



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES

UNIDAD LEÓN

**EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE SUTURAS DE
SEDA MODIFICADAS CON QUITOSANO**

FORMA DE TITULACIÓN: TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN
ODONTOLOGÍA**

P R E S E N T A:

ALEJANDRA ALVARADO NÚÑEZ

TUTOR: DRA. MA. CONCEPCIÓN ARENAS ARROCENA

ASESOR: MTRA. PALOMA NETZAYELI SERRANO DÍAZ

ASESOR: DRA. LILIANA ARGUETA FIGUEROA

León, Guanajuato, 2019





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.



ÍNDICE

Dedicatoria.....	5
Agradecimientos.....	6
Resumen.....	7
Palabras clave.....	8
Abstract.....	9
Key words	10
Introducción.....	11
CAPÍTULO 1.....	13
Marco teórico	14
1. Sutura y Clasificación.....	14
1.1 Nudo quirúrgico y Norma Oficial Mexicana.....	17
1.2 Sutura de seda	19
1.3 Biopelícula.....	20
1.3.1 Composición de la biopelícula dental.....	20
1.3.2 Colonización bacteriana.....	21
1.4 Biopolímeros	24
1.4.1 Quitosano	25
1.4.2 Mecanismo de acción del quitosano como agente antimicrobiano	27
1.5 Caracterización	27
1.5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	28
1.5.2 Microscopía Bifocal.....	29
1.6 Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana	29
1.6.1 Ensayos de difusión en agar	29
1.6.2 Ensayo de microdilución	30
1.6.3 Cuantificación de viabilidad bacteriana con ensayo de MTT	30



1.6.4 Ensayo de viabilidad bacteriana en agar Mueller-Hinton	30
Antecedentes	31
CAPÍTULO 2.....	33
2.1 Planteamiento de problema.....	34
2.2 Justificación.....	36
2.3 Objetivo general	37
2.3.1 Objetivos específicos	37
2.4 Pregunta de investigación	37
2.5 Hipótesis	37
CAPÍTULO 3.....	38
Metodología	39
3.1 Diseño del estudio	39
3.2 Operacionalización de variables	39
3.3 Universo del trabajo.....	40
3.4 Tamaño de muestra.....	40
3.5 Criterios de selección	40
3.5.1 Criterios de inclusión.....	40
3.5.2 Criterios de exclusión.....	40
3.5.3 Criterios de eliminación.....	40
3.6 Materiales y reactivos	41
3.7 Desarrollo del proyecto	42
3.7.1 Desgomado de suturas.....	42
3.7.2 Preparación de quitosano	42
3.7.3 Recubrimiento de suturas con quitosano	43
3.7.4 Caracterización morfológica.....	43
3.7.5 Actividad antimicrobiana	43



Implicaciones éticas.....	49
CAPÍTULO 4.....	50
4. Resultados	51
4.1 Descripción morfológica de suturas por estereoscopia.....	51
4.2 Morfología de suturas por SEM.....	53
4.3 Actividad antimicrobiana.....	60
4.3.1 Método de difusión en agar.....	60
4.3.2 Sensidiscos antibióticos como control positivo.....	65
4.3.3 Discos de papel como control negativo.....	66
4.4 Ensayo de microdilución.....	67
4.5 Microscopía Bifocal complementario al ensayo de microdilución.....	69
4.6 Cuantificación de viabilidad bacteriana mediante reducción metabólica del MTT ...	74
4.7 Análisis estadístico ANOVA y Tukey	76
4.8 Ensayo de viabilidad bacteriana en agar Mueller-Hinton	81
CAPÍTULO 5.....	84
5.1 Discusión:.....	85
5.2 Conclusiones.....	87
Bibliografía	88
Anexos	94



Dedicatoria

*A mis padres, **Margarita** y **Alejandro**, por ser mi pilar, por su apoyo incondicional, por permitirme salir de la casa para que siguiera mi camino, por ser mi mayor ejemplo a seguir, por todo el amor depositado en mi persona desde mi primer día de vida; este logro también es suyo, los amo.*

*A mis hermanos, **Jesús** y **Oli**, por ser mis primeros compañeros de juegos y por seguir a la fecha siempre presentes a pesar de la distancia. Por recibirme con tanto amor después de mucho tiempo sin vernos.*

*A mis roomies, **Héctor**, **Oxner** y **Aleks**, quienes me han acompañado por ya casi 6 años en mi vida en León, por ser casi como hermanos para mí. Estoy feliz de haber compartido tantos momentos, siempre los tendré presentes.*

*A mis amigos de la universidad, principalmente a **Sonora**, por todas las cosas vividas, por aligerar la carga que a veces implicaba la clínica, por permitirme conocerlos y dejarme ser quien soy.*

*A las amigas que dejé en Zacatecas, **Ximena**, **Claudia**, **Mónica**, **Andrea**, **Elsa**, **Brenda**, **Elisa**, por acompañarme desde mis 6 años, por seguir en mi vida después de tanto tiempo, por quererme. Después de mi familia, ustedes son la máxima expresión de amor que tengo en mi vida.*

*A mi tío **Jorge Eduardo**, por siempre echarme la mano a mí y a mi familia, por haber asistido a la ceremonia del diploma de aprovechamiento, significó mucho.*

*Y por último, pero no menos importante, a **Dios**, cuya identidad sigo sin descifrar del todo, pero que ha estado siempre presente en mi vida.*

“Incapaz de percibir tu forma, te encuentro a mi alrededor. Tu presencia llena mis ojos con tu amor, pone humilde mi corazón, porque estás en todas partes”.



Agradecimientos

A la **ENES León, UNAM**, por haberse convertido en mi segundo hogar durante los últimos años, por permitirme estudiar y crecer profesionalmente, por ser espacio para formar mexicanos preparados, por velar por la educación. Asimismo, a la clase trabajadora del país, por permitir (de manera indirecta) que exista la escuela pública.

A mi tutora, la **Dra. Ma. Concepción Arenas**, por su paciencia y dedicación a este proyecto.

A todas las personas que integran el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES León, sobre todo a **Paloma y Ángel**, por su constante motivación y apoyo. Verlos trabajar en sus proyectos fue inspiración para desarrollar el mío. No sé qué habría hecho sin ustedes, se los agradezco de todo corazón.

Al doctor **Guillermo Pérez**, por su facilitación de la cepa *S. mutans* y a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por su tan generosa donación a nuestro laboratorio.

Al proyecto PAPIIT-DGAPA IN115018, Obtención de nanoestructuras de sulfuros de metales de transición no-tóxicos para el aprovechamiento de energía sostenible en celdas solares híbridas.

Al proyecto PAPIME-DGAPA PE207818, Estrategias didácticas a través de TIC's para la enseñanza-aprendizaje integral de la Asignatura Análisis Crítico de la Literatura Científica en el área de la Salud.

A la beca de Titulación por Proyecto de Investigación para la UNAM 2018-2019, por el apoyo económico otorgado.



Resumen

Introducción: Actualmente uno de los problemas más graves de salud pública es la resistencia antibiótica, por lo cual es necesaria la creación de nuevos agentes antimicrobianos. La sutura de seda es un elemento altamente utilizado en cirugía oral, sin embargo, presenta desventajas como que promueve la proliferación de biopelícula dental en su superficie, haciendo de esta manera, más vulnerable al paciente a contraer una infección. En el presente trabajo se propone el uso del quitosano como recubrimiento de suturas de seda, ya que este biopolímero tiene efectos bactericidas frente algunas bacterias y levaduras.

Objetivo: Analizar las propiedades morfológicas y antimicrobianas de fibras de sutura de seda recubiertas con quitosano para su posible aplicación en cirugía oral.

Metodología: Se prepararon 279 muestras de 1 cm de suturas de seda calibre 4-0 marca Ethicon, previamente desgomadas con solución de NaOH al 10 % y lavadas bajo acción de ultrasonido durante 5 minutos. Se realizó mezcla de 0.2 g de quitosano disuelto en 10 ml de agua bidestilada con ácido acético a una concentración de 0.5 %. Un primer grupo experimental de suturas se colocaron en un vaso de precipitados con agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, mientras que un segundo grupo se mantuvo en agitación magnética durante 24 horas a una temperatura de 60 °C. Una vez finalizado este proceso, realizó caracterización morfológica mediante Estereoscopía y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), así como evaluación de actividad antimicrobiana frente a las cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*, mediante método de difusión en agar, ensayo de microdilución, cuantificación de viabilidad bacteriana mediante reducción metabólica del MTT y finalizando con ensayo de viabilidad bacteriana en agar Mueller-Hinton. El análisis estadístico realizado fue Levene, ANOVA y prueba Tukey.

Resultados: En las imágenes de la espectrofotometría no se notó una diferencia en la estructura de las suturas de ambos grupos, diferente a lo encontrado en la caracterización morfológica SEM, donde se observó en el primer grupo experimental, lo que podrían ser partículas de quitosano que no se disolvieron por completo, contrastante con las suturas del grupo 2, en las cuales se puede apreciar mayor uniformidad en toda su superficie. En la evaluación de actividad antimicrobiana se encontró mediante el ensayo de difusión de



agar que el efecto del grupo 1 fue menos efectivo que el del grupo 2 en generación de zona de inhibición (*E. coli* 0.24/0.32 mm) (*S. aureus* 0.75/1.42 mm) (*S. mutans* 1.04/0.99 mm), en el ensayo de microdilución se obtuvo en porcentaje de inhibición (*E. coli* 17.39/43.26 %), (*S. aureus* 29.62/36.82 %), (*S. mutans* 32.64/36.93 %), para el ensayo de MTT se obtuvo en porcentajes de inhibición (*E. coli* 5/6 %), (*S. aureus* 9.4/14 %), (*S. mutans* 23.63/28.61 %). En el análisis estadístico ANOVA, se observó que sí existe una diferencia significativa, determinando con la prueba Tukey, que dicha diferencia significativa se encontraba entre los grupos experimentales con el control (antibiótico) y no entre los grupos experimentales ($P < 0.05$). En el ensayo de viabilidad bacteriana en agar Mueller-Hinton se encontró en *E. coli* que hubo crecimiento bacteriano del 100 % en ambos grupos experimentales, mientras que en *S. aureus* se encontró crecimiento del 100 % con el grupo 1 y del 33 % con el grupo 2 y en *S. mutans* hubo un crecimiento del 100 % del grupo 1.

Conclusión: El uso de quitosano demostró efectividad como agente antibacteriano en la inhibición de las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans*. No existe una diferencia estadísticamente significativa en la inhibición bacteriana entre los grupos experimentales.

Palabras clave

Quitosano, biopolímero, biopelícula dental, microorganismo oral, sutura de seda.



Abstract

Introduction: Currently one of the most serious public health problems worldwide is antibiotic resistance, due to this the creation of new antimicrobial agents is necessary. Silk suture is an element widely used in oral surgery in closing and confronting of tissues after a surgical intervention. One of the disadvantages of using this suture is that its multifilament and braided structure promotes the proliferation of dental biofilm on its surface; thus, making the patient more vulnerable to infection. Chitosan is a biopolymer of animal origin, highly abundant and easily obtained, which within its properties, has a bactericidal effect against some bacteria and yeasts.

Objective: To analyze the morphological and antimicrobial properties of silk suture fibers coated with chitosan for its possible application in oral surgery.

Methodology: 279 1-cm samples of silk sutures (4-0) of the brand Ethicon, were prepared previously with a 10 % NaOH solution and washed in an ultrasonic tub for 5 min. It was made a mixture of 0.2 g of chitosan dissolved in 10 ml of bidistilled water with acetic acid at a concentration of 0.5 %. This mixture was elaborated twice in order to have two experimental groups. The first experimental group was under magnetic stirring for 24 hours at room temperature (25° C approx.), while the second group was kept under magnetic stirring for 24 hours at a temperature of 60 °C. Once the suture coating process was completed, morphological characterization was carried out by using Stereoscopy and by Scanning Electron Microscopy (SEM), as well as evaluation of antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* by agar diffusion method, microdilution test, confocal microscopy complementary to the test of microdilution, quantification of bacterial viability through MTT metabolic reduction and bacterial viability test in Mueller-Hinton agar. The statistical analysis performed was Levene, ANOVA and Tukey test.

Results: In the morphological characterization, in the images obtained from the spectrophotometry, no significant difference was observed in the structure of the sutures belonging to group 1 compared to those of group 2, different from that found in the SEM morphological characterization, where it was observed that the group 1 presented on its surface what could be chitosan particles that did not completely dissolve, contrasting with



the sutures of group 2, in which greater uniformity could be seen in all its surface. In the evaluation of antimicrobial activity was found by the diffusion test agar that the effect of group 1 was less effective than group 2 in generating inhibition zone (strain group1/group2) = (*E. coli* 0.24/0.32 mm) (*S. aureus* 0.75/1.42 mm) (*S. mutans* 1.04 /0.99 mm). In the microdilution test, the results were obtained in percentage of inhibition (*E. coli* 17.39/43.26 %), (*S. aureus* 29.62/36.82 %), (*S. mutans* 32.64/36.93 %). While, for the quantification test of bacterial viability by metabolic reduction of the MTT the percentages of inhibition were (*E. coli* 5/6 %), (*S. aureus* 9.4/14 %), (*S. mutans* 23.63/28.61 %). In the statistic analysis ANOVA, it could be observed a significant difference in the three trials carried out, determining with the Tukey test, that this significant difference was among the experimental groups with the control (antibiotic). No statistically significant difference was found between the two experimental groups. In the test of bacterial viability in agar Mueller-Hinton it was found in *E. coli* that there was bacterial growth in both experimental groups in the three trials conducted. While, in *S. aureus* it was found growth in the three trials of group 1 and only one of the group 2 and *S. mutans* only had growth in the three trials of group 1.

Conclusion: The use of chitosan proved to be effective as an antibacterial agent in the inhibition of *E. coli*, *S. aureus* and *S. mutans* strains. No statistically significant difference in bacterial inhibition was found between the experimental groups.

Key words

Chitosan, biopolymer, dental biofilm, oral microorganism, silk suture.



Introducción

Una necesidad actual en el área de la salud es el desarrollo y creación de nuevos agentes antimicrobianos, debido al aumento en la resistencia a los antibióticos, lo cual representa un grave problema para la salud pública (1-2). Asociaciones como la UPUA (del inglés *Alliance for the Prudent Use of Antibiotics*) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) han reportado la importancia de evitar el uso indiscriminado de los antibióticos, así como han propuesto estrategias para disminuir este problema de carácter mundial, entre las cuales se encuentran acciones que la población podría realizar fácilmente, tales como el lavado de manos constante y evitar la automedicación (1-3); sin embargo, aunque estas medidas deberían de ser aplicadas y la prevención de las enfermedades debe de ser la primera línea de acción ante esta problemática, es de vital importancia realizar acciones para la modificación de los agentes antimicrobianos ya existentes y el desarrollo de nuevos.

El estudio de nuevos agentes antimicrobianos ha tomado fuerza en el área biomédica, dando como resultado la creación de materiales, tales como los biopolímeros (4), los cuales son altamente utilizados dado que son un recurso abundante, sustentable, renovable y amigable con el ambiente (5).

Uno de estos polímeros es el quitosano (*poly- β -(1,4)-2-amino-2-deoxy-gluco-pyranose*), material obtenido de la desacetilación de la quitina, la cual se obtiene del exoesqueleto de crustáceos como los cangrejos, gambas, langostas y algunos insectos.

Este material representa el segundo biopolímero más abundante en la tierra, después de la celulosa y tiene propiedades adsorbentes, catalíticas, hemostáticas, bacteriostáticas, bactericidas y antifúngicas (6-7).

Presenta ventajas en comparación con otros materiales antimicrobianos, como su biocompatibilidad, no toxicidad, biodegradabilidad, fácil adquisición, permeabilidad acuosa y buenas propiedades mecánicas de fuerza (5-8).

Una de sus posibles aplicaciones es como recubrimiento para las suturas, las cuales forman una parte fundamental dentro del área de cirugía, ya que aunque éstas permiten unir superficies, estabilizar márgenes de heridas y promover una adecuada cicatrización (9), por lo general se colocan en tejidos de alta vascularización, siendo este un factor de



riesgo para la infección de la zona quirúrgica (9-10), debido a que el medio bucal presenta las condiciones óptimas para la adherencia y desarrollo de microorganismos, ya que el ambiente húmedo, la temperatura y las superficies que lo componen, favorecen su proliferación.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo es la evaluación antimicrobiana de suturas de seda recubiertas con quitosano mediante diferentes ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, con las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans*, para en un futuro poder ser utilizadas en cirugía oral.



CAPÍTULO

1

- Marco teórico
- Antecedentes



Marco teórico

1. Sutura y clasificación

Las suturas son el medio temporal de aproximación de los bordes de un defecto que promueve la cicatrización de las heridas. Existen diferentes hilos de sutura, los cuales tienen características específicas dependiendo del tamaño y profundidad de la lesión que se vaya a suturar, la zona anatómica y los antecedentes del paciente (11).

Los tipos de sutura se clasifican según sus propiedades físicas y origen (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de suturas quirúrgicas. Fuente: (12).

Clasificación de suturas quirúrgicas		
Características	Naturales	Sintéticas
<i>Origen</i>	Animal	
	Catgut	
	<u>Seda</u>	Poliamidas
	Crin de Florencia	Poliésteres
	Vegetal	Polidioxanona
	Lino	Ácido poliglicólico
	Algodón	Poliglactin 910
	Origen mineral	Polipropileno
	Acero	Polietileno
	Plata	
<i>Permanencia</i>		No reabsorbibles
		Poliamidas
	Catgut	Poliésteres
	Ácido poliglicólico	Algodón
	Poliglactin 910	Lino
	Polidioxanona	<u>Seda</u>
		Acero y plata



	Monofiliares	Multifilamentosos
<i>Acabado industrial</i>		Torcidos
		Catgut
		Lino
	Polipropileno	Trenzados
	Poliamidas	Acero
	Metálicas	<u>Seda</u>
	Polidioxanona	Poliésteres
		Recubiertos
		Poliglactin 910
		Ácido poliglicólico
	Traumáticas	Atraumáticas
<i>Estructura</i>	Con agujero en la aguja	Sin agujero en la aguja
	Medida en ceros	
<i>Calibre</i>	6 a 0	

Origen:

Según su composición se clasifican en naturales y sintéticas, siendo de origen natural la seda y el catgut crómico los más utilizados; estos inducen mayor reacción inflamatoria que los sintéticos y distribuyen menos la fuerza, mientras que los de origen sintético como la poliamida o el polipropileno producen menos inflamación y presentan una mejor distribución de fuerzas (13).

