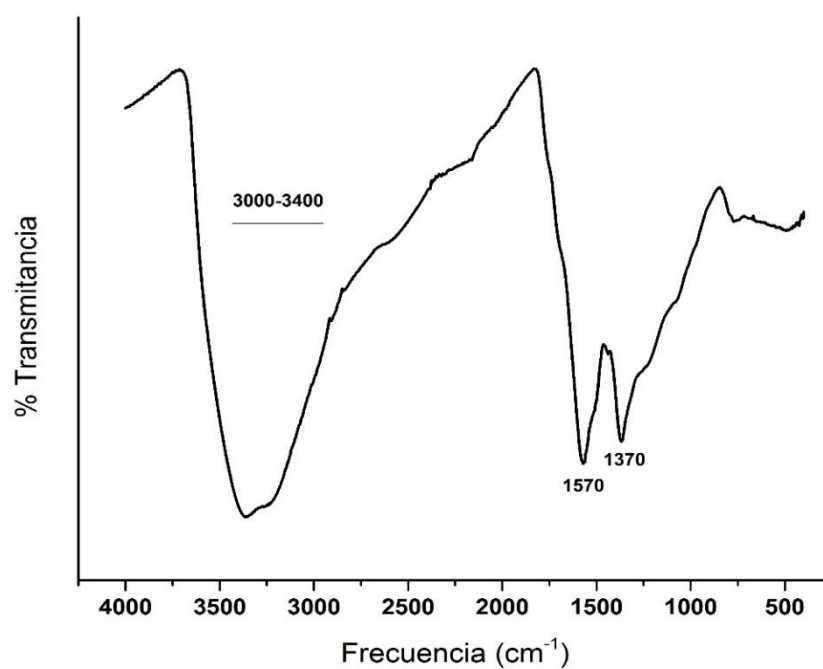


Figura 17. Espectro de FT-IR (PGAL)

Cabe resaltar que al tener concordancia con lo encontrado por López et al. (2013) en RMN-¹H y FT-IR (ATR) así como un peso molecular en el rango de lo descrito no fue necesario llevar a cabo más técnicas de caracterización del polímero.

4.2 Reacción de entrecruzado PGAL-CMC

Para realizar la reacción de entrecruzado entre el PGAL y la CMC se utilizó como agente entrecruzante el ácido cítrico y el fosfato monobásico de sodio como iniciador; la reacción transcurrió a 80 °C para fomentar la formación de radicales. Una representación propuesta para el entrecruzado final se muestra en la *Figura 18*.

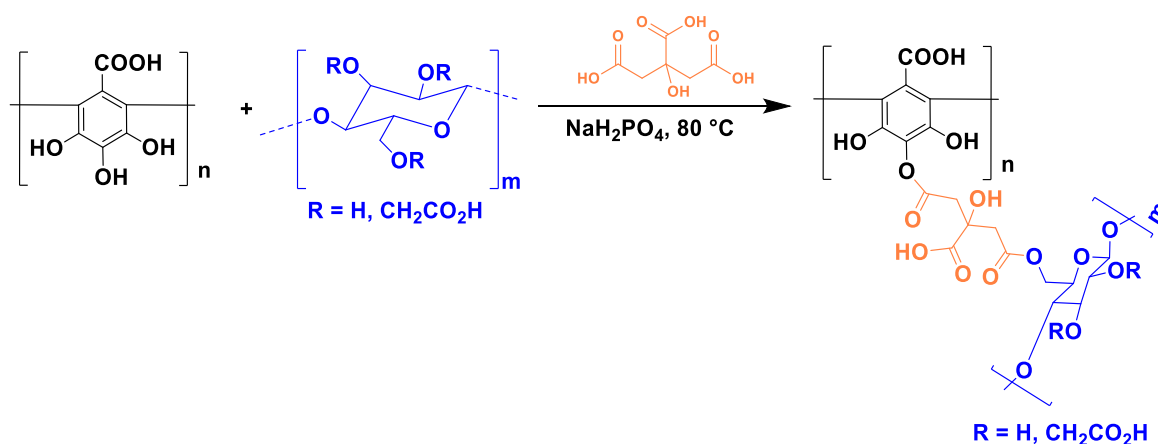


Figura 18. Entrecruzado PGAL-CMC

En general, el espectro de FT-IR (ATR) del entrecruzado (*Figura 19*) mostró un desplazamiento de las bandas características de las materias primas. Por ejemplo, las bandas correspondientes a los estiramientos C-H alifáticos se encuentran ligeramente desplazadas hacia frecuencias más altas (cerca de 20 cm⁻¹) comparadas con su contraparte en la CMC. Otra característica importante es que el AC (*Figura 19c*) presenta bandas características asociadas con las vibraciones de los estiramientos del carbonilo (C=O) entre 1700 - 1725 cm⁻¹, que se aprecian una vez más en el entrecruzado. Todo esto nos indica que ambos componentes están integrados en la estructura.

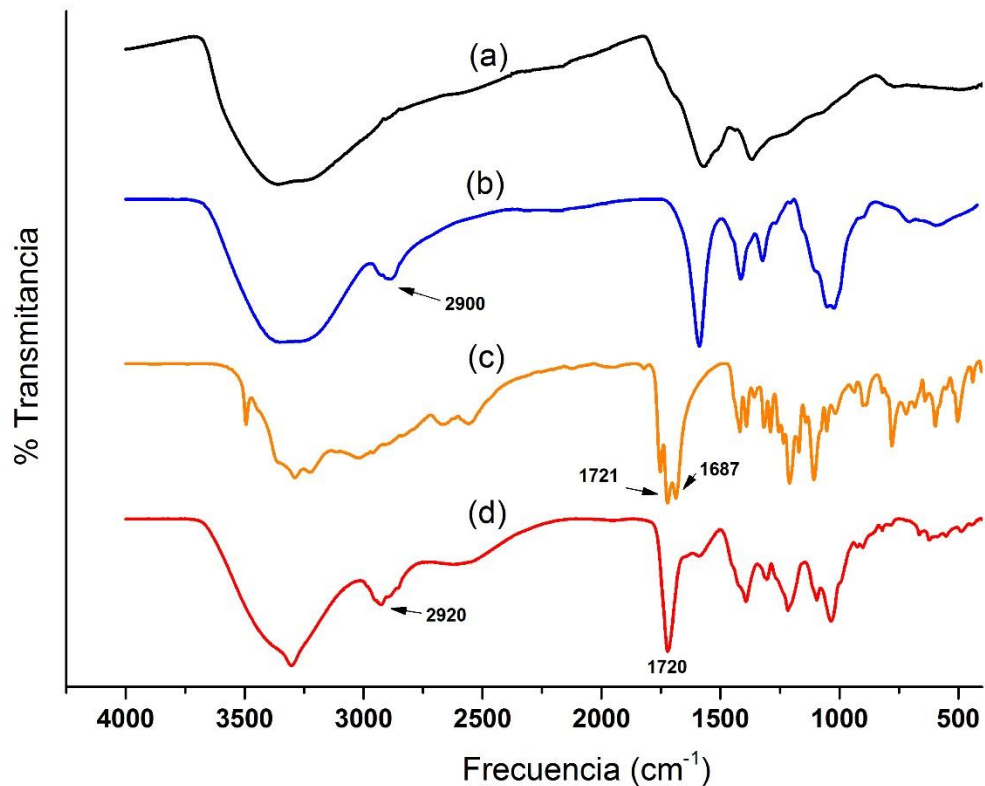


Figura 19. Espectro de FT-IR, PGAL (a), CMC (b), AC (c), PGAL-AC-CMC (d).