Permanencia:

Un hilo de sutura se considera absorbible si pierde la mayoría de su fuerza tensil en 60 días después de haber sido colocado bajo una superficie cutánea, aunque no implique que se haya reabsorbido completamente. Pueden ser de origen natural (catgut) o sintético (poliglactina, ácido poliglicólico, polidioxanona, etc.), variando así los tiempos de absorción en función del material de fabricación. Las suturas de origen natural son



metabolizadas por enzimas del organismo, que las destruyen y participan en su absorción, mientras que las suturas sintéticas son hidrolizadas, es decir, el agua penetra en su estructura, disolviéndolas. El hidrolizado de las suturas sintéticas es menos agresivo para el organismo que la puesta en marcha del sistema enzimático que además de atacar la sutura, causa una serie de lesiones en los tejidos circundantes. Estas suturas pueden estar recubiertas o impregnadas con agentes que mejoran sus propiedades de manejo y teñidas con colorantes para aumentar su visibilidad en los tejidos (11).

Son aquellas de carácter permanente aquellas suturas que no se absorben, preparadas a partir de fibra orgánica, animal, vegetal, o filamentos sintéticos. Como características importantes, son de alta resistencia y también son sometidas a un proceso de recubrimiento para disminuir su capilaridad. Son útiles en pacientes que han demostrado hipersensibilidad a las suturas absorbibles o tendencia a formar cicatrices queloides (10-12).

Acabado industrial:

Se dividen en monofiliares y multifilamentosas (figura 1); las monofiliares tienen una superficie más suave, por lo que producen menos fricción y menos inflamación, pero requieren una mayor cantidad de nudos, ya que tienden a desanudarse. Las multifilamentosas consisten en una mezcla de filamentos, del mismo o distintos materiales, que son trenzados o unidos de alguna manera para formar un sólo hilo. Proporcionan mayor fuerza tensil y flexibilidad, pero a su vez presentan un mayor riesgo para la infección del sitio quirúrgico (12-13).

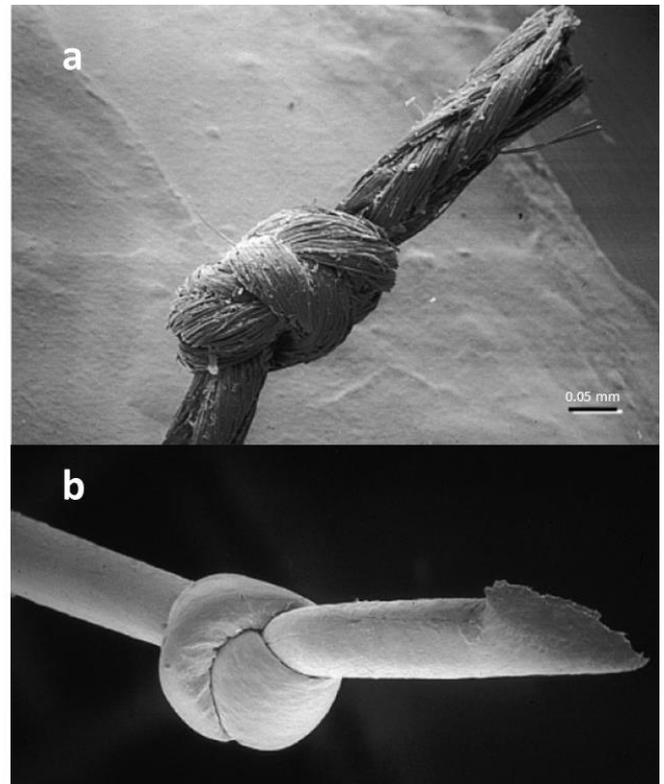


Figura 1. Micrografías SEM de estructura de suturas: (a) multifilamentosa trenzada, (b) monofilamentosa. Fuente:(10).



Estructura:

Las agujas de sutura tienen tres partes: la punta, el cuerpo y el ojo o extremo, que es donde se une el hilo. Según la punta, existen agujas con sección triangular o cortante, que se utilizan para suturar tejidos resistentes como la piel, y agujas con sección cónica o circular, que son menos traumáticas, pero menos penetrantes y se utilizan para tejidos más delicados como vísceras, vasos o peritoneo. También existen otras que combinan la sección triangular, punta roma y punta espatulada. Para la sutura de la piel se utilizan hilos con aguja triangular, ya que sus bordes son cortantes y permiten atravesar los tejidos con elevada resistencia como la piel y las fascias. (14)

En función de la curvatura se pueden clasificar en curvas o rectas. Las curvas pueden ser de $3/8$ o $1/2$ según la curvatura de una circunferencia; las de $3/8$ se utilizan para la piel en cirugía menor y las de $1/2$ para zonas más profundas, como aponeurosis, tejido celular subcutáneo o cavidades de difícil acceso (13).

Calibre:

Hace referencia al grosor de la sutura, donde a más ceros, menor calibre. En cirugía oral, por ejemplo, se utilizan habitualmente suturas de entre 3-0 y 4-0, en zonas de mayor tensión como el tronco o las extremidades inferiores se usan suturas entre 2-0 – 3-0, y en la cara de 4-0 – 6-0. A menor grosor, menor será el traumatismo tisular (13).

1.1 Nudo quirúrgico y Norma Oficial Mexicana

El nudo representa un factor importante para la determinar el nivel de inflamación que producirá una sutura (15) y aunque los nudos quirúrgicos son ampliamente aceptados en la tradición quirúrgica, tienen algunas desventajas mecánicas tales como:

- Tensión:

Aunque a primera vista la presión parece ser similar a lo largo de toda la línea de la sutura, aumenta en el nudo y en la sutura que está más cerca de ella. Esta tensión gradiente podría interferir con la cicatrización homogénea en los bordes de la herida (16).



- Deslizamiento:

El punto más débil de cualquier línea de sutura quirúrgica es el nudo. El segundo punto más débil es la parte de la sutura inmediatamente al lado del nudo, con reducciones del 35 % a 95 %, dependiendo del estado del material. Desde un punto de vista biomecánico, estos datos podrían explicar los efectos del deslizamiento del material de sutura a través del nudo, y el inevitable alargamiento sufrido en el punto del nudo.

- Error humano:

Para contrarrestar el efecto deslizante de las suturas, a veces están atados con más fuerza de la necesaria, lo que puede causar necrosis o fallas en la cicatriz de la herida, ya que se pierde la vascularidad de la zona (17).

- Cuerpo extraño:

El nudo en sí mismo representa una fuente de reacciones de cuerpo extraño en cualquier sutura. De hecho, la reacción inflamatoria alrededor del nudo se ha encontrado ser proporcional al tamaño del mismo, ya que favorece a la proliferación de bacterias (18), como se muestra en la figura 2.

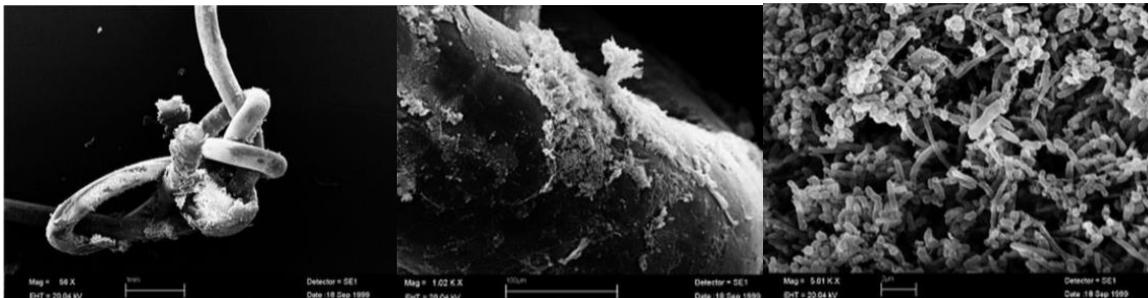


Figura 2. Micrografías SEM de paciente con 8 días postoperatorio, mostrando colonización bacteriana. Fuente: (15)

Por otro lado, actualmente las suturas en el territorio mexicano están regidas bajo la **Norma Oficial Mexicana NOM-067-SSA1-1993**, que establece las especificaciones sanitarias de las suturas quirúrgicas, dónde se determinan aspectos, tales como: resistencia a la tracción, rigidez de flexión, color, etc., según cada tipo de sutura a emplear.



La sutura debe presentar características, tales como; estar libre de nódulos, roturas, material extraño, piezas desensambladas, colores diferentes, porciones planas y deshilachamiento y debe tener color homogéneo (19).

1.2 Sutura de seda

La seda es una fibra proteica producida por una vasta cantidad de insectos y arañas, sin embargo, sólo unas cuantas son utilizadas con fines comerciales. La más importante y común de estas es la seda proveniente del gusano *Bombyx mori*, el cual se encuentra principalmente en la India y China (20).

La sutura de seda es un tipo de sutura no reabsorbible de origen natural, multifilamentosa con estructura trenzada (figura 3). La seda es la sutura natural más común y es ampliamente utilizada en la cirugía oral ya que es de fácil manejo, presenta alta resistencia a la tracción y es menos cortante que aquellas que son monofilamentosas, sin embargo produce una reacción tisular importante y tiende a acumular placa dentobacteriana más que otro tipo de suturas (9).

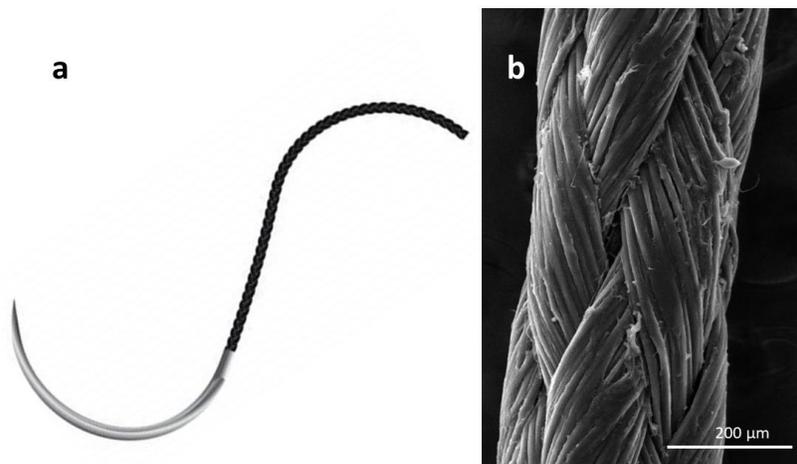


Figura 3. Composición morfológica de sutura de seda. (a) Representación macroscópica, b. Micrografía SEM. Fuente: (21)



1.3 Biopelícula

El medio bucal presenta las condiciones óptimas para la adherencia y desarrollo de microorganismos, ya que el ambiente húmedo, la temperatura y las superficies que lo componen, favorecen su proliferación (22). La microbiota oral es sumamente compleja, se sabe que más de 500 especies diferentes de bacterias pueden llegar a colonizar la boca del adulto y que un individuo puede albergar 150 o más especies diferentes (22-23).

Las biopelículas son poblaciones microbianas sésiles que se componen de células encerradas dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Las poblaciones microbianas en las superficies de los dientes (placa dental) son excelentes ejemplos de comunidades de biopelícula. La placa dental fue probablemente la primer biopelícula en haber sido estudiado en términos de su composición microbiana o a su sensibilidad a los agentes antimicrobianos, gracias a la accesibilidad que se tiene para realizar toma de muestras para analizar en el laboratorio (24).

1.3.1 Composición de la biopelícula dental

La composición de la biopelícula de la placa dental tiene muchas características en común con otras. Tienen una estructura heterogénea, con clara evidencia de canales abiertos llenos de líquido a través de la masa de la placa (23).

La composición de la placa es variable, dependiendo de la posición del diente en la arcada, su localización en la superficie dental, y el tiempo que lleve en formación y está formada por una matriz intracelular que consta de materiales orgánicos e inorgánicos derivados de la saliva, el fluido crevicular gingival y productos bacterianos (25).

Los componentes orgánicos de la matriz incluyen polisacáridos, proteínas, glicoproteínas, material lípido y DNA, mientras que los componentes inorgánicos, cuya fuente principal es la saliva, son predominantemente calcio y fósforo, con vestigios de otros minerales como sodio, potasio y flúor.

Un gramo de placa dental (peso húmedo) contiene casi 10^{11} bacterias y entre los microorganismos no bacterianos que pueden ser encontrados en la placa se incluyen las arqueas, levaduras, protozoos y virus (26). En la placa madura, una pequeña muestra



puede contener de 12 a 17 especies distintas, pero la composición bacteriana puede variar dependiendo del sitio anatómico de donde haya sido tomada (24). Las bacterias se encuentran no sólo en los tejidos blandos y la superficie de los dientes, también tienen la capacidad de adherirse y penetrar en los túbulos dentinarios (23), como se puede apreciar en la figura 4.

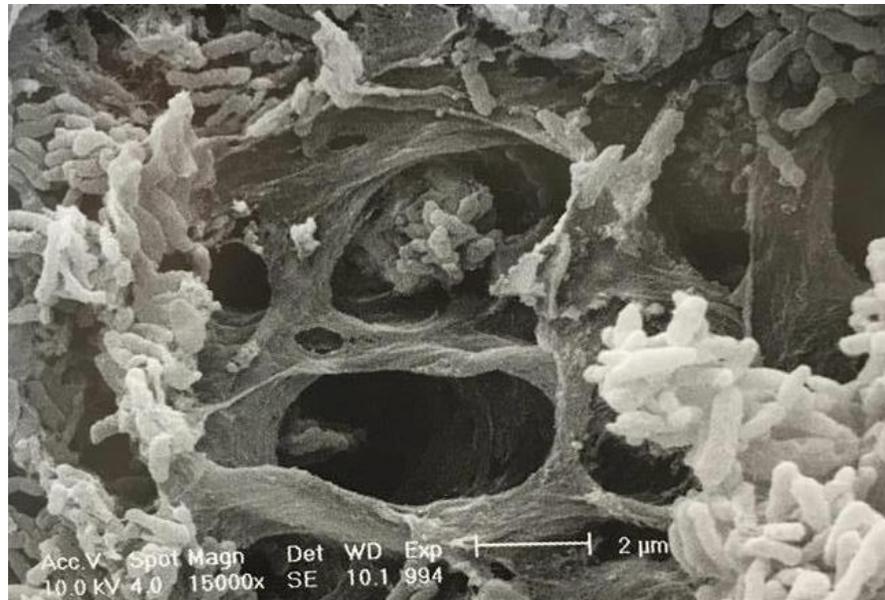


Figura 4. Micrografía SEM de bacterias en los túbulos dentinarios. Fuente: (23).

1.3.2 Colonización bacteriana

El realizar el cepillado dental y de mucosas no garantiza la eliminación de bacterias, ya que se ha comprobado que la recolonización comienza inmediatamente y pueden detectarse bacterias antes de 3 minutos de la introducción de esmalte estéril en la boca (22).

Los pasos en la colonización bacteriana se muestran en la figura 5, y se resumen de la siguiente manera:

1. Deposición.

Fase en que los microorganismos incapaces de unirse químicamente o físicamente a la película, se depositan en fosas y fisuras (defectos estructurales del esmalte) y estos defectos los retienen. Esta fase es reversible porque no se unen, solo se depositan, es



reversible porque hay factores extrínsecos (cepillado) o intrínsecos (saliva) que impiden su unión y son los siguientes:

- Transporte a la superficie.

Consiste en la movilización de las bacterias hacia la superficie en la que va a permanecer adherida, esta puede ser mediante movimientos brownianos (desplazamiento promedio de 40 μm /hora), el flujo de líquido o a través del movimiento bacteriano activo (23).

- Adhesión inicial.

Es la adhesión reversible de la bacteria e inicia cuando las células bacterianas entran en estrecha proximidad con la superficie (distancia de separación aproximada de 50 nm) (27).

- Fijación fuerte.

Se establece un anclaje firme entre la bacteria y la superficie mediante las adhesinas (proteínas) y receptores complementarios (glicoproteínas o polisacáridos) (23). Una vez que se presenta este anclaje entre microorganismos y diente, se considera una unión irreversible para los factores intrínsecos, sin embargo reversible para factores extrínsecos como el cepillado (27-28).

2. Coagregación

Se refiere a los microorganismos que forman la segunda capa sobre aquellos que están previamente adheridos a la película, la cual puede ser homotípica, la cual se da cuando se unen 2 microorganismos de la misma especie, o heterotípica, que es cuando se unen 2 especies distintas (23).

3. Crecimiento y maduración:

Con la coagregación se siguen formando más capas, y conforme aumentan se dan una serie de cambios.



- Cambios cuantitativos:

Se reproducen y aumentan en población los microorganismos previamente adheridos o por coagregación de la misma o nuevas especies.

- Cambios cualitativos:

Conforme se van agregando las capas, la placa se vuelve más gruesa, por lo tanto, el ambiente o ecosistema de las capas más profundas cambia radicalmente, es decir pasará de un ambiente aerobio a uno anaerobio, esto entonces producirá un cambio de la especie predominante en dichas áreas de la placa (29).

4. Desprendimiento activo

Las bacterias pueden responder a las señales ambientales y separarse de las superficies, permitiendo que las células colonicen en otros lugares. Por ejemplo, las bacterias que inicialmente se encontraban en superficie dental, pueden colonizar carrillos, lengua, encía, etc. (30).

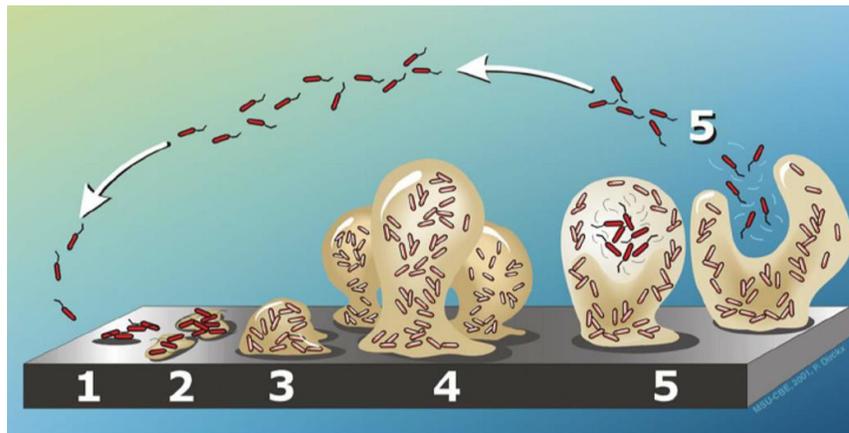


Figura 5. Etapas en la formación de biopelícula bacteriana. Fuente: (31).

Un claro ejemplo de la formación de biopelícula es el de *Candida albicans*, el cual, a pesar de tratarse de una levadura, tiene las mismas etapas de formación que las bacterias. En la siguiente imagen se pueden apreciar las etapas de crecimiento de dicha biopelícula observado con SEM.

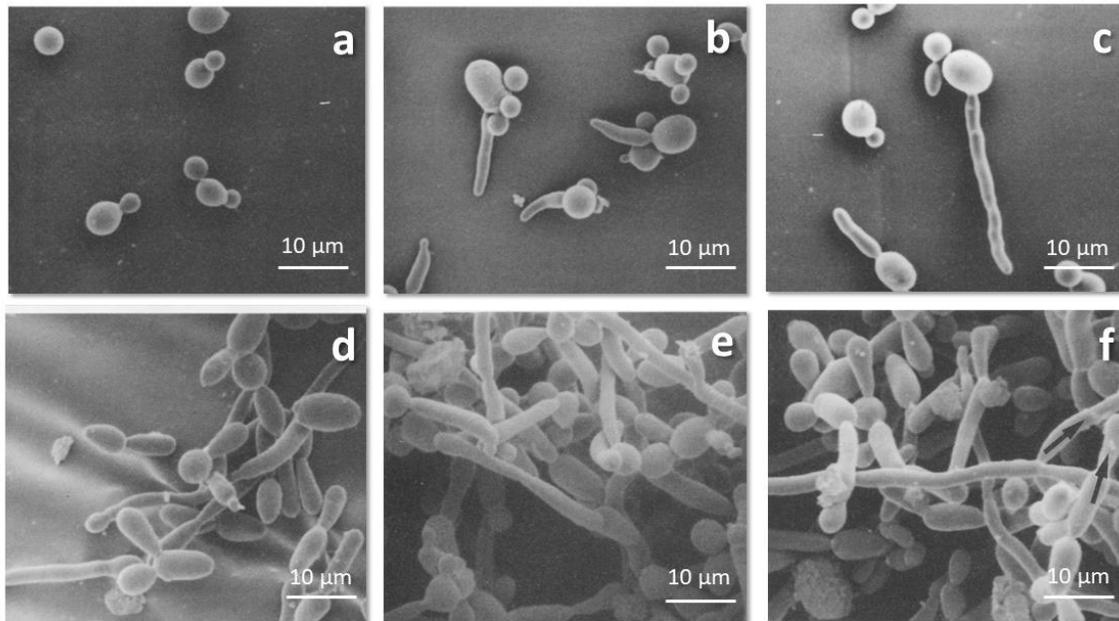


Figura 6. Micrografías SEM de biopelículas por *Candida albicans* en discos de catéter de PVC a (a) 1 hora, (b) 3 horas, (c) 6 horas, (d) 18 horas, (e) 24 horas y (f) 48 horas. Fuente: (32).

1.4 Biopolímeros

Los biopolímeros son polímeros producidos por organismos vivos y pueden derivarse de sistemas microbianos, extraídos de plantas, o químicamente sintetizadas a partir de sistemas biológicos básicos. Presentan algunas ventajas en comparación con los polímeros sintéticos, como que tienen una estructura y degradabilidad bien definidas (33).

Los biopolímeros se han desarrollado para su uso como materiales médicos, envases, cosméticos y alimentos, aditivos, tejidos para prendas de vestir, productos químicos para el tratamiento del agua, plásticos industriales, absorbentes, biomarcadores e incluso para almacenamiento de datos.



Tabla 2. Clasificación de biopolímeros. Fuente: (33).

Clasificación de biopolímeros

Clasificación	Origen	Biopolímero
Polisacáridos	Plantas/algas	Almidón (amilosa / amilopectina), celulosa, agar, alginato, carragenano, pectina, konjac.
	Animal	Quitosano/quitina , ácido hialurónico
	Bacterial	Xanthan, Dextran, Gellan, Levan, polygalactosamina, celulosa (bacteriana)
	Fúngico	Pullulan, Elsinan, glucanos de levadura.
	Lipídico/surfactantes	Acetoglicéridos, ceras, surfactantes.
Proteínas		Seda, colágeno/gelatina, elastina, resilina, adhesivos, poliaminoácidos, soya, zeína, gluten de trigo, caseína, albúmina sérica.
Poliésteres		Polihidroxialcanoatos, ácido poliláctico
Polímeros especiales		Ácido poli-gamma-glutámico, caucho natural, polímeros sintéticos de grasas y aceites naturales, nylon de aceite de ricino.

1.4.1 Quitosano

Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como brindar estructura, almacenar energía y otras funciones mucho más especializadas, tales como reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras.



El quitosano es un polisacárido catiónico producido por la desacetilación de la quitina, se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos y se obtiene mediante un proceso de alcalinización a altas temperaturas (34).

Es el segundo polímero natural más abundante en el mundo después de la celulosa; se considera como un material altamente prometedor para aplicaciones futuras debido a su excelente biodegradabilidad, biocompatibilidad, actividad antimicrobiana, no toxicidad y sus ventajas económicas (5).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. A lo largo de la pasada década se ha dedicado un gran esfuerzo al estudio de las modificaciones químicas del quitosano para, de este modo, explorar su máximo potencial de aplicación (7).

Este biopolímero ha sido ampliamente utilizado en diferentes formas (geles, películas, partículas, membranas o andamios) (35). Debido a sus propiedades funcionales y fisicoquímicas, se ha podido identificar una enorme cantidad de aplicaciones que abarcan áreas tan variadas como: alimentación (36), medicina, agricultura, farmacia, entre otras (37-38).

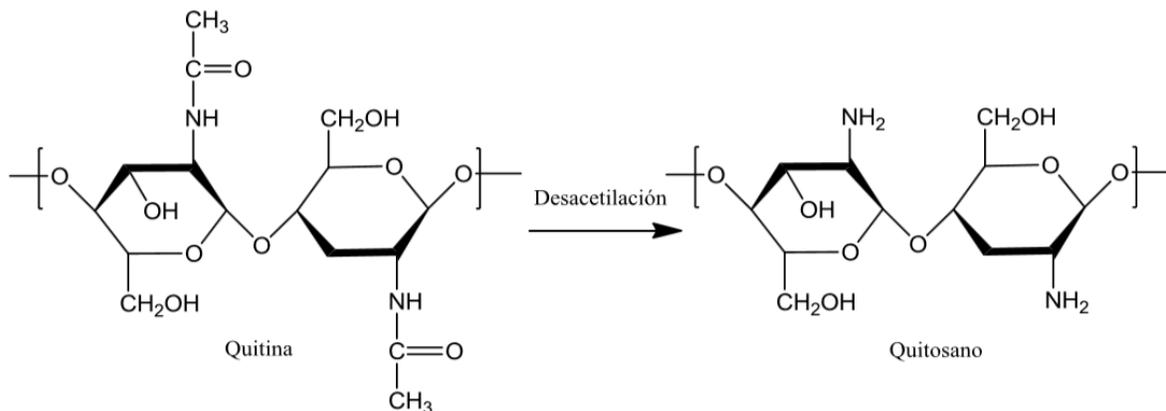


Figura 7. Desacetilación de quitina para la obtención de quitosano. Fuente: (6).



1.4.2 Mecanismo de acción del quitosano como agente antimicrobiano

El quitosano ha demostrado tener actividad contra un amplio espectro de patógenos, el cual puede ser manifestado de dos formas: por inhibición del crecimiento de patógenos y por la inducción de resistencia sistémica a infección de patógenos (39).

El quitosano muestra una actividad antimicrobiana más fuerte para bacterias Gram-positivas que Gram-negativas (40).

El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana de la quitina, el quitosano y sus derivados es aún desconocido, aunque diferentes mecanismos han sido propuestos, uno de ellos sugiere que la interacción entre la carga positiva de la molécula de quitosano y la carga negativa de las células de la membrana microbiana conduce a la salida de proteínas y otros constituyentes intracelulares (41).

La unión del quitosano con el ADN y la inhibición de la síntesis de ARNm ocurren a través de la penetración del quitosano hacia el núcleo de los microorganismos y la interferencia con la síntesis de ARNm y síntesis de proteínas, evitando de esta manera la replicación del microorganismo (39)(42).

Uno de los principales factores que influyen en el grado de inhibición del quitosano es el peso molecular, el cual está reportado que se requiere de un peso mayor al de 10,000 Da (43). Además, la actividad antimicrobiana está influenciada por el grado de desacetilación, su concentración en solución y el pH del medio (44).

El quitosano muestra su actividad antibacteriana solamente en medio ácido debido a su pobre solubilidad por encima de pH 6.5 (45). En general, el ácido acético, el ácido láctico y el ácido fórmico son más efectivos para inhibir el crecimiento bacteriano que los ácidos propiónico y ascórbico (44-46).

1.5 Caracterización

La caracterización de materiales permite estudiar, clasificar y analizar las propiedades físicas, mecánicas, ópticas, químicas, térmicas y magnéticas de algún material, es decir, sirve para la obtención de distintos parámetros que determinan las características específicas de un material (47).



Uno de los métodos utilizados para realizar caracterización es mediante la microscopía electrónica, en la cual se emplean electrones en lugar de fotones o luz visible para la formación de imágenes. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar ampliaciones mayores que los mejores microscopios ópticos, debido a que la longitud de onda de los electrones es bastante menor que la de los fotones "visibles" (48).

En muchos sentidos, el microscopio electrónico ofrece una solución ideal a los problemas que presentan los microscopios ópticos ($\lambda \sim 0.5 \mu\text{m}$) que no pueden obtener resolución atómica, ya que la longitud de onda de la radiación incidente es demasiado grande (49).

El microscopio electrónico se basa en la utilización de un haz de electrones con voltajes de aceleración que oscilan, por término medio, entre los 20 y 1000 kV; es un dispositivo que utiliza un haz de electrones dirigidos hacia una muestra a analizar, produciendo una imagen en una pantalla sensible a los electrones. Este tipo de microscopio permite realizar aumentos de hasta 2.000.000 X frente a los microscopios ópticos que producen aumentos de 2.000 X, gracias a que la longitud de onda de los electrones (0,5 Angstroms) es mucho menor que la de la luz visible (4000 Angstroms) (50).

1.5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM del inglés, *Scanning Electron Microscopy*) es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen (51).

Las imágenes en SEM poseen una gran profundidad de campo, que permiten enfocar a la vez gran parte de la muestra. También producen imágenes de alta resolución, de forma que las características más ínfimas de la muestra pueden ser examinadas con gran ampliación. La preparación de las muestras es relativamente fácil, la muestra generalmente se recubre con una capa de carbono o una capa delgada de un metal, como el oro, para darle carácter conductor (52). El haz de electrones se puede concentrar en una zona diminuta ($\sim 20 \text{ \AA}$) que puede barrer la superficie del espécimen al ser deflectado por bobinas adecuadas. Los electrones secundarios se detectan por encima del espécimen y la imagen muestra la intensidad de los electrones secundarios emitidos por las diferentes partes de la muestra (49).



1.5.2 Microscopía Bifocal

El microscopio bifocal es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste y/o reconstruir imágenes tridimensionales utilizando un "pinhole" espacial (colimador de orificio delimitante) para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en especímenes que son más gruesos que el plano focal. Esta técnica se aplica típicamente en las ciencias biológicas (53).

1.6 Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana

Son diversos los métodos para la evaluación de actividad antimicrobiana de diferentes agentes, sin embargo, dos de los más utilizados, son los siguientes dos métodos:

- *Difusión en agar.*

El método de difusión en agar o en placa, es un método que utiliza un medio de cultivo sólido en el cual un microorganismo es probado con una sustancia de la cual se desea conocer su actividad biológica.

- *Dilución en caldo.*

Este método puede ser probado en placas de 96 pozos o en tubos. El método de dilución en caldo considera la relación entre el crecimiento de un microorganismo en un medio líquido y la concentración de una sustancia control, midiendo la turbidez generada (54).

1.6.1 Ensayos de difusión en agar

La técnica o ensayo de difusión en agar, también conocido como ensayo de Kirby-Bauer o difusión en disco, se utiliza de manera rutinaria en los laboratorios clínicos para la determinación de la sensibilidad a agentes antimicrobianos de bacterias y hongos comunes (a través de sensidiscos o difusión en pozo) (55).

Dicha prueba es realizada con agar Mueller Hinton, el cual es un medio de cultivo diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad antimicrobiana y antifúngica, recomendado por el Comité de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre estandarización de pruebas de susceptibilidad. Este medio de cultivo fue propuesto en 1970 para determinar la susceptibilidad de los microorganismos frente a los agentes



antimicrobianos, por no tener incorporados inhibidores como, por ejemplo, el PABA (ácido p-amino benzoico) que anula la actividad de sulfamidas y antibióticos, así como su reproducibilidad y facilidad de realización (56-57). A pesar de su facilidad de uso, una de las desventajas de esta técnica es que brinda sólo información cualitativa (57).

1.6.2 Ensayo de microdilución

El método de macrodilución en caldo y su versión miniaturizada de microdilución, ambos aceptados por la organización internacional de estandarización “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-M27-A3-2008)”, son procedimientos habitualmente empleados para realizar pruebas antimicrobianas con agentes convencionales como los antibióticos. Estos métodos permiten obtener datos cuantitativos de susceptibilidad y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), que se define como la concentración mínima en la que el agente es capaz de inhibir el crecimiento del organismo problema (55).

1.6.3 Cuantificación de viabilidad bacteriana con ensayo de MTT

El ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT se realiza con Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, el cual es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo. El MTT se utiliza comúnmente para medir el número de células metabólicamente activas en ensayos *in vitro* y es muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

Originalmente es de color amarillo y al reducirse se convierte en un compuesto de la familia formazanos, de color violeta e insoluble en agua. La cantidad de formazan generado es proporcional al número de células metabólicamente activas y es medido a través de un espectrofotómetro UV-Vis (58).

1.6.4 Ensayo de viabilidad bacteriana en agar Mueller-Hinton

El ensayo de viabilidad bacteriana se realiza como un método de reforzamiento de los resultados obtenidos en un ensayo previo de MTT. Consiste en la colocación de gotas de los medios utilizados en el ensayo de MTT en placas de agar, con el fin de evaluar si existe crecimiento bacteriano o no posterior a su incubación. Es un método cualitativo en el que se puede apreciar si el efecto del agente antimicrobiano que está siendo probado tiene un efecto bactericida o bacteriostático.



Antecedentes

Los materiales de sutura datan del año 3000 a.C. aproximadamente, cuando se clasificaban según el origen de donde se obtenían: animales/insectos (pelo, tendones, intestinos, lana, seda), plantas o metales. El catgut era el material de sutura más parecido a los actuales y se obtenía de intestino bovino y ovino (11). La sutura de seda fue empleada formalmente por primera vez en Estados Unidos por el padre de la cirugía William Halsted.

Se han elaborado hilos de sutura con actividad antibacteriana mediante la modificación de la superficie con sustancias antimicrobianas, tales como; péptidos antimicrobianos, iones metálicos, polímeros, nanomateriales, antisépticos, fármacos, entre otros (59). Uno de los principales objetivos de estos estudios es que al modificar las suturas con agentes antibacterianos estas mantengan o maximicen sus características físicas (resistencia a la tracción, resistencia a la tensión del nudo, rigidez de flexión) y de manipulación (fricción superficial y arrastre del tejido) en comparación con aquellas que no fueron modificadas (60).

En un estudio realizado en el 2014 se realizó una síntesis general de compuestos híbridos de silica-quitosano a través del método sol-gel para recubrimientos de suturas quirúrgicas. El desarrollo del experimento consistió en impregnar dos tipos de suturas (seda y ácido poliglicólico PGA) con los compuestos de silica-quitosano y someter las suturas a pruebas de tensión para compararlas con aquellas suturas que no habían sido modificadas, obteniendo como resultado que hubo un aumento en los valores de elongación de las suturas de seda, por lo que se mostró que mejora la ductilidad de la sutura. Asimismo, se demostró que los recubrimientos de silica-quitosano en los dos tipos de suturas no alteran las propiedades mecánicas. Se concluyó que el híbrido silica-quitosano puede ser útil cuando se añade en la superficie de la sutura o como parte de ella para favorecer el proceso de cicatrización (21). En otro trabajo de continuación al antes mencionado, se evaluó el mismo híbrido de silica-quitosano en pruebas de citotoxicidad con células C6 de glioblastoma de rata, mostrando muerte celular en todas las pruebas realizadas. Seguidamente, se realizó la misma prueba con células expuestas únicamente al quitosano, donde se obtuvo proliferación celular, por lo que se determinó que el quitosano sí es biocompatible; sin embargo, el proceso de síntesis del silica-quitosano no lo es, por lo que se concluyó que se deben realizar modificaciones en el proceso de síntesis de sílica-quitosano (61).



Finalmente, en un estudio realizado en la Escuela Nacional de Estudios Superiores se analizaron las propiedades mecánicas y antimicrobianas de la sutura de seda funcionalizada con poli (cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC) y nanopartículas metálicas [Oro (Au), y dióxido de titanio (TiO_2)], obteniendo como resultado que el polímero catiónico ligante (PDADMAC) brinda una mejora en la morfología de la sutura de seda y un mejor recubrimiento con las nanopartículas TiO_2 [c]/PDADMAC con un porcentaje en peso de Ti de 88 % a diferencia de las otras nanopartículas, sin embargo, el recubrimiento de las suturas con estas nanopartículas no generó inhibición bacteriana, ya que al ser evaluadas en método de difusión de agar, las suturas fueron recubiertas por las cepas *E. coli* y *S. aureus* (62).