4.3 Formulación del material

Durante la fase experimental se varió la formulación (*Tabla 1*) de las películas con la finalidad de evaluar la influencia de la cantidad de PGAL y glicerol presentes, tanto en las propiedades mecánicas y de barrera como en las respuestas microbiológicas y de capacidad antioxidante. Los factores fueron la concentración en porcentaje masa de PGAL (5, 10, 15 %) y la concentración en porcentaje en volumen de Glicerol (1, 2, 3 %) en la reacción de entrecruzado.

Tabla 1:

Nomenclatura de las muestras

Clave	CMC (g)	PGAL (%)	Glicerol (%)
052	1	5	2
053	1	5	3
054	1	5	4
102	1	10	2
103	1	10	3
104	1	10	4
152	1	15	2
153	1	15	3
154	1	15	4

4.4 Propiedades mecánicas

Los materiales poliméricos se encuentran sometidos a diferentes cargas en sus aplicaciones; por lo que en la elección del material adecuado las propiedades mecánicas tienen un papel crucial. Las propiedades mecánicas dependen de la composición, la estructura y el tipo de procesado del material así como de otros factores como el tiempo (velocidad de aplicación de los esfuerzos) y la temperatura.

Durante los ensayos de tracción y punción en el equipo SINTECH 1/S el software fue registrando la fuerza y el tiempo, la señal típica obtenida se ilustra en la *Figura 20* en la cual se pueden observar las zonas más representativas del comportamiento de la muestra sometida a prueba.

La deformación inicial se puede describir como elástica ya que existe una variación proporcional entre el esfuerzo y la deformación según lo establecido en la ley de Hooke, la deformación elástica se asocia el estiramiento de los enlaces entre los átomos de las moléculas del material esta deformación es instantánea y completamente recuperable y no hay desplazamiento de las moléculas respecto a otras (Rico et al., 2012).

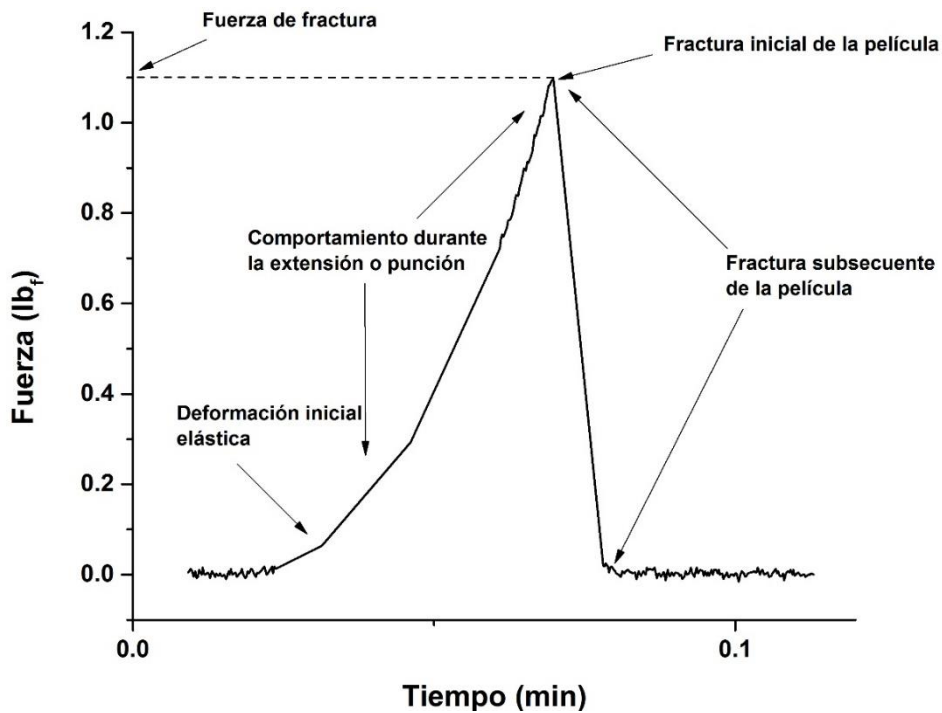


Figura 20. Señal típica obtenida del equipo SINTECH 1/S (muestra 052).

El comportamiento durante la tracción o la punción ya no sigue la misma proporción y se extiende hasta el límite de elasticidad o punto de fluencia donde el material se fractura por efecto de la fuerza a la que es sometido. Estos estiramientos se deben al desenrollamiento de las moléculas del material o desplazamiento de las mismas. La pendiente de la parte recta de la curva se conoce como módulo de Young entre más alto es el módulo más resistente a la deformación.

En la Tabla 2 se muestran los valores obtenidos de esfuerzo máximo, módulo de Young y Tenacidad para cada una de las formulaciones utilizadas en los ensayos de tracción. Los valores de esfuerzo se reportan como el esfuerzo necesario para fracturar las probetas teniendo en cuenta el área sobre la que se ejerce la fuerza (ancho de la probeta por espesor de la película). El módulo de Young corresponde a la pendiente de la parte lineal de la curva y la tenacidad es la energía máxima de deformación que puede absorber el material, también conocida como la oposición

que presenta un material a romperse o fracturarse y que es calculada como el área bajo la curva esfuerzo-deformación (Rico et al., 2012)

Según los datos obtenidos y contenidos en la Tabla 2 es clara la influencia del contenido de PGAL en el entrecruzado en los valores de esfuerzo de fractura obtenido. En la *Figura 21* se observa que al aumentar el porcentaje de PGAL hay un aumento considerable en el esfuerzo de fractura aunque no muestra una tendencia clara.

Tabla 2:

Propiedades mecánicas (ensayo de tracción).

Muestra	σ_v (MPa)	CV (%)	Módulo de Young (MPa)	CV (%)	Tenacidad (Jm^{-3})	CV(%)
052	3.92±0.33	8.53	17.04±1.46	8.54	0.36±0.01	4.01
053	7.78±0.74	9.52	14.40±0.75	5.18	1.08±0.02	1.41
054	14.23±0.35	2.48	11.32±0.83	7.32	2.35±0.04	1.87
102	7.86±0.54	6.90	21.67±1.25	5.77	0.77±0.00	0.55
103	7.51±0.58	7.81	10.50±0.40	3.79	1.07±0.03	0.66
104	28.40±0.36	1.28	9.46±0.76	8.02	5.52±0.36	6.61
152	12.80±0.69	5.43	19.22±1.46	7.58	1.59±0.06	3.89
153	12.22±0.31	2.57	9.82±0.60	6.16	1.92±0.08	4.01
154	31.02±2.89	9.34	5.85±0.28	4.71	5.84±0.29	4.92

CV: Coeficiente de variación

Las cadenas del material sometido a una fuerza de tracción intentan en un inicio alinearse en dirección a la fuerza a la que son sometidas, se estiran los enlaces y se rompen enlaces débiles de tipo van der Waals por lo que es de esperarse que un material con mayor fuerza de cohesión entre sus cadenas pueda soportar mayor fuerza de tracción antes de la ruptura.

Considerando que la CMC es un material semicristalino con grupos carboxilo e hidroxilo polares unidos a un esqueleto de celulosa (que le permitirán generar interacciones del tipo ion-dipolo y puentes de hidrógeno), que se une al PGAL que es polímero amorfo (López et al., 2013) que en su carácter de polifenol presenta interacciones dipolo-dipolo y abundancia de puentes de hidrógeno, es de esperarse que al aumentar la cantidad de PGAL las interacciones entre cadenas

aumenten y por tanto las películas que lo tienen en mayor proporción presenten una mayor resistencia a los ensayos de tracción.

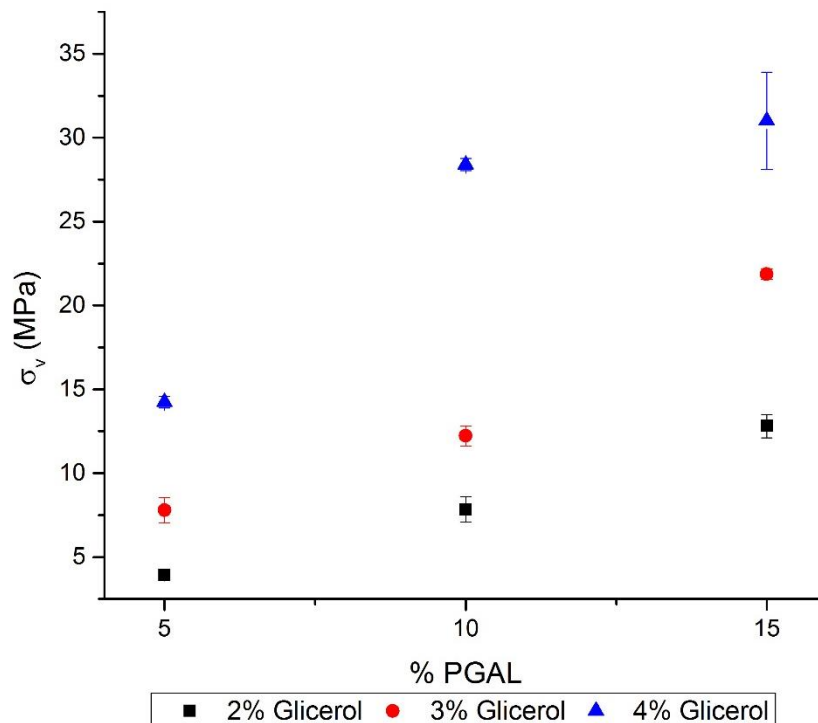


Figura 21. Efecto de la concentración de PGAL sobre el esfuerzo de fractura a la tracción.

El esfuerzo de fractura también se ve afectado por la cantidad de glicerol presente en el material, el glicerol o 1,2,3-propanotriol, es un polialcohol con tres grupos –OH higroscópico e inodoro y es el plastificante más usado debido a que es estable y compatible con las cadenas de biopolímeros. Como se observa en la *Figura 22* la fuerza de fractura se ve influida en conjunto con el porcentaje de PGAL por la cantidad de glicerol, aunque los efectos más importantes del plastificante se verán en la flexibilidad del material.

Según lo reportado Gontard et al. (1993) se podría esperar que la resistencia del material disminuyera al aumentar la cantidad de glicerol utilizado, debido a que interactúa con las cadenas y limita las interacciones entre las mismas. En nuestro caso no observamos dicho efecto y podemos atribuirlo a que al tener un material

entrecruzado y con ello altamente reticulado las moléculas se mantendrán juntas por enlaces covalentes que no permiten que el plastificante separe las moléculas mediante interacciones débiles.

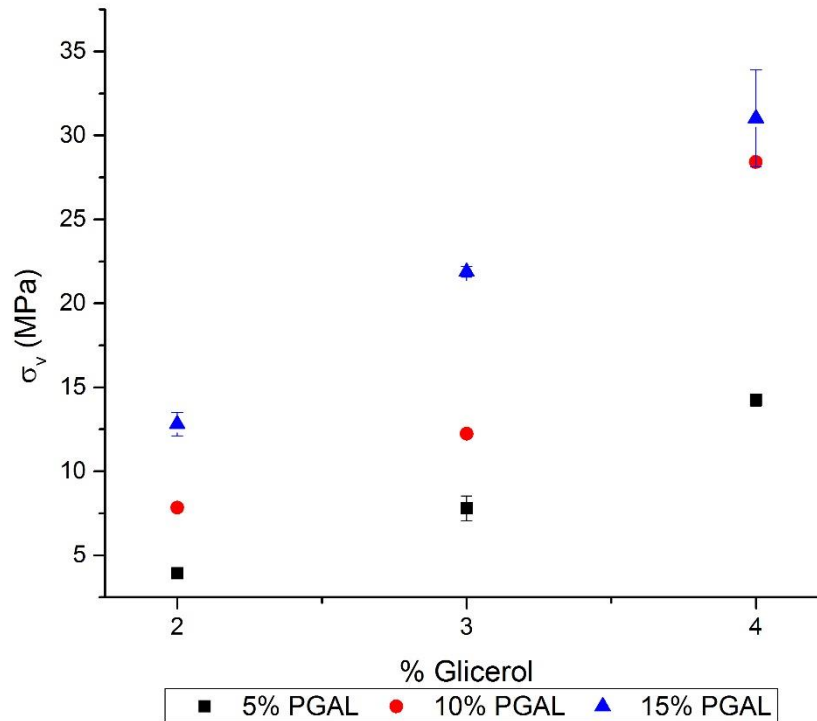


Figura 22. Efecto de la concentración de glicerol sobre el esfuerzo de fractura a la tracción.

Cabe mencionar que las concentraciones de glicerol utilizadas en este trabajo son menores que las que se reportan con frecuencia en la literatura debido a que el plastificante fue exudado cuando se intentó agregar en mayor proporción. Esto comprueba que las interacciones que forma con el material son más débiles que las que hay entre sus cadenas; ya que las fuerzas que mantienen unidas a las cadenas deben ser las mismas que atraen las moléculas del plastificante (mismo orden) para que este no sea rechazado.

El módulo de Young o modulo elástico, se define como la relación entre el esfuerzo y la deformación para un material. Según la norma ASTM los plásticos rígidos son aquellos que tienen un módulo superior a 700 MPa, los semirígidos tienen un módulo entre 70 y 700 MPa y los blandos son aquellos con un módulo de Young inferior a 70 MPa. Por lo tanto podemos clasificar a todas las formulaciones utilizadas como materiales blandos.

Al observar la *Figura 23* podemos observar que tanto la presencia del PGAL como la del glicerol tienen influencia en el módulo, aunque es evidente que el efecto dominante es del plastificante.

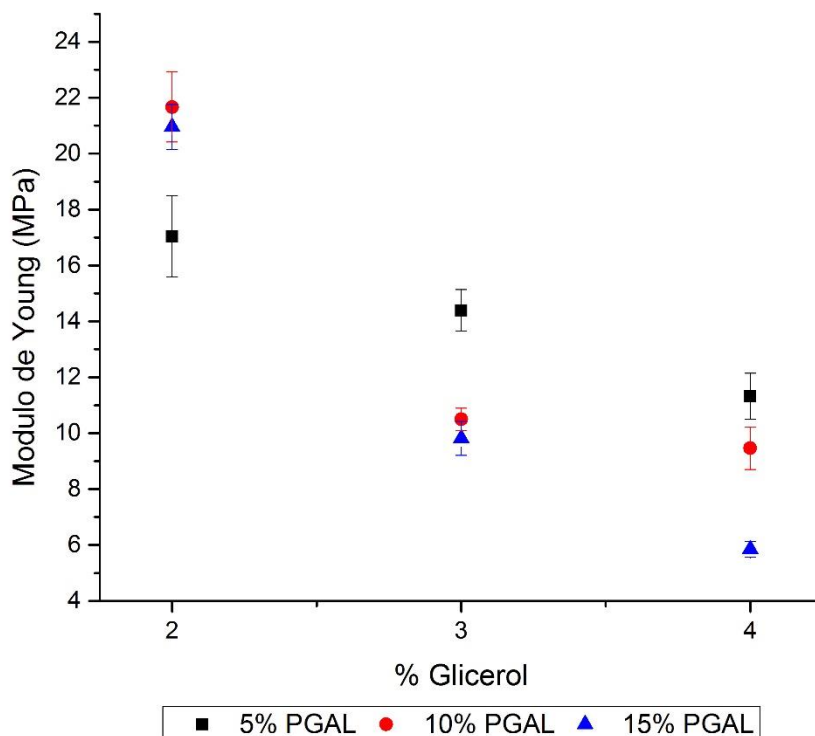


Figura 23. Efecto de la concentración de glicerol sobre el módulo de Young.