CAPÍTULO

2

- Planteamiento del problema
- Justificación
- Objetivos
- Pregunta de investigación
- Hipótesis



2.1 Planteamiento de problema

En la cavidad oral existen más de 500 especies de bacterias, de las cuales aproximadamente 109 pueden sembrarse en el torrente sanguíneo aumentando el riesgo de una bacteremia (63). Las bacteremias son causadas en un 90 % de los casos por *estafilococos*, *estreptococos* y *enterococos*. Los *streptococcus* orales pertenecen al grupo viridans (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*), al ser parte de la placa dental, pueden ingresar al torrente sanguíneo y causar bacteriemia a través de hábitos diarios como masticar o cepillarse los dientes (64).

En procedimientos quirúrgicos orales como la extracción de piezas dentales o colocación de implantes es común el uso de suturas. Estos materiales de sutura representan un potencial factor de riesgo para generar una infección, ya que las bacterias presentes en boca poseen la habilidad de adherirse al material de sutura. Tales infecciones son causadas por bacterias anaerobias en su mayoría (71 %), seguido de las microaerófilas (27 %), y en una cantidad menor aerobias verdaderas (2 %)(65). Entre las aerobias y microaerófilas presentes, se encuentran especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, mientras que de la familia de las anaerobias se encuentran especies de *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* y *Propionibacterium* (66).

Un estudio realizado en España, se reveló que la colocación de suturas genera en un 10 % ($\pm 5-16$ %) la posibilidad de infección por bacteremia después de una manipulación quirúrgica (64), y otros estudios revelan que las suturas que más promueven a la inflamación gingival y acumulación de placa dentobacteriana, son aquellas con estructura multifilamentosa y trenzada (10), ya que al producir una mayor reacción inflamatoria en los tejidos provoca una cicatrización retrasada o más lenta en comparación con las otras suturas (incluyendo el nylon, polyglactin 910, ácido poliglicólico, etc.)(67). Por lo anterior, se consideran factores de riesgo intrínseco para infecciones postoperatorias y complicaciones asociadas, como la infección del hueso, bacteriemia, formación de abscesos, endocarditis o incluso sepsis (15).

El mecanismo por el cual el material de sutura puede comprometer el sitio quirúrgico empieza con la respuesta inflamatoria, que se desencadena al estar en contacto un cuerpo extraño con los tejidos, lo que genera disminución en la resistencia contra los



microorganismos patógenos. También puede servir la sutura como una vía de acumulación de bacterias, siendo que éstas tienen la capacidad de adherirse incluso en sitios de menor accesibilidad, como en los túbulos dentinarios, por ejemplo (23).

El nudo que se realice también es determinante para la acumulación de bacterias, ya que es más fácil para los microorganismos adherirse a esta superficie. Estudios han demostrado que entre más voluminoso sea el nudo que se realiza, una mayor cantidad de bacterias se adherirán a esta y por ende se presentará una reacción inflamatoria más exacerbada en los tejidos concomitantes (18).

A su vez, el tiempo de retiro de suturas juega un papel importante, ya que se tiene reportado que entre mayor sea el tiempo que se tarde en retirar la sutura, mayor será la probabilidad de generar una infección.

Estas infecciones postoperatorias son complicaciones relativamente frecuentes en cirugías orales, ocurren en aproximadamente el 2-12 % de los casos. Estas representan una condición seria, ya que no sólo retarda la cicatrización del sitio afectado, también puede llegar a poner en riesgo la vida del paciente (10), presentando mayor riesgo de complicaciones graves en aquellos que padezcan enfermedades crónicas, como la diabetes y enfermedades cardíacas (66), y si no son tratadas adecuadamente o en un estadio temprano, vienen acompañadas de altos costos para su tratamiento y de inconvenientes para los pacientes, ya que a menudo requieren alguna cirugía adicional, hospitalización prolongada y uso de altas dosis de antibióticos (59).



2.2 Justificación

Es necesaria la elaboración de nuevos agentes antibióticos, ya que la resistencia bacteriana a estos va en aumento, lo cual provoca una reducción en la gama de selección de fármacos que sean eficaces combatiendo diferentes enfermedades, dificultando o imposibilitando el tratamiento. La resistencia a los antibióticos además de prolongar la duración de las enfermedades y aumentar el riesgo de muerte (en ocasiones se duplica), aumenta el costo de atención sanitaria, pues alarga las estancias en el hospital y requiere cuidados intensivos (1).

Por lo anterior, se ha desarrollado un interés en generar agentes antimicrobianos y en el desarrollo de nuevos enfoques para la prevención de infecciones.

En los últimos años la modificación de las fibras de seda con agentes antimicrobianos se ha realizado, sin embargo, la experimentación con quitosano es un campo que no ha sido explorado a profundidad y que presenta una alternativa que pudiera ser evaluada para determinar sus características antimicrobianas.

La realización de este proyecto de investigación permitirá mediante la creación de una sutura de seda que inhiba el crecimiento bacteriano, que disminuya la terapéutica antibiótica.

La creación de una sutura de seda que inhiba el crecimiento bacteriano, permitirá, por ende, disminuir la terapéutica antibiótica que se receta comúnmente después de un procedimiento quirúrgico, ya que disminuye el riesgo de que se genere una infección tras la colonización bacteriana en la misma.

Al disminuir la cantidad de antibiótico recetado tras una intervención quirúrgica, disminuye el riesgo de generar una resistencia al fármaco, evitando que un futuro el paciente se quede sin alternativas de tratamiento para alguna infección.

El fin último de realizar experimentación con quitosano es su posterior aplicación en situaciones de la vida cotidiana, como en el caso de las suturas, por eso es de vital importancia realizar estudios previos a la experimentación humana para verificar que el elemento funcionalizado con quitosano no tenga repercusiones en el estado de salud del paciente y que, por lo tanto, es seguro utilizar este tipo de materiales en humanos (tejidos bucales, en el caso de este trabajo).



2.3 Objetivo general

- Analizar las propiedades morfológicas (color, uniformidad de la sutura) y antimicrobianas de fibras de sutura de seda recubiertas con quitosano para su posible aplicación en cirugía oral.

2.3.1 Objetivos específicos

- Determinar la morfología de las suturas recubiertas con quitosano por SEM (Microscopía Electrónica de Barrido) y estereoscopía.
- Determinar la actividad antimicrobiana de las suturas funcionalizadas con quitosano ante las cepas, *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans* mediante ensayos *in vitro* de difusión en agar, microdilución, cuantificación de viabilidad bacteriana mediante reducción metabólica del MTT y de viabilidad bacteriana en Agar Mueller-Hinton.

2.4 Pregunta de investigación

- ¿Las suturas de seda recubiertas con quitosano presentan inhibición contra las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans* en ensayos *in vitro*?

2.5 Hipótesis

- El recubrimiento de suturas de seda disuelto a una temperatura de 60 °C presentan mayor inhibición en la colonización bacteriana de *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans* en ensayos *in vitro*, que aquellas disueltas a temperatura ambiente.



CAPÍTULO

3

- Metodología
- Implicaciones éticas



Metodología

3.1 Diseño del estudio

Estudio experimental puro, prospectivo y comparativo con un universo de 279 muestras de 1 cm de suturas de seda de 4-0, (Ethicon) y quitosano (Sigma Aldrich).

3.2 Operacionalización de variables

Tabla 3. Variables dependientes

<i>Variables dependientes</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Naturaleza</i>	<i>Unidad de medida</i>	<i>Escala</i>
Actividad antimicrobiana	Valor en el que un antimicrobiano inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación (68).	Ensayo de difusión en agar: Medición de la zona de inhibición generada en una caja de Petri inoculada con bacteria en contacto con un agente antimicrobiano. Se toman imágenes y se analizan con software "ImageJ"	Cuantitativa Continua	mm (Milímetro)	Razón
		Ensayo de microdilución y MTT: Valores obtenidos mediante la espectrofotometría UV-Vis y analizados posteriormente con programa SPSS	Cuantitativa Continua	% (Porcentaje)	Razón
		Viabilidad bacteriana: Cuantificación de colonias generadas en cajas de Petri posterior al procedimiento de MTT	Cuantitativa Continua	-	Razón



Tabla 4. Variables independientes

<i>Variables independientes</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Naturaleza</i>	<i>Unidad de medida</i>	<i>Escala</i>
Temperatura de la disolución	Temperatura a la que se encuentra una disolución	Temperatura de la disolución al dejar en agitación magnética por 24 h	Cuantitativa Continua	25 - 60 °C	Razón

3.3 Universo del trabajo

Suturas de seda marca Ethicon 4-0

3.4 Tamaño de muestra

- 81 muestras de sutura de 1 cm de largo para método de difusión de agar
- 198 muestras de sutura de 1 cm de largo para método de microdilución y MTT

3.5 Criterios de selección

3.5.1 Criterios de inclusión

- Suturas desgomadas.
- Suturas de seda 4-0 recubiertas con quitosano que conserven la integridad del trenzado que las conforma.
- Quitosano de bajo peso molecular (50,000-190,000 Da).

3.5.2 Criterios de exclusión

- Suturas reabsorbibles o de seda de otro calibre diferente a 4-0.
- Suturas de seda que no sean de la marca comercial Ethicon.
- Quitosano de medio y alto peso molecular.

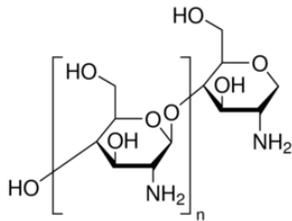
3.5.3 Criterios de eliminación

- Suturas recubiertas con quitosano que presenten una morfología irregular y daño en su estructura trenzada.
- Pruebas de actividad antimicrobianas que presenten contaminación en sus cepas.



3.6 Materiales y reactivos

Tabla 5. Material, reactivos.

Reactivo	Marca	Características
Seda	Ethicon®	No absorbible Color: Negro Calibre: 4-0 Multifilamento (trenzada)
Hidróxido de sodio (NaOH)	JT. Baker®	Pureza: 97 % PM: 40 g/mol Forma: Escamas Color: Blanco
Ácido acético glacial	-	Pureza: 99.9 % Forma: Líquido Color: Transparente Fórmula: CH ₃ COOH
<p>Quitosano</p> 	Sigma-Aldrich®	No. de producto: 448869 Forma: Polvo Viscosidad: 20-300 cP, 1 wt. % in 1 % a. a. Fórmula: Mw promedio: 50,000-190,000 Da
Microorganismo		
<i>E. coli</i>	-	Aislado de paciente
<i>S. aureus</i>	-	Aislado de paciente
<i>S. mutans</i>	American Type Culture Collection®	ATCC 35668

3.7 Desarrollo del proyecto

Previo a la realización del proyecto se llevó a cabo una prueba piloto con el fin de determinar las condiciones óptimas para la realización de las pruebas antimicrobianas. En dicha prueba piloto se estableció a que concentración y bajo qué condiciones el quitosano resultó tener mejor resultado inhibiendo las bacterias. Dicha prueba se encuentra en el anexo 1 junto con las especificaciones y resultados que fueron obtenidos en ella.

Los pasos del proceso de preparación de las suturas, recubrimiento, caracterización y evaluación antimicrobiana, se encuentran expuestos de manera resumida en la figura 8.

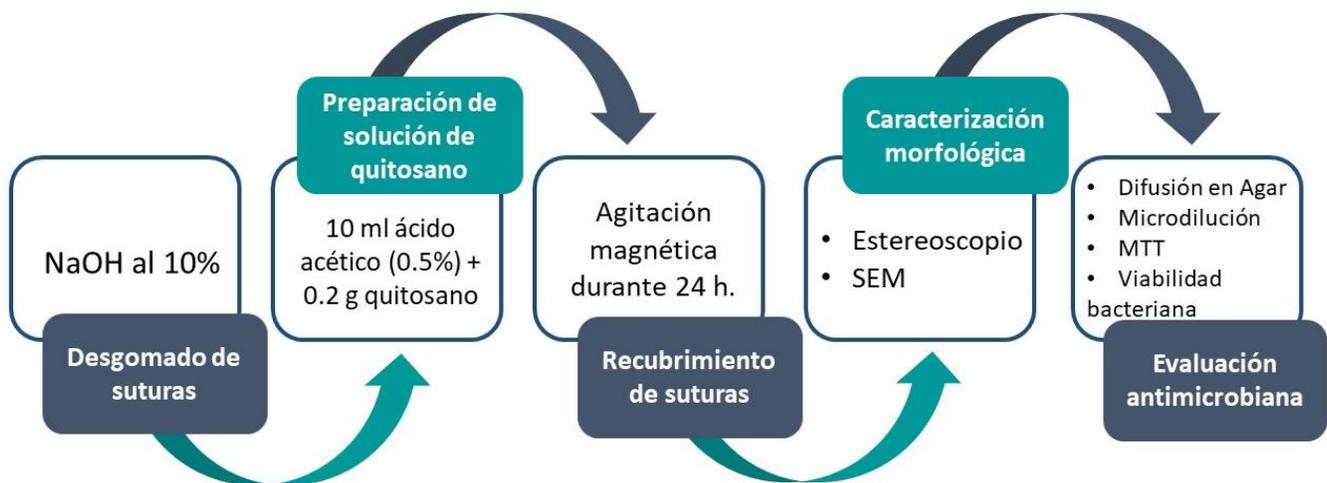


Figura 8. Resumen de metodología. Fuente: directa.

3.7.1 Desgomado de suturas

Para iniciar el proceso reproducido en todas las fibras, se preparó la eliminación de la sericina de la sutura de seda (4-0) marca Ethicon con el propósito de acrecentar la adhesión de los materiales antimicrobianos, fue desgomada en una solución de NaOH al 10 % (10 g de NaOH, 90 ml de H₂O) a temperatura ambiente con ayuda de un agitador magnético por un periodo de 10 minutos, posteriormente se lavaron las suturas con H₂O destilada dentro de una tina ultrasónica (Branson 2510) durante 5 min.

3.7.2 Preparación de quitosano

Para la preparación de la solución de quitosano se empleó 0.2 g de quitosano de bajo peso molecular (Sigma Aldrich), el cual fue pesado en una balanza analítica. Al ser un material solvente en ácidos se procedió a disolver en 10 ml de agua bidestilada con ácido



acético a una concentración de 0.5 %. Dicha concentración de ácido acético fue elaborada en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES. Dicha concentración de ácido acético fue elaborada en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES. Se eligió esa concentración de ácido acético ya que se quería tener la certeza de que los resultados en la evaluación antimicrobiana se pudieran atribuir al efecto de quitosano y no a la concentración de ácido acético, el cual es conocido también por su efecto antimicrobiano (69).

3.7.3 Recubrimiento de suturas con quitosano

Una vez realizada la solución de la forma antes mencionada se realizaron dos grupos de quitosano, los cuales fueron colocados en dos vasos de precipitados con capacidad para 50 ml cada uno. A ambos se le colocaron con pinzas de curación la sutura de seda previamente desgomada y se dejaron selladas con parafilm en agitación magnética con una velocidad constante durante 24 horas. Al segundo grupo de quitosano se le agregó con ayuda de la parrilla una temperatura de 60°C con la finalidad de observar mejoras en los resultados de la evaluación antimicrobiana.

3.7.4 Caracterización morfológica

Ambos grupos de quitosano fueron evaluados en un estereoscopio marca Leica MC 170 HD del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES Unidad León de la UNAM con diferentes ampliaciones, para valorar el cambio en su morfología, recaudando información visual tridimensional de cada una de las superficies de las suturas. Del total de fibras observadas se eliminaron del proyecto aquellas que presentaron daño de la estructura trenzada en los hilos.

Asimismo, con el fin de conocer los cambios en la morfología de las suturas se realizó la toma de micrografías con microscopio electrónico de barrido (SEM) marca Hitachi TM 1000, utilizando un voltaje de aceleración de 15 kV en el Centro de Geociencias de la UNAM. Dichas micrografías fueron tomadas a diversas escalas de aquellas suturas que mejor morfología presentaron en las imágenes observadas en el estereoscopio.

3.7.5 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana fue evaluada por los siguientes ensayos *in vitro*; método de difusión en agar, ensayo de microdilución, microscopía confocal complementaria al



ensayo de microdilución, cuantificación de viabilidad bacteriana mediante reducción metabólica del MTT y ensayo de viabilidad bacteriana en agar Mueller-Hinton.

3.7.5.1 Ensayo de difusión en agar

Se analizó la actividad antimicrobiana de las suturas de seda funcionalizadas con quitosano contra las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* como bacterias modelo de Gram-positivas, Gram-negativas y característica de la placa dentobacteriana, respectivamente. El procedimiento fue hecho con base en lo descrito en el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés).(56) La prueba se realizó determinando la zona de inhibición producida por el quitosano mediante prueba de difusión de agar.

A partir de un cultivo fresco de máximo 24 h de crecimiento a 37 °C en medio sólido, agar Mueller-Hinton; con ayuda de un asa estéril, se tomaron aproximadamente 5 colonias de la bacteria de 1 mm de diámetro, y fueron suspendidas en 10 ml de solución salina isotónica (0.85 % de NaCl) estéril (SSI) depositada dentro de un tubo de ensayo, los cuales fueron agitados en vórtex por 15 segundos. Con ayuda de un densímetro (Grant Bio), se ajustó la disolución a una densidad celular de 0.5 en la escala estándar de McFarland, la cual contenía una cantidad aproximada de 1 a 5×10^6 UFC/ml. Una vez preparada la suspensión microbiana de trabajo, se procedió a preparar el inóculo que sería agregado a las placas, colocando 1 ml de la disolución en 20 ml de solución salina.

Dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación del inóculo, se colocaron 200 μ l en cada caja de Petri con el agar preparado previamente y con un hisopo estéril fue distribuido de manera uniforme en toda la caja. El hisopo se rotó 4 veces para distribuir el inóculo uniformemente en cuatro direcciones, esto se logra rotando la placa de agar 90° para homogeneizar el sembrado, y obtener de esta manera un patrón como el que aparece en la figura 9.



Tabla 6. Grupos y control positivo para ensayo de difusión en agar.

Numeración en caja	Grupos	Descripción
1	Control +	Sutura sin modificación
2	Grupo 1	Sutura desgomada con 0.2 g Ch +10 ml ácido acético al 0.5 %+ 25 °C
3	Grupo 2	Sutura desgomada con 0.2 g Ch +10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C
4	DP1	Disco de papel con Ch utilizado en el Grupo 1
5	DP2	Disco de papel con Ch utilizado en el Grupo 2

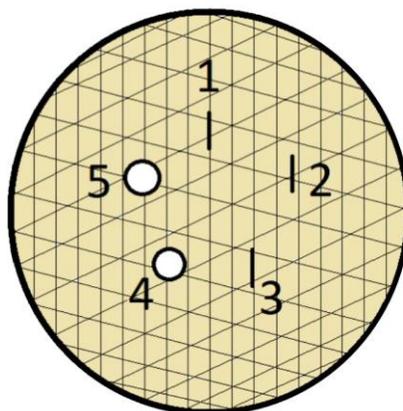


Figura 9. Representación de caja de Petri con estría masiva y colocación de suturas y discos.

Fuente: directa

Adicional a esta prueba, se realizó por separado pruebas de control positivo y negativo de referencia de la siguiente manera:

Tabla 7. Grupos de control positivo y negativo a realizar en ensayos aislados de método de difusión de agar.

Grupos	Descripción
A)Control +	Sensidiscos antibióticos
B) Control -	Discos de papel con ácido acético

Los platos o cajas de Petri inoculados sellados con parafilm en una incubadora a 37 °C durante 24 horas. La prueba se realizó tres veces por cada cepa, para mayor fiabilidad de resultados.



A) Sensidiscos antibióticos como control positivo

Para referir la actividad antimicrobiana de algún agente, se requiere de controles de calidad. Uno de ellos es el uso de sensidiscos, los cuales contienen un antibiótico conocido en combinación con las respectivas cepas microbianas; a fin de establecer puntos de referencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana.

Los sensidiscos miden 6 mm y se preparan impregnando papel absorbente de alta calidad con cantidades exactas de antibióticos o de otros agentes quimioterapéuticos. Los discos están marcados claramente en ambos lados con letras y números que indican el agente y el contenido del fármaco. Los cartuchos que contienen discos de antibióticos manufacturados comercialmente vienen empacados para asegurar condiciones anhidridas, esto es, para que los discos no absorban humedad. En estas pruebas, se seleccionó el antibiótico para cada microorganismo con base a lo descrito en el CLSI, quedando los grupos como se muestra en la figura 10.

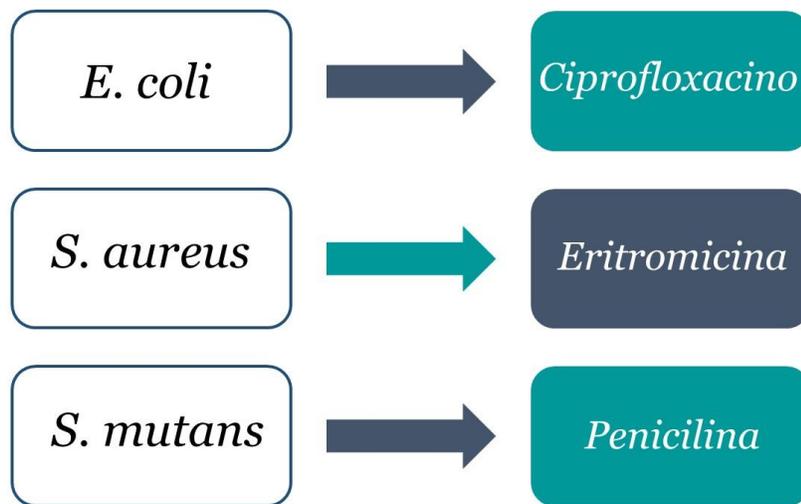


Figura 10. Cepas y sus antibióticos correspondientes para prueba con sensidiscos.

Fuente: directa.

B) Discos de papel como control negativo

Además de los discos de antibiótico, se pueden colocar otros discos control, esto con el propósito de comprobar si las zonas de inhibición formadas por dicho agente se deben a su acción antibacteriana *per se*, y no debido al medio en el que están dispersas o bien a algún otro componente del ensayo antimicrobiano.



En este caso, se utilizó ácido acético al 0.5 %, y ya es bien conocido que el ácido acético en ciertas concentraciones tiene un efecto bactericida. Los discos control son importantes porque representan una referencia y una base para reportar adecuadamente los resultados obtenidos.

3.7.5.2 Ensayo de microdilución

Para obtener datos cuantitativos de susceptibilidad y determinación de la concentración mínima inhibitoria de los diferentes grupos de quitosano, se realizó la prueba de microdilución en una placa de 96 pocillos (figura 11), por triplicado en cada una de las tres cepas a evaluar.

Se colocó una muestra de sutura de seda recubierta con quitosano de 0.5 cm de largo en los pocillos AF1-AF3 y AC7-AC9 para el grupo 1 y AF4-AF6 y AC10-AC12 para el grupo 2, seguido de 100 µl de medio de cultivo agar Mueller-Hinton Broth (Sigma Aldrich), y 100 µl de medio con bacteria ajustada a 0.5 en la escala McFarland. La bacteria fue preparada de un cultivo joven, dejándose en agitación e incubación por una noche. Los pocillos G y H fueron reservados para el control positivo y negativo; al control positivo se le colocó únicamente 100 µl de medio de cultivo y 100 µl de medio con bacteria, mientras que al control negativo se le colocaron 100 µl de medio con bacteria y 100 µl de bacteria con antibiótico. Para las cepas *E. coli* se utilizó ciprofloxacino, mientras que para la cepa para *S. aureus* se empleó eritromicina y para *S. mutans* se utilizó penicilina G. La placa fue dividida de la siguiente manera:

	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 1			Grupo 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CONTROL POSITIVO	G	C+	C+	C+	C+	C+	C+	○	○	○	○	○
CONTROL NEGATIVO	H	C-	C-	C-	C-	C-	C-	○	○	○	○	○

Figura 11. División de placa de 96 para prueba de microdilución por triplicado. Fuente: directa



Una vez colocadas las suturas, el medio, las bacterias y los controles positivos y negativos, se dejaron en incubación a una temperatura constante de 37 °C durante 24 horas para su posterior evaluación de turbidez con ayuda de un espectrofotómetro (Thermo Scientific). Según lo establecido en el CLSI, se determinó la densidad óptica en *E. coli* a 625 nm, en *S. aureus* a 570 nm y en *S. mutans* a 600 nm y posteriormente, con los valores obtenidos, se analizaron y acomodaron en el programa Excel, para poder obtener porcentajes de inhibición y también para ser evaluados con el programa SPSS para el análisis estadístico.

3.7.5.3 Microscopía Confocal complementaria al ensayo de microdilución

Antes de realizar la prueba de MTT y de viabilidad bacteriana, se observó en un microscopio bifocal Leica DM500 del laboratorio de investigación interdisciplinaria de la ENES León, con el objetivo 40x0.50 para poder observar la sutura al estar en contacto con el medio, así como para distinguir la viabilidad bacteriana al detectar movimiento en los pocillos.

3.7.5.4 Cuantificación de viabilidad bacteriana con ensayo de MTT

Previo a la realización del ensayo, se aspiró el contenido de los pocillos, dejando únicamente el sedimento para posteriormente colocar 100 µl de MTT (0.0002 g/ml) en cada pocillo y dejar en incubación durante 72 horas. Después de pasar por el periodo de incubación, se aspiró nuevamente el MTT y se agregó 100 µl de Dimetilsulfoxido a cada pocillo para después proceder a tomar las lecturas de densidad óptica con los mismos valores de longitud de onda que fueron usadas en el ensayo de microdilución para cada cepa. Se llevó a cabo con los datos obtenidos, análisis estadístico. Para analizar los resultados se aplicó ANOVA de una vía, ($P < 0.05$) y posteriormente, como evaluación Post Hoc, se realizó la prueba Tukey con el mismo valor de significancia.

3.7.5.5 Ensayo de viabilidad bacteriana en agar Mueller Hinton

Como prueba adicional a la de MTT y microdilución se realizó una prueba para corroborar los datos obtenidos en las lecturas del espectrofotómetro. Se tomaron 6 µl de los pocillos del ensayo de MTT, seleccionados aleatoriamente tanto del grupo 1 y 2, así como del control positivo y negativo. De los 6 µl se colocaron tres gotas de cada uno de los grupos



antes mencionados, en una caja de Petri con agar Mueller-Hinton, quedando la caja de la siguiente manera:

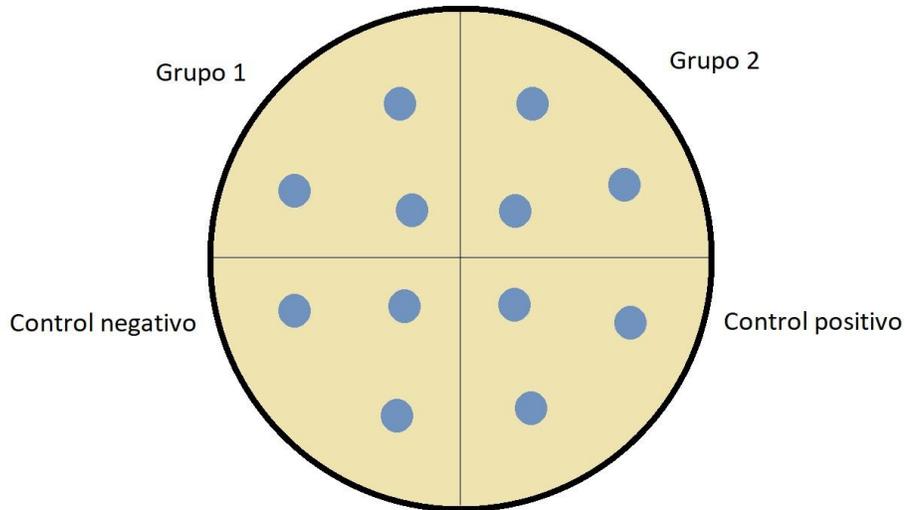


Figura 12. Ensayo de viabilidad bacteriana a partir de la solución de la placa de 96 del ensayo de MTT. Fuente: Directa

Posterior a la realización del experimento, se dejó en incubación durante 72 h en incubadora de bacterias a una temperatura constante de 37 °C.

Implicaciones éticas.

En el presente trabajo no se realizó evaluación ante el comité de bioética, ya que no se realizó ningún experimento en pacientes y todo el trabajo fue un estudio experimental *in vitro* desarrollado dentro de las instalaciones del laboratorio de investigación multidisciplinaria de la ENES Unidad León.



CAPÍTULO

4

- Resultados

4. Resultados

4.1 Descripción morfológica de suturas por estereoscopia

Para analizar cambios de color, morfológicos y evaluar si hubo adhesión de quitosano a la superficie de las suturas de seda, se observó un grupo de 5 muestras de sutura recubiertas con quitosano y secadas a temperatura ambiente durante 24 horas. La caracterización fue realizada con estereoscopio marca Leica MC 170 HD del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES Unidad León. Las suturas fueron analizadas a diferentes ampliaciones (2.0, 2.5, 4.0, 6.3 y 8 X) siendo la ampliación 6.3X la que dio mejores resultados para su evaluación, ya que se podía observar de manera más cercana la estructura la sutura.



Figura 13. Suturas de seda vista con estereoscopio a diferentes ampliaciones. Fuente: directa

Se realizó una toma de imagen de cada hilo de sutura con el fin de verificar si se encontró diferencia en la adhesión del quitosano entre los diferentes grupos. Para hacer la comparación entre los grupos muestras y la sutura sin modificar, se tomó un blanco para usarlo como guía de color y estructura del trenzado. Las fibras que presentaron daño en los hilos fueron descartadas del grupo de muestras y se tomó imagen de la parte de la sutura de seda más representativa.



El color de la sutura es uno de los indicativos de que se encuentra en buen estado, este debe presentar un color negro uniforme y homogéneo en toda su extensión. Según lo que dicta la NOM-067-SSA1-1993, las suturas de seda natural trenzada, debe estar pigmentada con colorante negro de acuerdo al fabricante. Se puede apreciar en algunas imágenes que hay en el trenzado un cambio de color a dorado, sin embargo, se le atribuye al tipo de iluminación y contraste que fueron utilizados y a que la sutura tienda a desteñirse al momento de realizar el lavado.

No se notó una diferencia en la estructura de las suturas pertenecientes al grupo 1 (figura 14) en comparación con las del grupo 2 (figura 15), lo cual nos indica que ambos grupos lograron recubrir en su totalidad y de igual manera a las suturas.

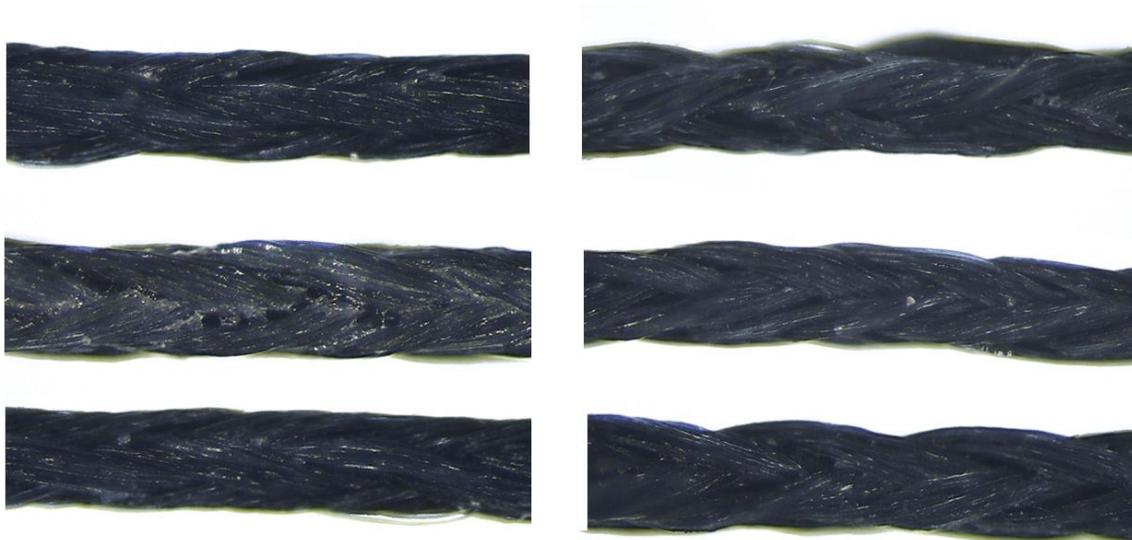


Figura 14. Suturas de seda recubiertas con el grupo 1, vistas en estereoscopio con ampliación 6.3x. Fuente: directa

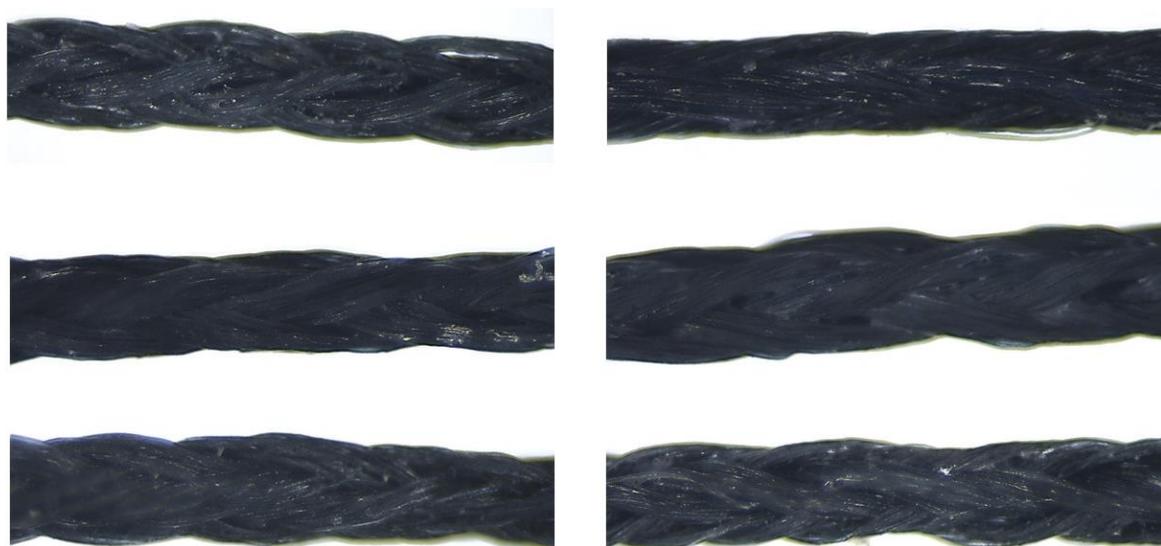


Figura 15. Suturas de seda recubiertas con el grupo 2, vistas en estereoscopio con amplificación 6.3x. Fuente: directa

4.2 Morfología de suturas por SEM

Para la caracterización morfológica de las suturas recubiertas con quitosano, se seleccionaron 3 muestras del grupo 1 y 2 como se muestra en la tabla 8. Dichas muestras fueron analizadas en el Microscopio de Barrido Electrónico (SEM) de marca Hitachi TM 1000, en el Centro de Geociencias de la UNAM, utilizando un voltaje de 15 kV de aceleración a diversas magnificaciones.

Tabla 8. Grupos de sutura recubiertos de quitosano para el análisis en SEM/EDS.