Según la teoría Sears y Darby (Platzer, 1982) solo existe volumen libre entre las moléculas de un polímero y suficiente volumen libre permite libertad de movimiento: a mayor volumen libre mayor libertad de movimiento y por tanto

mayor flexibilidad. La adición de moléculas pequeñas de plastificantes con cadenas flexibles implica un gran aumento en el volumen libre lo que ayuda al incremento de la flexibilidad y el aumento de la elongación a la rotura.

En el caso de polímeros no reticulados la influencia del plastificante suele ser mucho mayor, pero como ya se expuso anteriormente las interacciones entre las cadenas del polímero son fuertes, además de que el glicerol no posee grupos no polares que pudieran separar los dipolos del polímero. La tenacidad descrita en la Tabla 2, muestra el mismo comportamiento que las propiedades ya descritas y se refiere al trabajo necesario para romper o dañar el material. Los valores son bajos por lo que nuestros materiales serán clasificados como frágiles.

En la Tabla 3 se presenta el esfuerzo de fractura para el ensayo de punción de todas las formulaciones. En esta prueba no es posible establecer ni el módulo de Young ni la tenacidad ya que estas propiedades están descritas únicamente para muestras sometidas a fuerzas de tracción. Los valores fueron calculados teniendo en cuenta el área de aplicación de la muestra (área de la película en contacto con la superficie punzante).

Tabla 3.

Propiedades mecánicas (ensayo de punción).

Muestra	σ_v (MPa)	CV(%)
052	42.34±2.24	5.30
053	44.12±2.26	5.12
054	47.44±1.46	3.08
102	43.40±2.89	6.66
103	47.68±0.82	1.72
104	65.85±3.70	5.61
152	45.44±1.40	3.07
153	63.24±1.63	2.58
154	75.83±0.25	0.33

CV: Coeficiente de variación

Si se comparan los valores de esfuerzo de fractura para tracción y punción es evidente que la respuesta del material puede ser muy diferente para el tipo de

esfuerzo al que se vea sometido, por eso es conveniente caracterizar el material en el esfuerzo al que va estar sometido en la aplicación y nunca extrapolar datos de un tipo de ensayo a otro.

En las *Figuras 24 y 25* se percibe que no hay una clara influencia de las concentraciones del PGAL y glicerol sobre la resistencia del material a este tipo de esfuerzo aunque parece ser que el efecto resultante es producto de la adición de ambos.

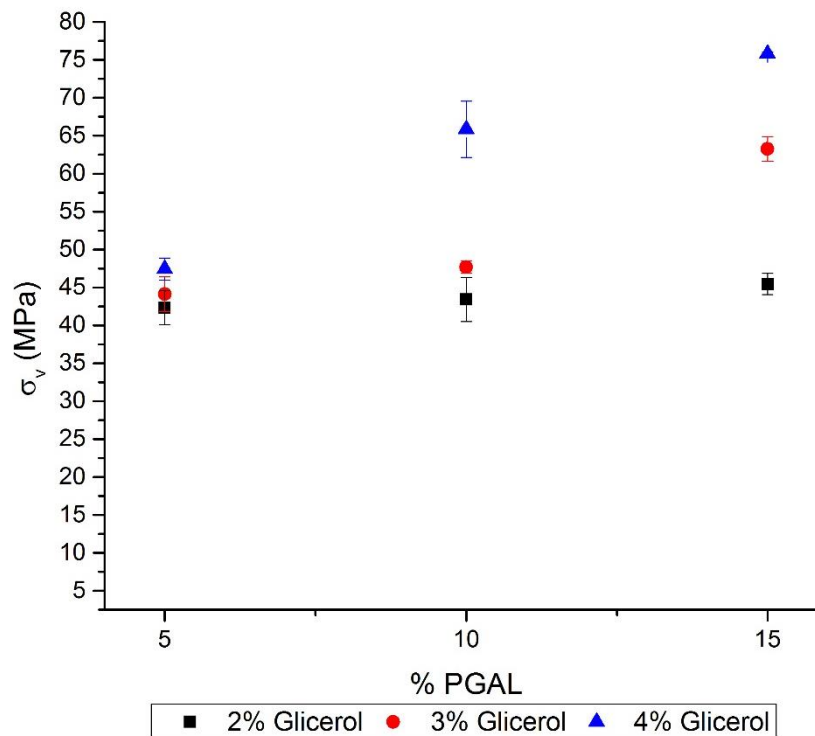


Figura 24. Efecto de la concentración de PGAL sobre el esfuerzo de fractura a la punción.

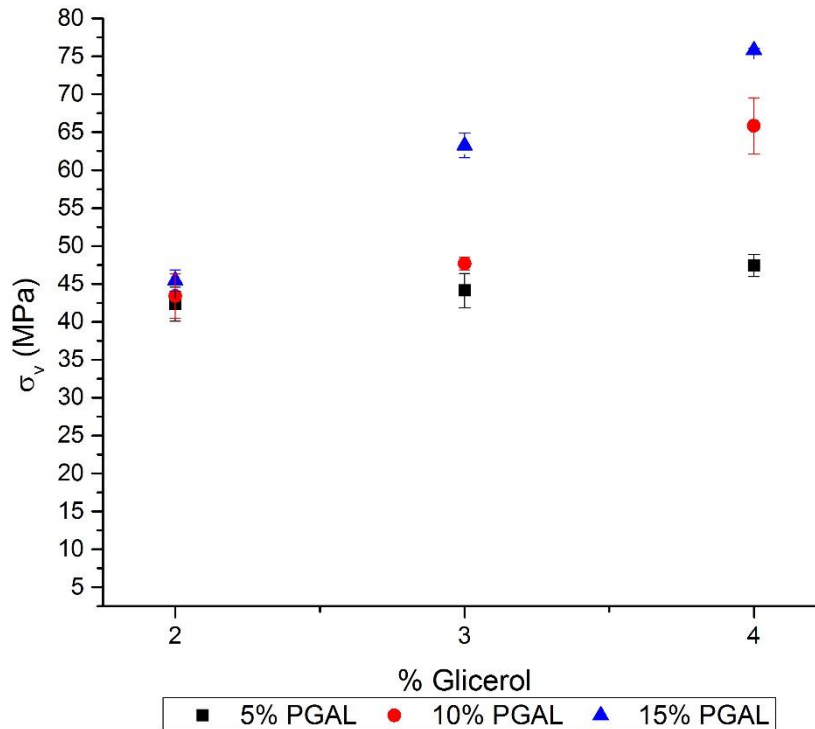


Figura 25. Efecto de la concentración de glicerol sobre el esfuerzo de fractura a la punción.