<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>
0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 25 °C	0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C
1 A	2 A
1 B	2 B
1 C	2 C

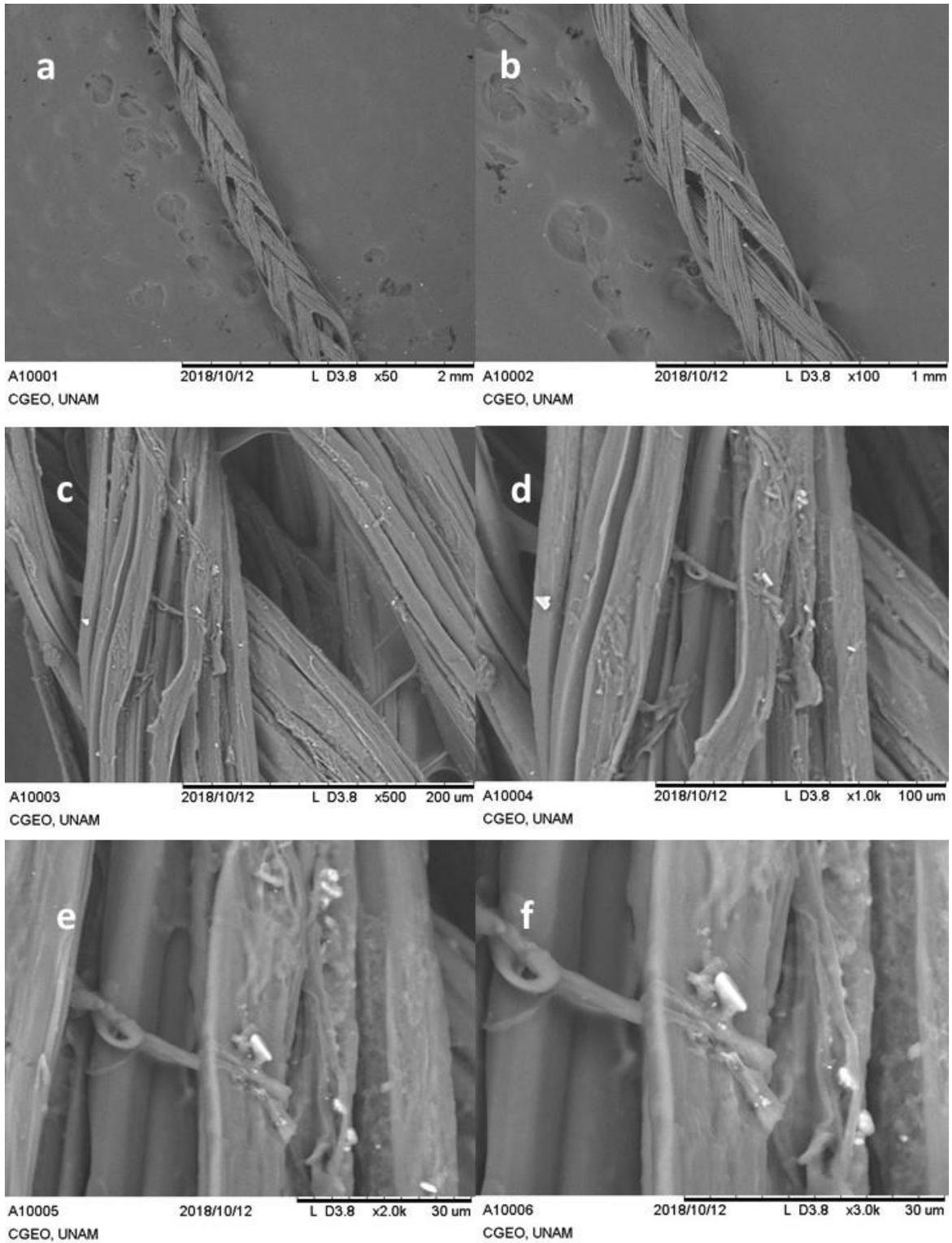


Figura 16. Micrografías SEM de suturas de seda con quitosano (Grupo 1A) a diferentes ampliaciones: a (2 mm), b (1 mm), c (200 μm), d (100 μm), e (30 μm), f (30 μm). Fuente: Directa.

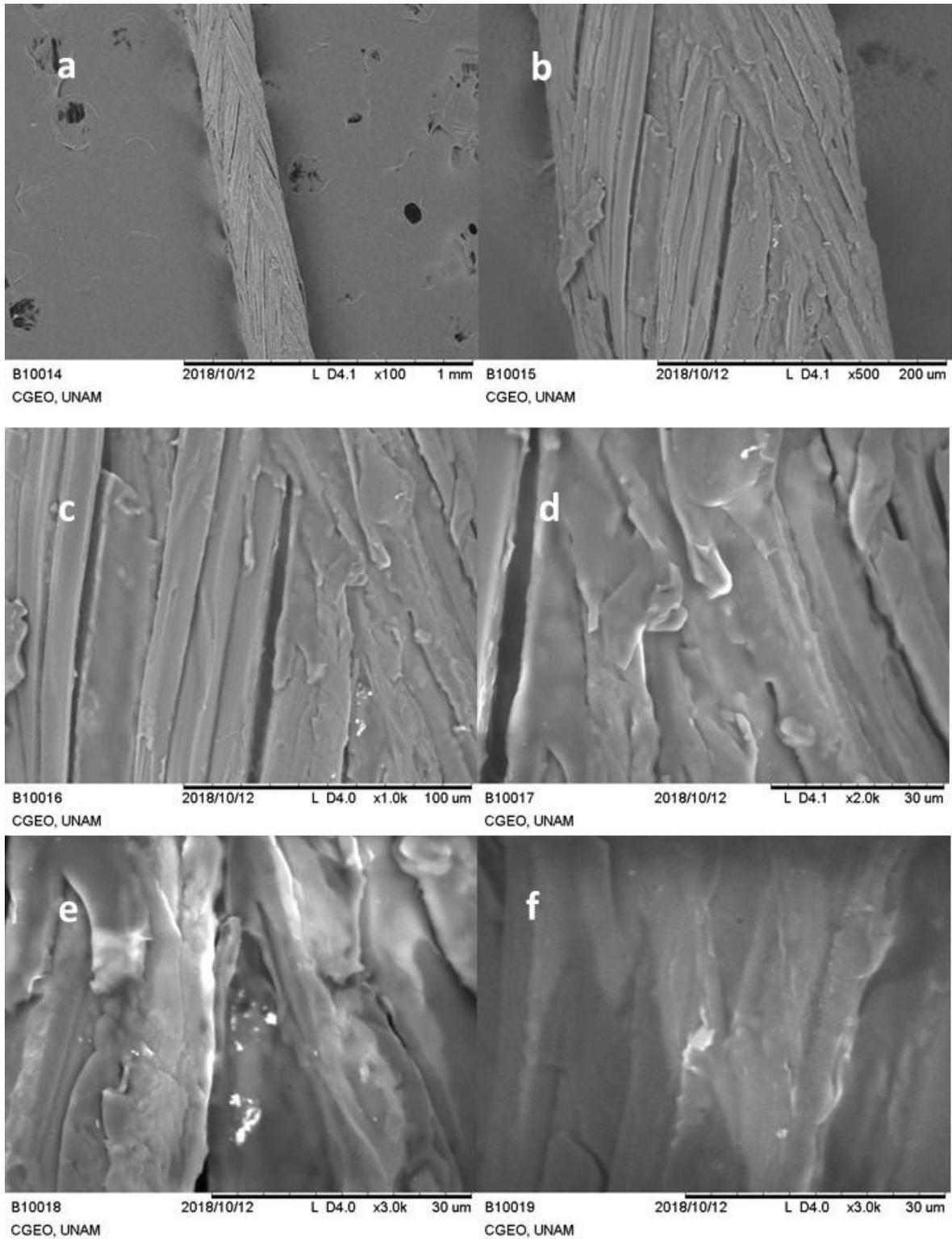


Figura 17. Micrografías SEM de suturas de seda con quitosano (Grupo 1B) a diferentes ampliificaciones: a (1 mm), b (200 μm), c (100 μm), d (30 μm), e (30 μm), f (30 μm). Fuente: Directa.

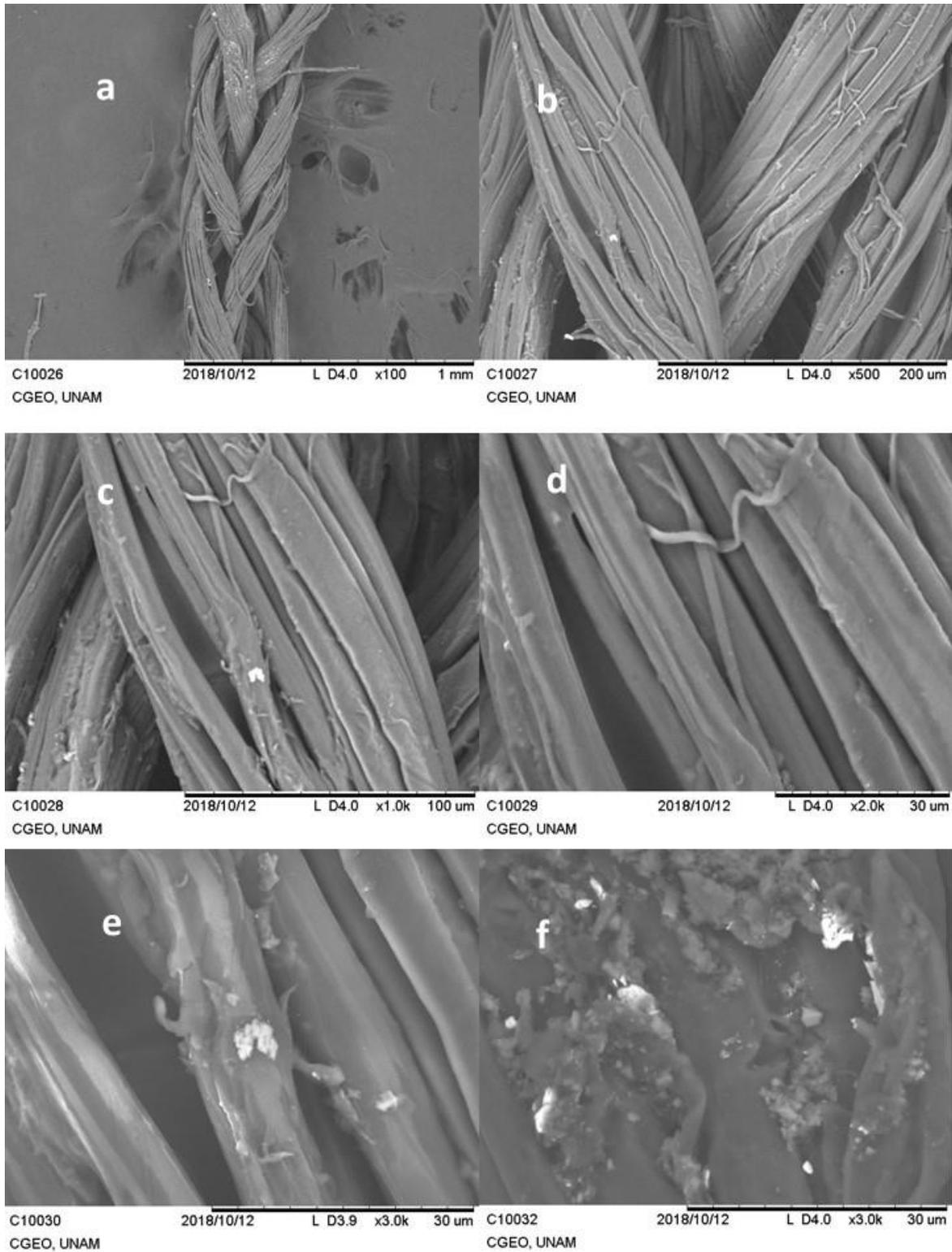


Figura 18. Micrografías SEM de suturas de seda con quitosano (Grupo 1C) a diferentes ampliaciones: a (1 mm), b (200 μm), c (100 μm), d (30 μm), e (30 μm), f (30 μm). Fuente: Directa.

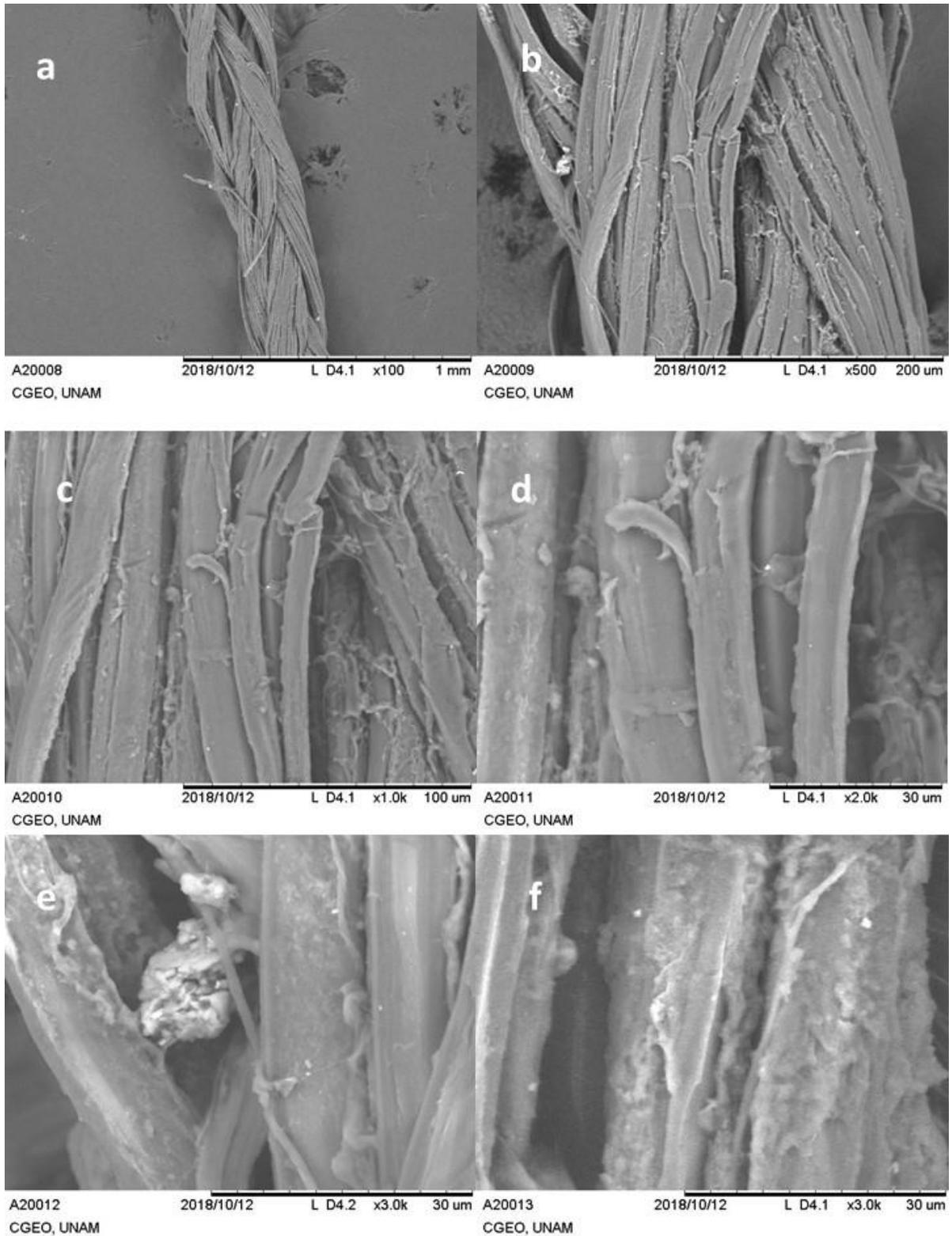


Figura 19. Micrografías SEM de suturas de seda con quitosano (Grupo 2A) a diferentes ampliaciones: a (1 mm), b (200 μ m), c (100 μ m), d (30 μ m), e (30 μ m), f (30 μ m). Fuente: Directa.

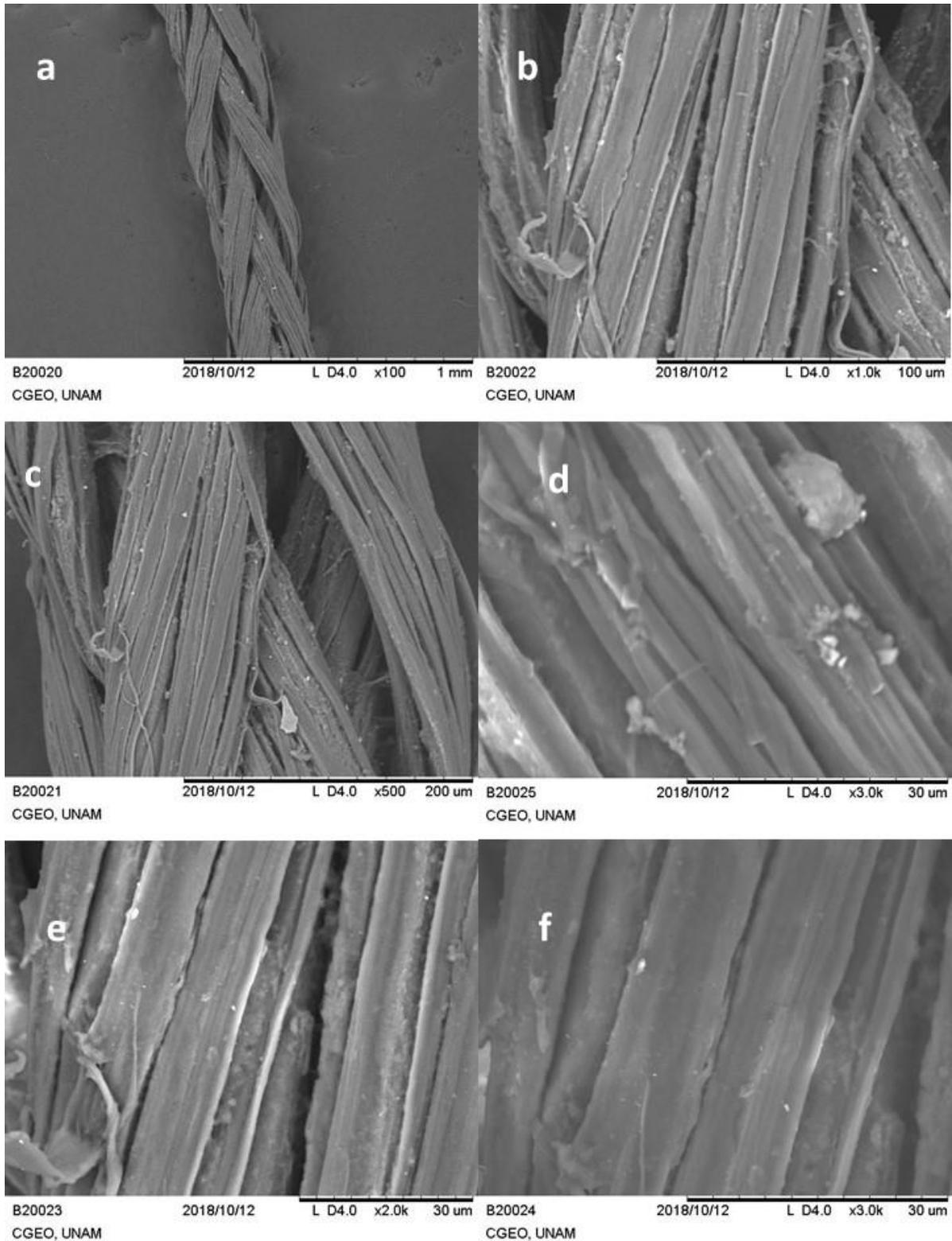


Figura 20. Micrografías SEM de suturas de seda con quitosano (Grupo 2B) a diferentes ampliaciones: a (1 mm), b (100 μm), c (200 μm), d (30 μm), e (30 μm), f (30 μm). Fuente: Directa

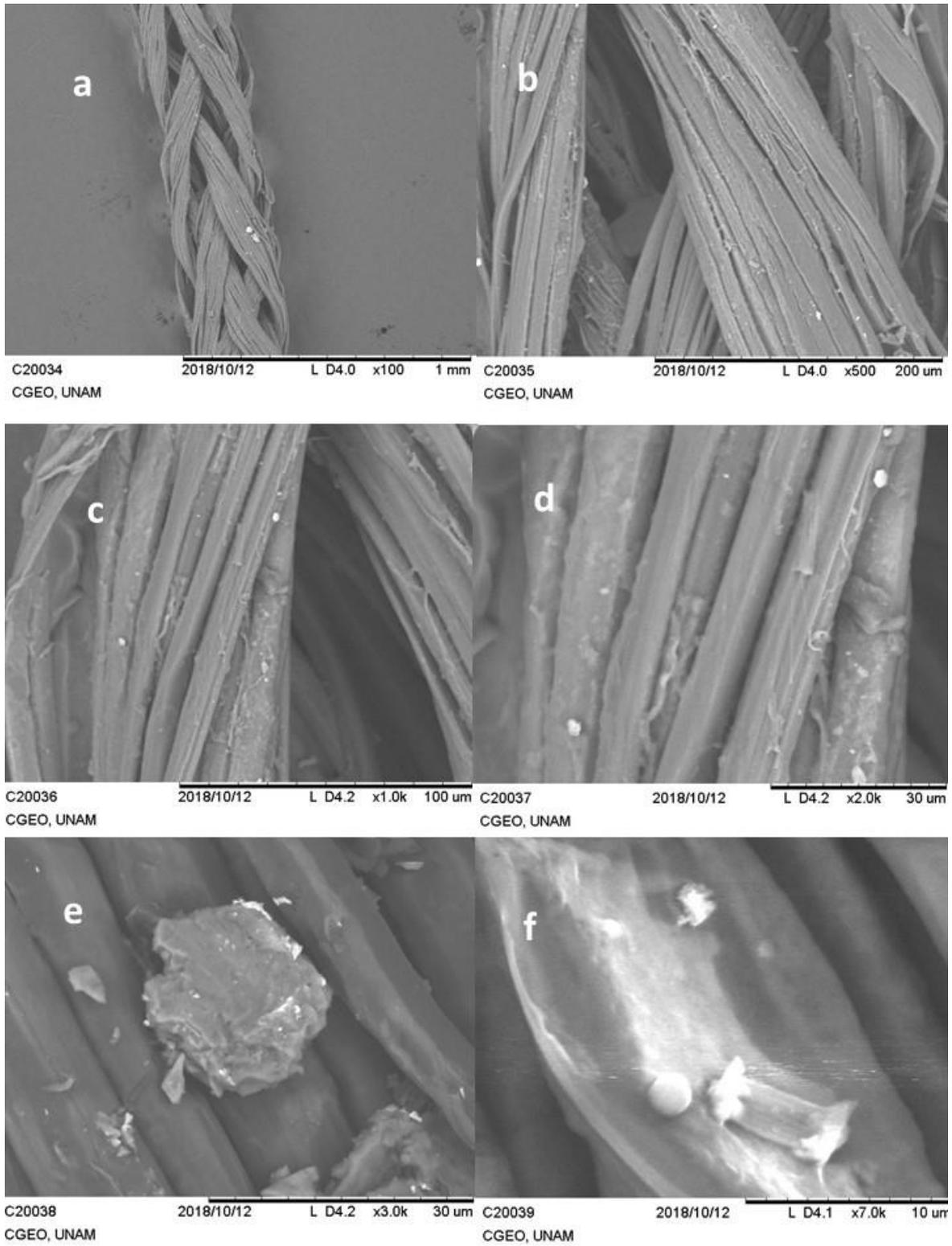


Figura 21. Micrografías SEM de suturas de seda con quitosano (Grupo 2C) a diferentes ampliaciones: a (1 mm), b (200 μm), c (100 μm), d (30 μm), e (30 μm), f (10 μm). Fuente: Directa.



Se puede apreciar con estas micrografías que las pertenecientes al grupo 1 (0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 25 °C) presentan en su superficie lo que podría ser partículas de quitosano que no se disolvieron por completo al momento de haberlas dejado en agitación magnética durante 24 horas, lo cual es contrastante con las suturas del grupo 2 (0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C) en las cuales se puede apreciar mayor uniformidad en toda su superficie, indicativo de que la solución realizada en este grupo, sí presenta más homogeneidad. Esto se le atribuye a la temperatura utilizada.

4.3 Actividad antimicrobiana

4.3.1 Método de difusión en agar

Se analizó el efecto antimicrobiano mediante el ensayo de difusión en agar de las suturas de seda que fueron recubiertas con quitosano en contacto con las cepas *S. aureus*, *S. mutans* y *E. coli* a las 24 horas de haber sido inoculadas.

Tabla 9. Grupos evaluados en ensayo de difusión de agar.

Numeración	Grupos	Descripción
1	Control +	Sutura sin modificación
2	Grupo 1	Sutura desgomada con 0.2 g Ch +10 ml ácido acético al 0.5 %+ 25 °C
3	Grupo 2	Sutura desgomada con 0.2 g Ch +10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C
4	DP1	Disco de papel con Ch utilizado en el Grupo 1
5	DP2	Disco de papel con Ch utilizado en el Grupo 2

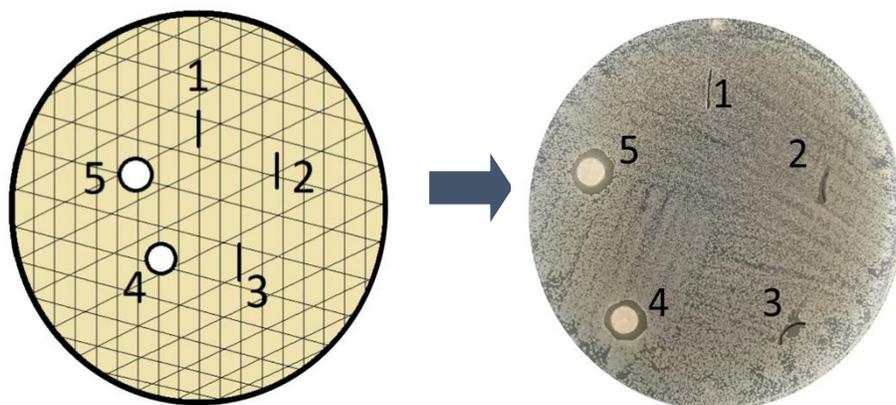


Figura 22. Representación de colocación de grupos experimentales y control. Fuente: directa.



Figura 23. Ensayos de actividad antimicrobiana con el método de difusión de agar en contacto con la cepa *E. coli*. Fuente: directa.

Tabla 10. Promedios de diámetro de zonas de inhibición generadas en ensayo de difusión de agar en la cepa *E. coli*.

Grupos	Media (mm)	Desviación estándar (mm)
Grupo 1	0.24692	± 0.455
Grupo 2	0.3203	± 0.135
DP1	1.16544	± 0.879
DP2	1.34269	± 0.465

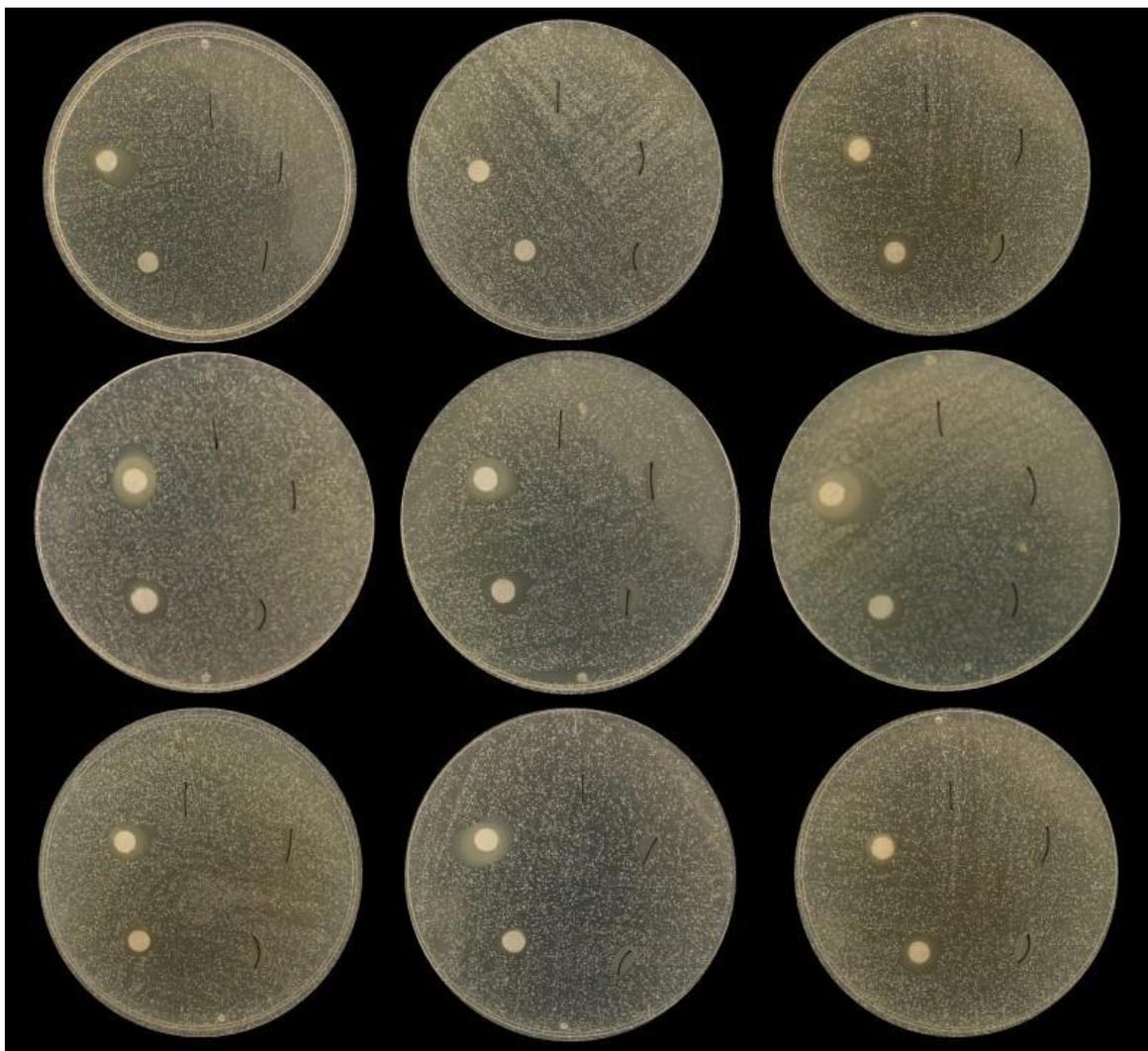


Figura 24. Ensayos de actividad antimicrobiana con el método de difusión de agar en contacto con la cepa *S. aureus*. Fuente: directa.

Tabla 11. Promedios de diámetro de zonas de inhibición generadas en ensayo de difusión de agar en la cepa *S. aureus*.

Grupos	Media (mm)	Desviación estándar (mm)
Grupo 1	0.75744	± 1.031
Grupo 2	1.42122	± 0.727
DP1	1.73333	± 0.652
DP2	2.49333	± 1.384

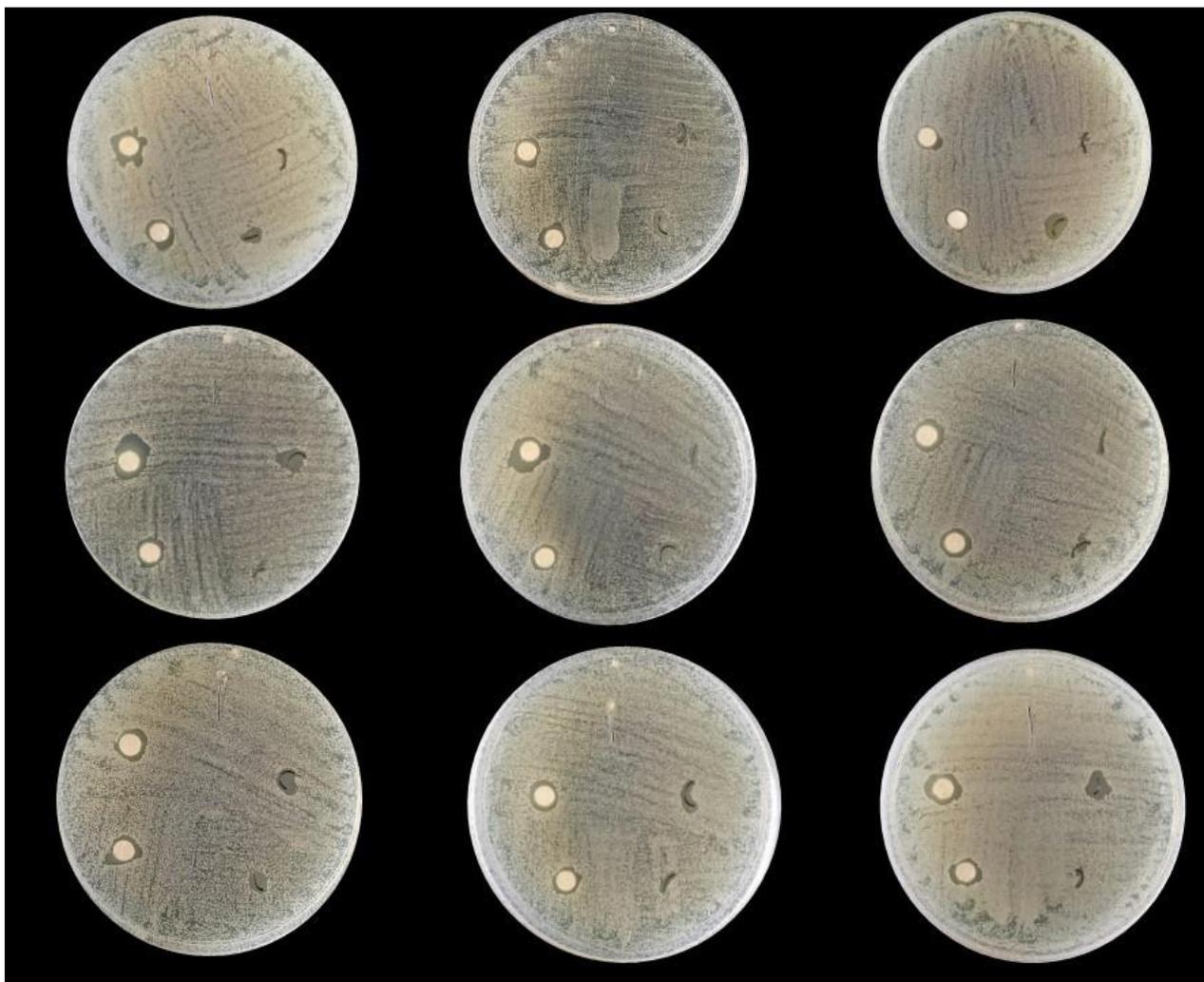


Figura 25. Ensayos de actividad antimicrobiana con el método de difusión de agar en contacto con la cepa *S. mutans*. Fuente: directa.

Tabla 12. Promedios de diámetro de zonas de inhibición generadas en ensayo de difusión de agar en la cepa *S. mutans*.

Grupos	Media (mm)	Desviación estándar (mm)
Grupo 1	1.04294	± 0.920
Grupo 2	0.99558	± 1.094
DP1	1.43167	± 0.544
DP2	1.63408	± 0.685



En todos los grupos de suturas, se mostró colonización bacteriana en la sutura de control, es decir, la colocada a las 12:00 horas según las manecillas del reloj, indicando que las suturas no poseen efecto bactericida *per se*, sino al contrario, se muestra una mayor cantidad de colonias concentradas en la muestra de sutura, lo que comprueba lo antes ya mencionado, referente a que la sutura de seda tiende a ser un elemento acumulador de bacterias, tanto entre sus intersticios trenzados, como en su superficie.

Asimismo, se puede notar que la zona de inhibición corresponde a la cantidad de quitosano que fue colocado de manera directa mientras se realizaba la prueba antimicrobiana, lo cual podría ser indicativo de que lo que inhibe el crecimiento bacteriano es el quitosano que se encuentra en la superficie de la sutura y no la que esté dentro de las mismas.

En el segundo lugar, colocado a las 14:00 h según las manecillas del reloj, donde se encontraban las suturas de seda recubiertas de quitosano del grupo 1 (0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 25 °C), se pudo observar una inhibición de 0.24 mm alrededor de la sutura para la cepa *E. coli*, mientras que en las cepas *S. aureus* y *S. mutans* se mostraron resultados de hasta 0.75 y 1.04 mm, respectivamente.