A efecto de utilizar este material en ingeniería de tejidos, específicamente en piel, es de subrayar que las características elásticas son superiores a las de la piel (Modulo de Young 4.2×10^5 Pa – 8.5×10^5 Pa, intervalo en el que se encuentra la piel de jóvenes y ancianos) (Agache et al., 1980), mientras que los esfuerzos de fractura no son comparables al ser medidos en condiciones muy diferentes, puesto que los esfuerzos en piel fueron medidos *in vivo*.

4.5 Permeabilidad al vapor de agua

La ASTM define a la permeabilidad de vapor de agua como la velocidad de transmisión de vapor de agua a través de un material plano por unidad de espesor y que es inducida por la diferencia de presiones entre las dos superficies, para condiciones de humedad y temperatura específicas. Esta definición no considera la resistencia a la transferencia de vapor de agua que ofrece el espacio de aire estancado entre la película y el desecante que para películas hidrofílicas (matrices de polisacáridos, lípidos o proteínas) tiene una influencia considerable.

Las películas hidrofílicas al estar en contacto con el vapor de agua presentan interacciones con sus grupos polares, lo que conlleva a que se hinchen y plastifiquen y con ello la transferencia de vapor hacia el aire estancado sea más lenta afectando así el gradiente de presión. Por lo tanto la resistencia a la transferencia de vapor de agua aumenta por efectos del hinchamiento y del plastificante y varía con el gradiente de presión utilizado y es necesario hacer correcciones a lo establecido por la ASTM E-96 que está dirigida a materiales sintéticos en los que este tipo de procesos de transferencia no tienen lugar y que subestima los valores de permeabilidad para películas altamente permeables (Gennadios et al., 1994).

Los valores reportados en la Tabla 4 corresponden únicamente a dos de las nueve formulaciones como un estudio preliminar, se escogieron muestras con diferente concentración de glicerol a fin de evaluar el impacto de su presencia en el comportamiento del material.

Tabla 4:
Permeabilidad de vapor de agua

Muestra		Permeabilidad x 10 ⁻¹³ (gPa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻¹)	CV (%)
052	ASTM	1.79±0.05	2.74
	Corregida	3.69±0.10	2.74
053	ASTM	3.31±0.13	4.02
	Corregida	6.84±0.27	4.02

CV: Coeficiente de variación

Con los resultados obtenidos se puede notar que al aumentar la cantidad de glicerol presente en la muestra hay un aumento en el valor de la WPV debido a que el plastificante reduce las fuerzas intramoleculares, generando un incremento en el espacio libre y por lo tanto permitiendo que las moléculas de agua puedan atravesar la película con mayor facilidad (Gontard et al., 1993) (Platzer, 1982), sumado a que el glicerol es un compuesto higroscópico y al adsorber moléculas de agua puede mediante interacciones consigo mismo formar multicapas de

plastificante que conducen a incrementar la separación de cadenas poliméricas e incrementar la WPV.

Los resultados obtenidos (3.69×10^{-13} y 6.84×10^{-13} g/Pa·s·m) difieren de lo reportando anteriormente para películas comestibles de polisacáridos y se encuentran en el orden de magnitud de polietileno (LDPE) y las ceras (comparado con resultados a la misma temperatura y humedad de ensayo); lo que indica que el entrecruzado con el PGAL hace que las cadenas tengan enlaces fuertes y no permitan el paso de las moléculas de agua tan fácilmente. Es de peculiar interés hacer notar que las películas no se hinchaban ni mostraron aumento de peso al estar en la cámara de humedad controlada (50 %HR) como se inspeccionó en cada prueba de acondicionamiento.

4.6. Ángulo de contacto

El análisis de ángulo de contacto se llevó a cabo de forma superficial evaluando la forma de la gota y aceptando que la gota tiene una forma simétrica respecto a un eje vertical teniendo en cuenta que las únicas fuerzas que afectan a la forma de la gota son la tensión superficial y la gravedad. Los ángulos se miden ajustando una expresión matemática a la forma de la gota y se establece entre la recta tangente de la gota y la base de referencia.

La rugosidad y la energía superficial son factores dominantes en la capacidad de humectación de los materiales; siendo la rugosidad el factor determinante; las lecturas del ángulo de contacto nos ayudaron a determinar si el material conserva el carácter hidrófilo de la CMC y en qué medida.

Al observar la *Figura 26* podemos advertir que la capacidad de humectación decrece al aumentar el porcentaje de PGAL en la muestra, en tanto que es directamente proporcional al porcentaje de glicerol. Este comportamiento es explicado por el carácter higroscópico del glicerol y el aumento de la rugosidad del material al incrementar la cantidad de PGAL. A la par podemos subrayar que ningún material conserva la capacidad de mojar de una película de CMC, la

reacción de entrecruzado reduce la cantidad de grupos OH⁻ susceptibles de formar puentes de hidrógeno con la gota de agua.

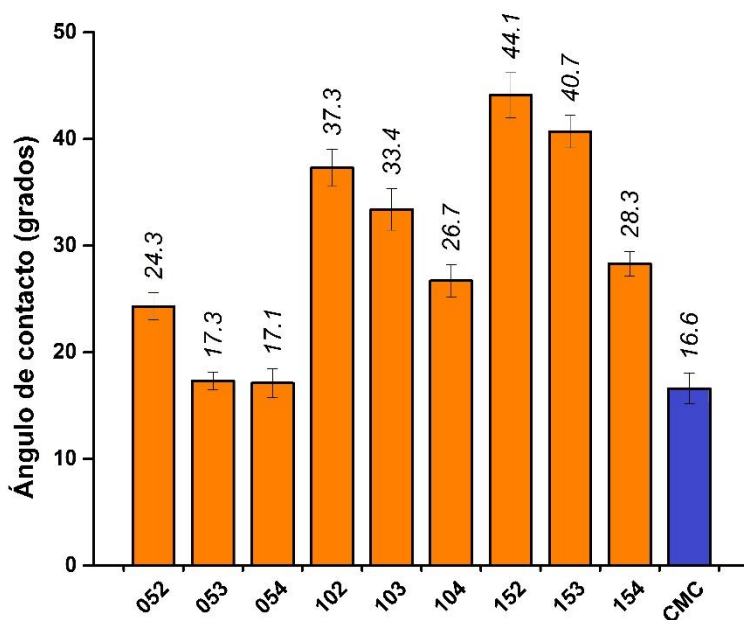


Figura 26. Ángulo de contacto

4.7 Capacidad antioxidante

Es conocido que los polifenoles actúan como antioxidantes por donación de electrones o átomos de hidrógeno (Leopoldini, 2004); los grupos electrodonadores en posiciones *orto* o *para* favorecen la transferencia del átomo de hidrógeno a los radicales libres mediante la reducción de la BDE del enlace fenólico O-H y la estabilización del radical fenoxi resultante compensando su deficiencia electrónica mediante efectos de resonancia o hiperconjugación. Los sustituyentes desactivantes en estas posiciones clave también pueden estabilizar los radicales fenoxi, como resultado de la deslocalización de su electrón a través de la conjugación extendida.

En el caso de combinaciones apropiadas de grupos activadores y desactivadores (ácido gálico y sus ésteres) los radicales fenoxi pueden ser estabilizados por resonancia y actúan principalmente como donadores de átomos de hidrógeno debido a la estabilidad adicional conferida al radical fenoxi resultante dadas las

interacciones de enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo adyacente. La facilidad con la que el átomo de hidrógeno se desprende se evalúa mediante el cálculo de la BDE y para ello se requiere de experimentos de espectroscopía de equilibrio EPR y técnicas de calorimetría fotoacústica (Quideau et al., 2011).

En trabajos realizados previamente en el grupo se evaluó la capacidad antioxidante del PGAL mediante EPR en disolución (utilizando el radical DPPH) obteniendo IC_{50} de $23.48 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1 mg de PGAL tiene el poder antioxidante de 0.195 mg de Trolox) y para fines de este trabajo fue importante comprobar que dicha propiedad del PGAL se conserva en las películas; lo que no fue posible por inhibición de radicales en solución debido a su estructura reticulada y por tanto insoluble.

Sin embargo, la EPR en sólido permite seguir apreciando señales de electrones desapareados y su disposición característica denominada “estructura hiperfina” que surge de la interacción entre el momento magnético del electrón impar desapareado y los núcleos atómicos vecinos con espín distinto de cero. Es decir, que esta técnica permitirá apreciar cualitativamente mediante la excitación magnética del spin las interacciones dipolo-dipolo del grupo fenólico, más no será útil para determinar un valor de BDE ni de poder antioxidante debido a la carencia de un estándar adecuado.

Con el fin de establecer una comparación entre el PGAL y las películas se comprobó que el polímero exhibe una señal intensa en EPR de sólidos (*Figura 27*), una señal sencilla con un área bajo la curva de 2.0023 característica de un electrón (atribuible a un núcleo con spin de 1 y un número cuántico azimutal de 1) que corresponde al isótopo ^1H .

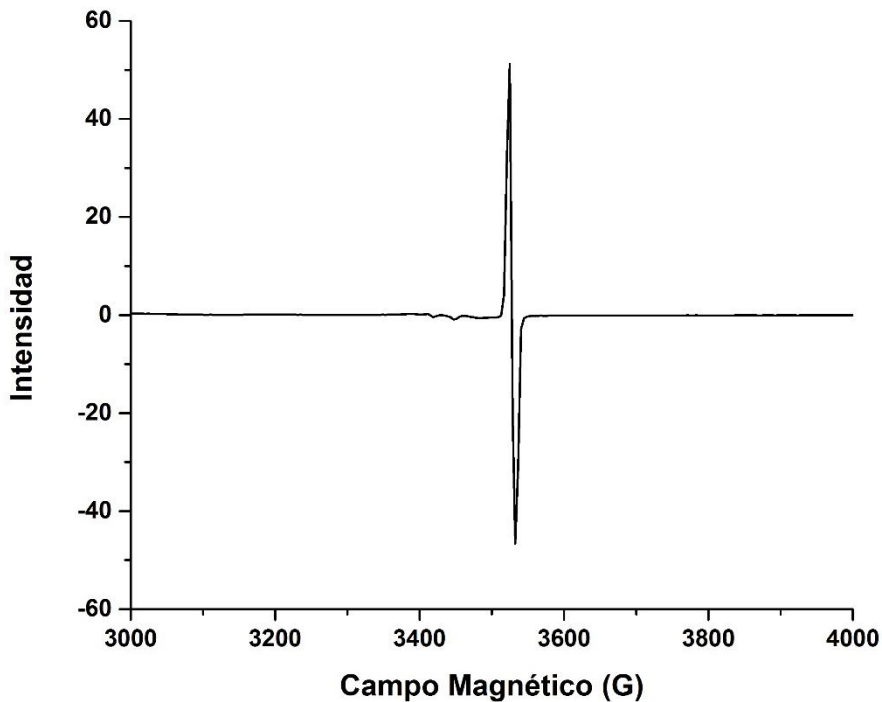


Figura 27. Espectro de EPR en sólido para PGAL.

Las muestras de todas las formulaciones se midieron en las mismas condiciones que el PGAL y se comprobó que se mantenía la señal (*Figura 28*) aunque en menor intensidad, lo cual es asociado a la disminución de grupos OH libres después de la reacción de entrecruzado.

Al contrastar los espectros de EPR de todas las formulaciones (*Figura 28*) podemos indicar que la intensidad de la señal es proporcional al porcentaje de PGAL presente en la muestra y que a su vez se ve disminuida por la cantidad de glicerol (*Figuras 29, 30 y 31*); se reconoce que el glicerol puede estar efectuando enlaces entre cadenas por atracciones polares con los grupos fenólicos.

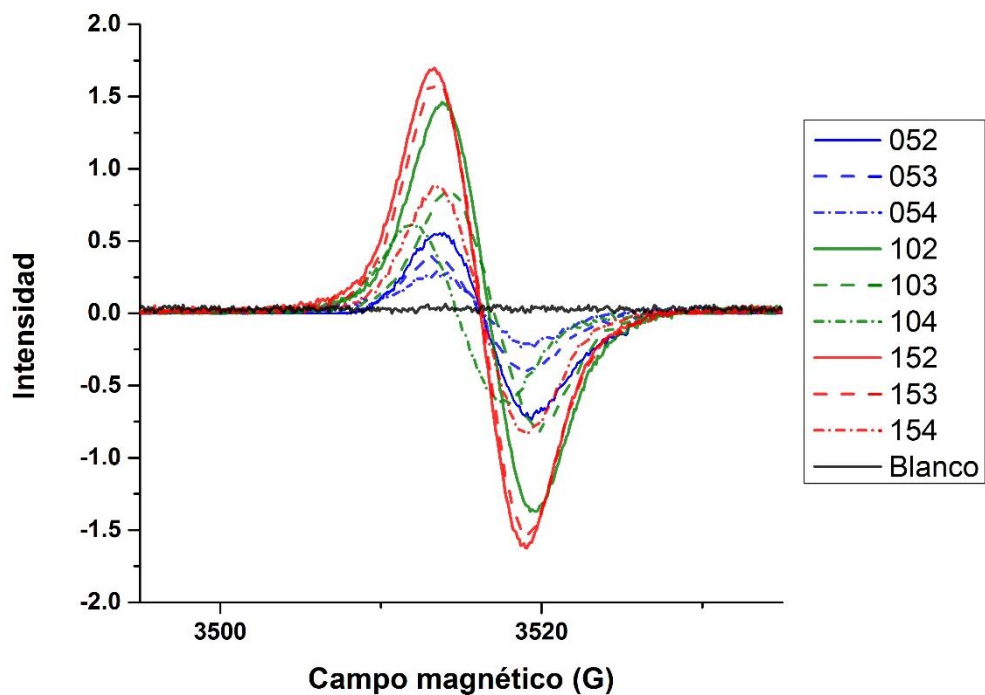


Figura 28. Espectro de EPR en sólido para todas las formulaciones.

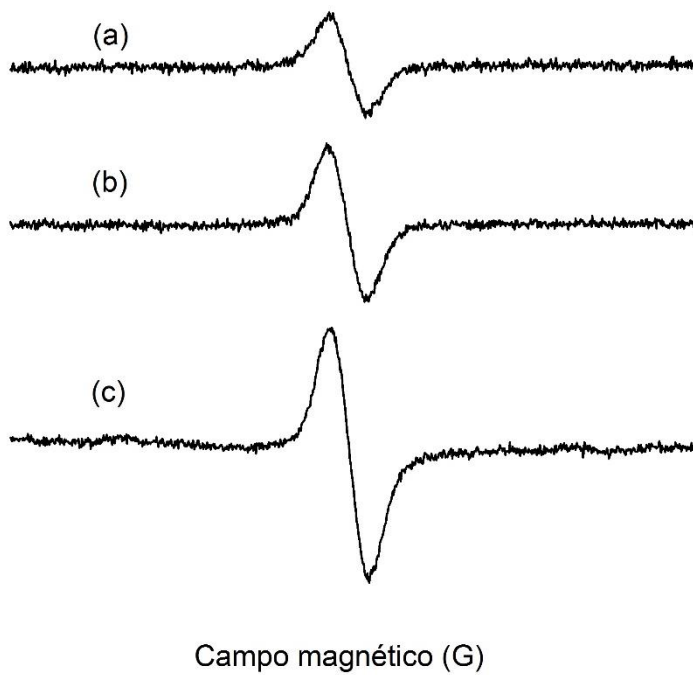


Figura 29. Espectro de EPR en sólido, 054 (a), 053 (b) y 052 (c).

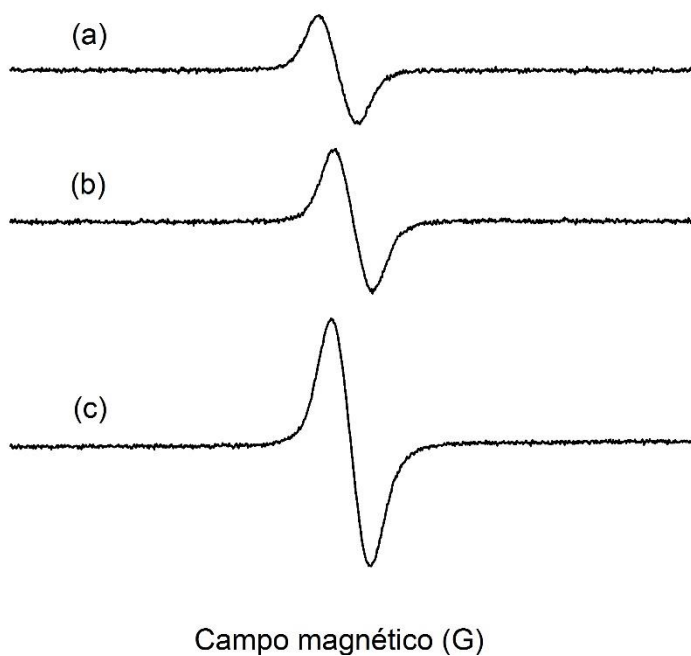


Figura 30. Espectro de EPR en sólido, 104 (a), 103 (b) y 102 (c).

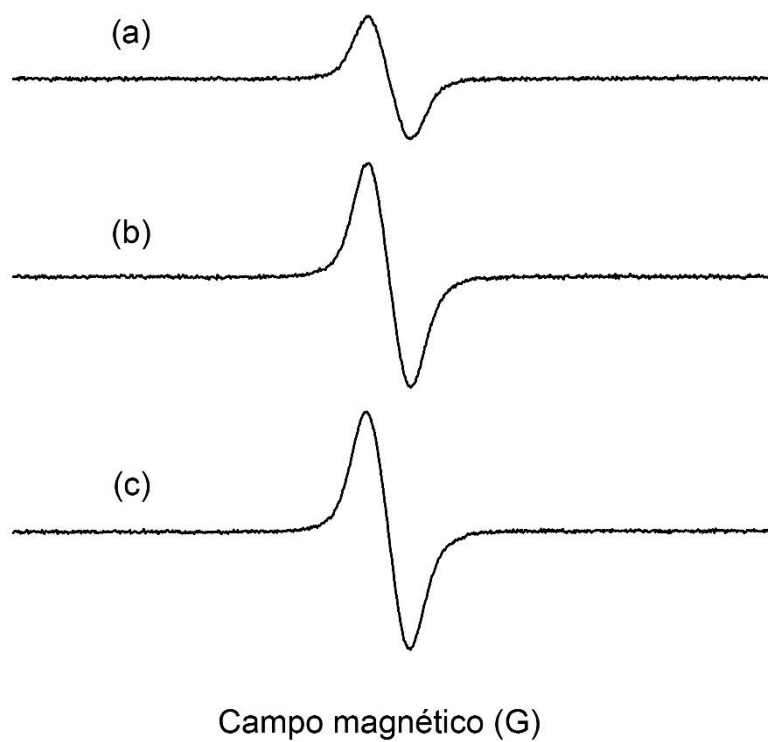


Figura 31. Espectro de EPR en sólido, 154 (a), 153 (b), 152 (c).

4.8 Actividad antimicrobiana

La prueba de inhibición bacteriana se realizó con cepas patógenas de interés farmacológico; Gram positivo (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) y negativo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) inoculadas en las cantidades que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5:
Cantidad de inóculo

Cepa	Tamaño del inóculo
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 291212	100 µL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	100 µL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	100 µL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	100 µL

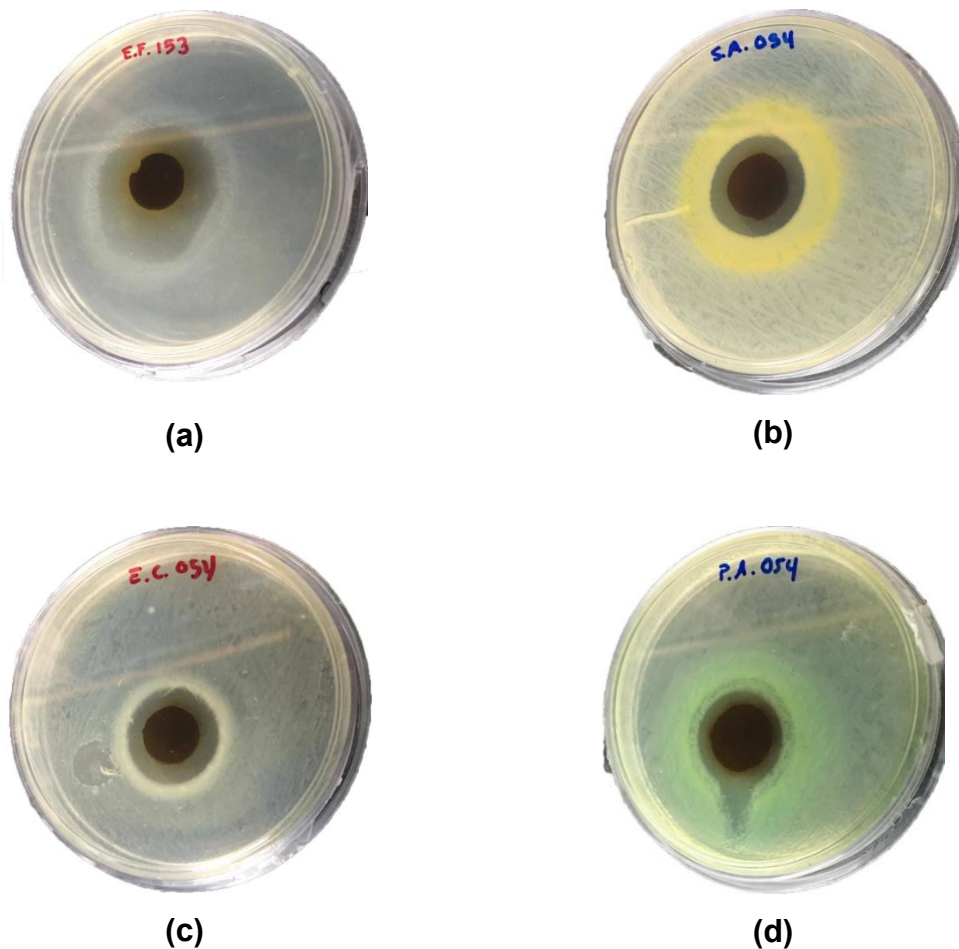


Figura 32. Halos de inhibición, *E. faecalis* (a), *S. aureus* (b), *E. coli* (c), *P. aeruginosa* (d).

Tabla 6:
Halos de inhibición

Muestra	Halo de inhibición (cm)				Criterio
	P.A.	E.F.	E.C.	S.A.	
052	1.55	0.83	0.95	0.63	Susceptibles
053	1.23	0.70	0.93	0.45	
054	0.78	0.58	0.65	0.35	
102	1.45	0.40	0.90	0.50	
103	1.13	0.52	0.88	0.50	
104	0.78	0.53	0.93	0.35	
152	0.88	0.85	1.08	0.6	
153	0.73	0.65	0.80	0.45	
154	0.68	0.53	0.80	0.45	

De los estudios realizados se puede observar que las cuatro cepas son sensibles a los materiales utilizados pues todos generaron halo de inhibición significativo (*Figura 32*), por lo que según los criterios seguidos (Jorgensen et al., 2015) se puede decir que las cepas son susceptibles al material. Por estudios realizados previamente en el grupo se sabe que el PGAL tiene acción antimicrobiana sobre las bacterias Gram positivas mientras que al analizar la Tabla 6 se ve que no hay una diferencia entre cepas de diferente Gram por lo que el efecto bactericida es debido únicamente a la disminución del pH causado por la presencia de ácido cítrico; esto se comprobó al neutralizar las películas y encontrar que el halo se perdía.

CONCLUSIONES

Con el entrecruzamiento del poli(ácido gálico) y la carboximetilcelulosa se logró obtener y caracterizar una película cuyas cualidades son propicias para ser probada en ingeniería de tejidos.

La resistencia de los materiales es directamente proporcional a la cantidad de PGAL y glicerol presentes; en comparación con la piel humana los materiales presentan mejor elasticidad siendo todos buenos candidatos para la aplicación en tratamientos de piel, pudiendo ser el mejor la formulación 154 que presenta una resistencia máxima de 31.02 MPa, siendo a su vez, la menos rígida con un módulo de Young de 5.85 MPa.

Al estudiar la permeabilidad al vapor de agua los materiales presentaron sensibilidad a las variaciones de concentración de glicerol y se encuentra que son menos permeables que los materiales con base en matrices de hidratos de carbono.

La capacidad antioxidante se ve reducida por la adición de plastificante, aunque se conserva en cierta cantidad que podría resultar benéfica al evitar el deterioro celular por el estrés oxidativo. El material presenta actividad antimicrobiana de inicio, aunque la pierde conforme se va neutralizando. En conjunto el material presenta buenas características para su uso potencial en ingeniería de tejidos.

TRABAJO FUTURO

- Estudiar mediante ensayos in vitro la adhesión y proliferación de diversas líneas celulares.
- Analizar la sensibilidad a la degradación del material en condiciones referentes a su potencial uso mediante hidrolisis enzimática y por cambio de pH.

- Identificar los productos de degradación y analizar sus posibles efectos citotóxicos y bactericidas.
- Medir las interacciones eléctricas entre el material y los cultivos celulares para determinar si es posible su uso in vivo.

REFERENCIAS

Adinugraha, M. P., & Marseno, D. W. (2005). Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT). *Carbohydrate Polymers*, 62(2), 164-169.

Agache, P. G., Monneur, C., Leveque, J. L., & De Rigal, J. (1980). Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. *Archives of dermatological research*, 269(3), 221-232.

Alonso, D., Gimeno, M., Olayo, R., Vázquez-Torres, H., Sepúlveda-Sánchez, J. D., & Shirai, K. (2009). Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 536-543.

Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., & Mougin, C. (2002). Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, 41(23), 7325-7333.

Cholbi, M. R., Paya, M., & Alcaraz, M. J. (1991). Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia*, 47(2), 195-199.

Christenson, A., Dimcheva, N., Ferapontova, E. E., Gorton, L., Ruzgas, T., Stoica, L., & Aust, S. D. (2004). Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes. *Electroanalysis*, 16(13-14), 1074-1092.

D. Talens-Perales, J. M.-N. (2015). Enzymes: Functions and Characteristics. *Encyclopedia of Food and health* (págs. 532–538). España: Elsevier Ltd.

Dangles, O. (2008). C. Dufour in *Recent Advances on Polyphenol Research*, Vol. 1.

Ferreira, D., & Li, X. C. (2000). Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Natural product reports*, 17(2), 193-212.

Gennadios, A., Weller, C. L., & Gooding, C. H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of food engineering*, 21(4), 395-409.

Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., & Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 369-385.

Gontard, N., Guilbert, S., & CUQ, J. L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58(1), 206-211.

Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical reviews*, 110(6), 3479-3500.

Ji, L. L., & Leichtweis, S. (1997). Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age*, 20(2), 91-106.

Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition (pp. 1253-1273). American Society of Microbiology.

Kang, H., Liu, R., & Huang, Y. (2015). Graft modification of cellulose: methods, properties and applications. *Polymer*, 70, A1-A16.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358-3393.

Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., & Wagenknecht, W. (1998). Fundamentals and analytical methods. *Comprehensive cellulose chemistry*, 1, 236.

Komori, H., & Higuchi, Y. (2010). Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Biomolecular concepts*, 1(1), 31-40.

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., & Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916-4922.

Liu, Y., Ma, S. S., Ibrahim, S. A., Li, E. H., Yang, H., & Huang, W. (2015). Identification and antioxidant properties of polyphenols in lotus seed epicarp at different ripening stages. *Food chemistry*, 185, 159-164.

López, J., Hernández-Alcántara, J. M., Roquero, P., Montiel, C., Shirai, K., Gimeno, M., & Bázquez, E. (2013). Trametes versicolor laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 100-105.

Madsen, H. L., & Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 6(8), 271-277.

Madurantakam, P. A., Cost, C. P., Simpson, D. G., & Bowlin, G. L. (2009). Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds.

Møller, P., Wallin, H., & Knudsen, L. E. (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions*, 102(1), 17-36.

Nimmi, O. S., & George, P. (2012). Evaluation of the antioxidant potential of a newly developed polyherbal formulation for antiobesity. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 4(3), 505-510.

Oguchi, T., Tawaki, S. I., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2000). Enzymatic Synthesis of Soluble Polyphenol. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 73(6), 1389-1396.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.

Pilla, S. (Ed.). (2011). *Handbook of bioplastics and biocomposites engineering applications* (Vol. 81). John Wiley & Sons.

Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37663-37669.

Platzer, N. (1982). *The technology of plasticizers*, J. Kern Sears and Joseph R. Darby, SPE Monograph Series, Wiley, New York, 1982, 1166 pp.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.

Reuben, J., & Conner, H. T. (1983). Analysis of the carbon-13 NMR spectrum of hydrolyzed O-(carboxymethyl) cellulose: Monomer composition and substitution patterns. *Carbohydrate research*, 115, 1-13.

Rico, M. B., & Gomis, A. M. (2012). *Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades*. Universidad de Alicante.

Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical reviews*, 96(7), 2563-2606.

Standard, A. S. T. M. (1991). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. *American Society for Testing and Materials, West Conshohocken*, Ed, 194-202.

Uyama, H., Kurioka, H., Kaneko, I., & Kobayashi, S. (1994). Synthesis of a New Family of Phenol Resin by Enzymatic Oxidative Polymerization. *Chemistry letters*, (3), 423-426.

Watson, R. R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. (Eds.). (2013). *Polyphenols in human health and disease*. Academic Press.