En el tercer lugar, colocados a las 16:00 h según las manecillas del reloj, donde fueron colocadas las suturas de seda recubiertas de quitosano del grupo 2 (0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C), se pudo apreciar un mayor efecto antibacteriano en comparación con las suturas del grupo 1, con excepción de *S. mutans*, donde se vio un ligero decremento en el área de inhibición. Con la cepa *E. coli* se presentó una zona de inhibición de 0.32 mm, para *S. aureus* de 1.42 mm y para *S. mutans* de 0.99 mm.

En el cuarto lugar, colocado a las 20 h según las manecillas del reloj, correspondiente al disco de papel con el quitosano del primer grupo (0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 25 °C), se registraron zonas de inhibición mayor en todos los grupos en comparación con los colocados en la sutura. *E. coli* presentó una zona de inhibición de 1.16 mm, *S. aureus* de 1.73 mm y *S. mutans* de 1.43 mm.

En la quinta posición, ubicado a las 22:00 h según las manecillas del reloj, donde se colocó el disco de papel con el quitosano del segundo grupo (0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C), se observaron zonas de inhibición más grandes generados en los ensayos. Con la cepa *E. coli* se presentó una zona de inhibición de 1.34 mm, para *S. aureus* de 2.4 mm y para *S. mutans* de 1.63 mm.



Con base en estos resultados de las zonas de inhibición de cada grupo, podemos decir que ambos grupos de quitosano utilizados muestran resultados favorables en la inhibición de agentes bacterianos, en este caso, *S. aureus*, *S. mutans* y que la cepa correspondiente a *E. coli* mostró mayor resistencia. La diferencia de tamaño de la zona de inhibición entre las diferentes cajas de Petri, se le atribuye, a la limitante como ya había sido mencionado con anterioridad: al momento de realizar el ensayo antimicrobiano, no se puede saber con certeza la cantidad de quitosano depositado en la sutura.

4.3.2 Sensidiscos antibióticos como control positivo

Se realizaron las pruebas de control positivo en las cepas *S. aureus*, *S. mutans* y *E. coli* y con sensidiscos antibióticos correspondientes, obteniendo los resultados esperados en las cepas evaluadas, ya que respondieron de manera positiva al efecto bactericida de dichos antibióticos (figura 26).

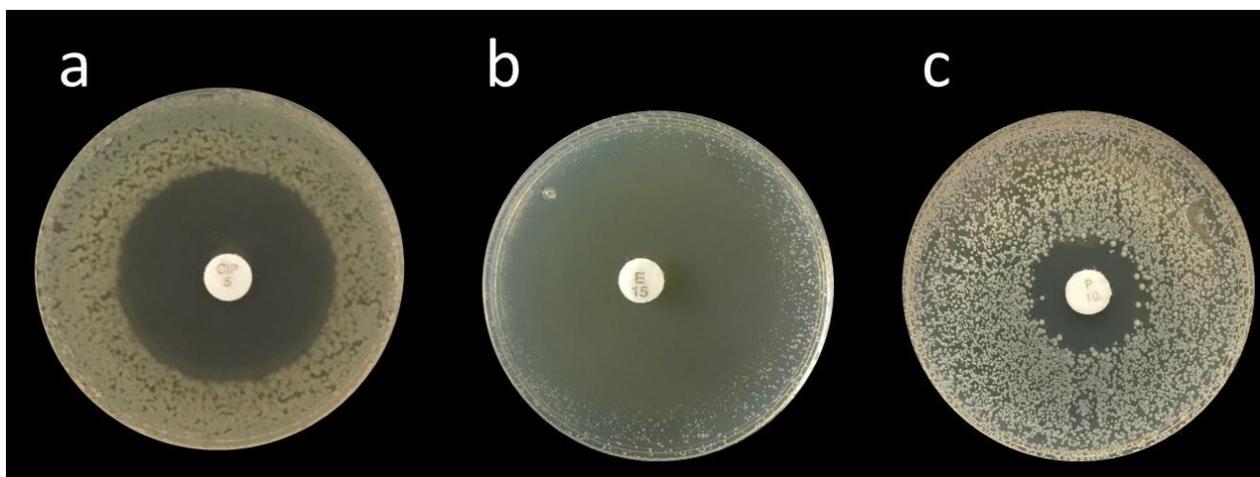


Figura 26. Prueba de difusión de agar con sensidiscos antibióticos en las cepas a. *E. coli* (ciprofloxacino), b. *S. aureus* (eritromicina) y c. *S. mutans* (penicilina). Fuente: directa.

Tabla 13. Promedios de diámetro de zonas de inhibición con sensidiscos antibióticos en las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans*, en comparación con lo establecido en el CLSI.

Cepa	Media (mm)	Medidas de inhibición establecidas por el CLSI (mm)(70)		
<i>E. coli</i>	12	S ≥ 21	I 20-16	R ≤ 15
<i>S. aureus</i>	17	S ≥ 23	I 22-14	R ≤ 13
<i>S. mutans</i>	5	S ≥ 24	--	--

S= Susceptible, I= Intermedio, R= Resistente.



La zona de inhibición generado por la eritromicina contra *S. aureus* fue visiblemente mayor que en otros dos casos, con una zona de inhibición de 17 mm, sin embargo, los otros dos antibióticos empleados mostraron de igual manera su efectividad, aunque en menor cantidad, obteniendo 12 mm en contacto con *E. coli* y 5 mm contra *S. mutans*. Se decidió realizar esta prueba en un ensayo diferente al del método de difusión en agar, para evitar la interferencia de los halos de inhibición con los resultados de nuestros grupos experimentales de haber sido colocados todos en una sola caja de Petri.

4.3.3 Discos de papel como control negativo

En las pruebas de control negativo con las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans* se obtuvieron los resultados esperados en las cepas evaluadas, ya que respondieron de manera negativa al efecto bactericida del ácido acético al 0.5 %, lo cual es indicativo de que el efecto inhibitorio de crecimiento bacteriano se le atribuye en su totalidad al quitosano y no al ácido acético *per se* (figura 27).

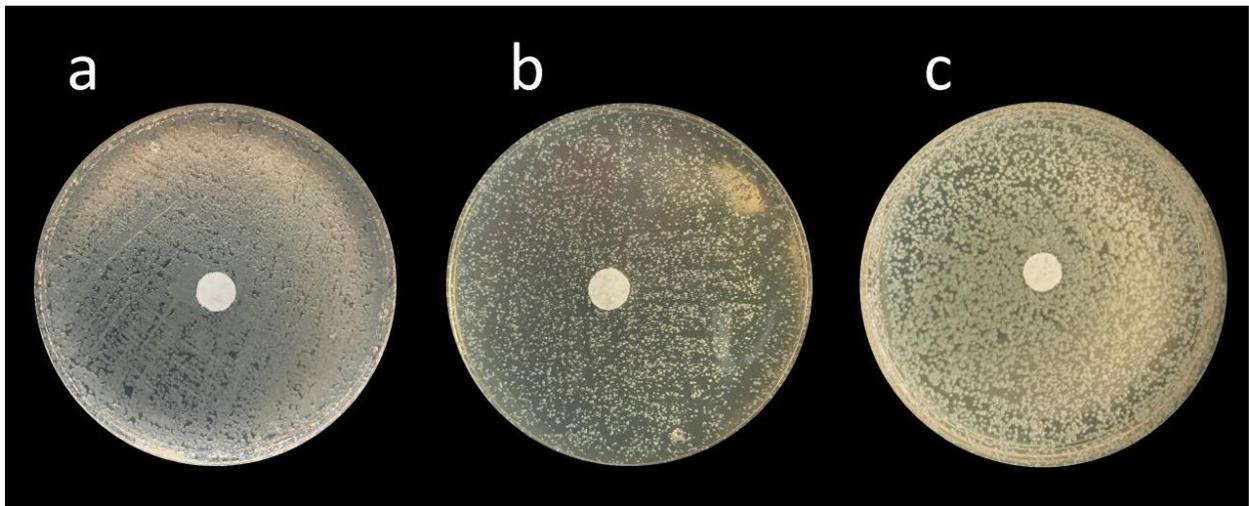


Figura 27. Prueba de difusión de agar con discos de papel impregnados con ácido acético al 0.5 % en las cepas a. *E. coli*, b. *S. aureus* y c. *S. mutans*. Fuente: directa.



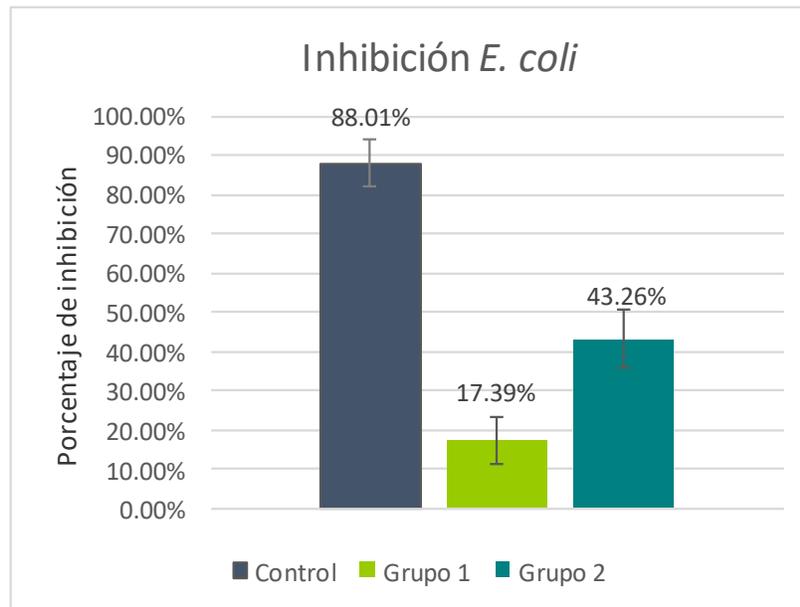
4.4 Ensayo de microdilución

Posterior al periodo de incubación de 24 h de las placas de 96 pocillos, se procedió a evaluar la turbidez del ensayo con ayuda de un espectrofotómetro marca Thermo Scientific. Los grupos fueron divididos de la siguiente manera:

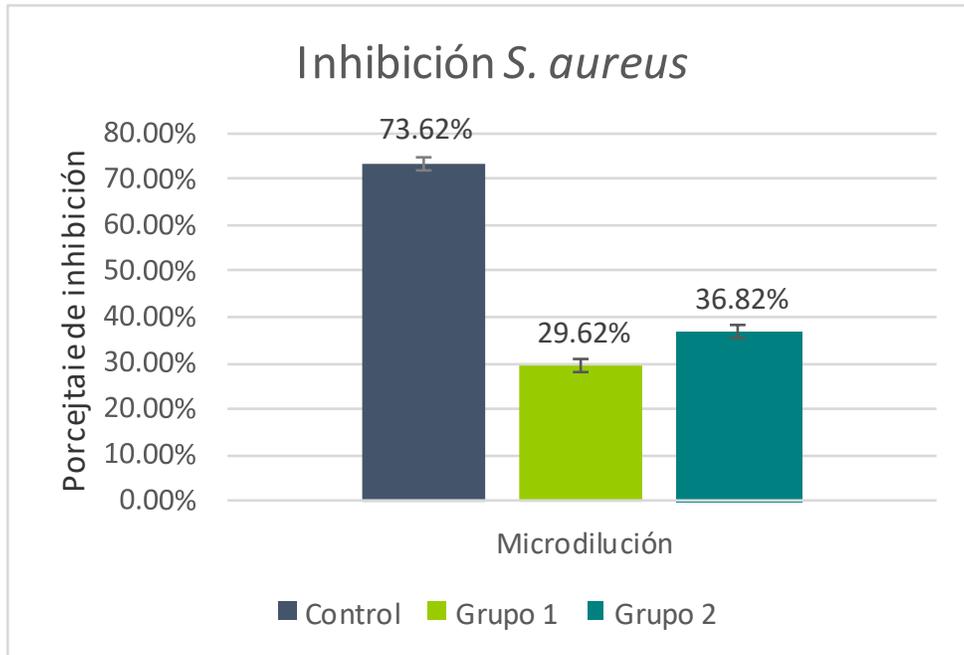
Tabla 14. Grupos en ensayo de microdilución con bacterias (*E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans*).

Grupos	Descripción
Grupo 1	100 µl de bacteria + 100 µl de medio + sutura con 0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 25 °C
Grupo 2	100 µl de bacteria + 100 µl de medio + sutura con 0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C.
Control	100 µl de antibiótico + 100 µl de medio

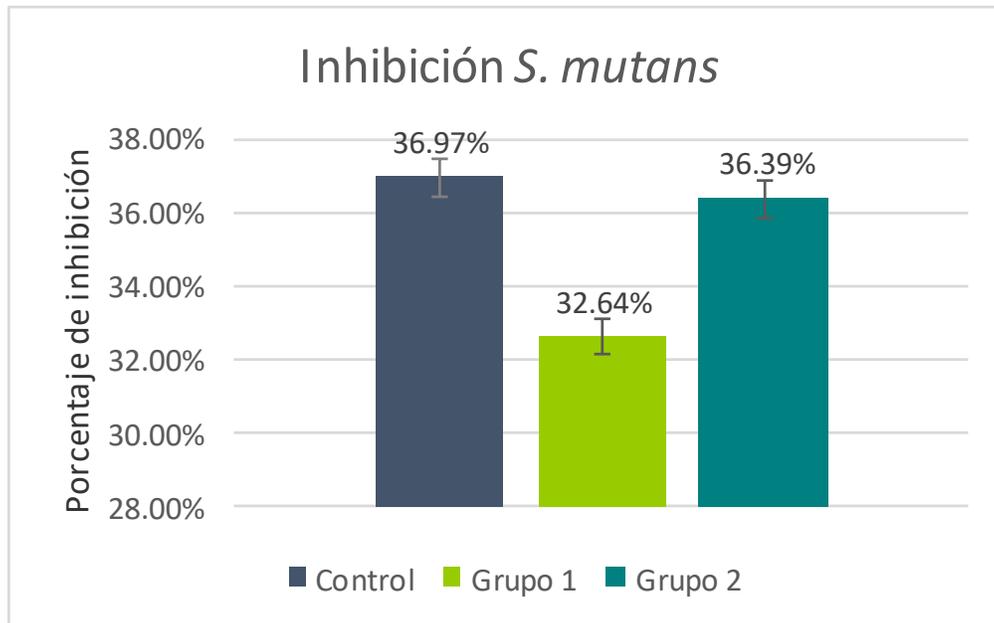
Según lo establecido en el CLSI, se determinó una densidad óptica en *E. coli* de 625 nm, en *S. aureus* de 570 nm y en *S. mutans* de 600 nm, obteniendo los siguientes resultados:



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de los grupos experimentales y control (ciprofloxacino) ante la cepa *E. coli* en el ensayo de microdilución. Fuente: directa.



Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de los grupos experimentales y control (eritromicina) ante la cepa *S. aureus* en el ensayo de microdilución. Fuente: directa.



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de los grupos experimentales y control (penicilina) ante la cepa *S. mutans* en el ensayo de microdilución. Fuente: directa.



Con la cepa *E. coli* el grupo 1 presentó una inhibición del 17.39 %, mientras que el grupo 2 presentó un porcentaje del 43.26 % y el control positivo, en el cual se utilizó ciprofloxacino, generó una inhibición del 88.01 %.

En las gráficas correspondientes a la cepa *S. aureus* se obtuvieron porcentajes de inhibición del 29.62 % para el grupo 1 y 36.82 % para el grupo 2, mientras que el grupo del control positivo, en el que fue empleado eritromicina, duplicó el porcentaje del grupo 2, obteniendo un 73.62 %.

Los grupos que mejores resultados dieron fueron los de los ensayos con la cepa *S. mutans*, donde se puede observar una inhibición del 32.64 % para el grupo 1, del 36.93 % para el grupo 2 y 36.97 % para el control negativo, en el cual fue utilizado penicilina.

En los tres ensayos realizados, los resultados de porcentaje de inhibición del primer grupo fueron menores en comparación con los del grupo segundo, siendo esta diferencia más evidente en los grupos en contacto con *E. coli*.

4.5 Microscopía Bifocal complementario al ensayo de microdilución

Previo a la realización de la prueba de MTT se observó el contenido de las placas de 96 pocillos con un microscopio bifocal Leica DM500 del laboratorio de investigación interdisciplinaria de la ENES León, con el objetivo 40x0.50. Dichos pocillos fueron seleccionados aleatoriamente, eligiendo un pocillo de cada una de las pruebas realizadas, de manera que se seleccionó de la siguiente manera:



E. coli

		Grupo 1			Grupo 2			Grupo 1			Grupo 2		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B		○	○	○	✕	○	○	○	✕	○	○	○	○
C		○	✕	○	○	○	○	○	○	○	○	✕	○
D		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E		○	✕	○	○	✕	○	○	○	○	○	○	○
F		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CONTROL POSITIVO	G	C+	C+	C+	C+	C+	C+	○	○	○	○	○	○
CONTROL NEGATIVO	H	C-	C-	C-	C-	C-	C-	○	○	○	○	○	○

Figura 28. Selección aleatoria de pocillos con *E. coli* para observación en microscopio.

Fuente: directa

S. aureus

		Grupo 1			Grupo 2			Grupo 1			Grupo 2		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B		○	✕	○	○	○	○	○	✕	○	○	○	○
C		○	○	○	○	✕	○	○	○	○	○	✕	○
D		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F		○	✕	○	○	✕	○	○	○	○	○	○	○
CONTROL POSITIVO	G	C+	C+	C+	C+	C+	C+	○	○	○	○	○	○
CONTROL NEGATIVO	H	C-	C-	C-	C-	C-	C-	○	○	○	○	○	○

Figura 29. Selección aleatoria de pocillos con *S. aureus* para observación en microscopio.

Fuente: directa

S. mutans

		Grupo 1			Grupo 2			Grupo 1			Grupo 2		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B		○	✕	○	○	✕	○	○	✕	○	○	✕	○
C		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E		○	✕	○	○	✕	○	○	○	○	○	○	○
F		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CONTROL POSITIVO	G	C+	C+	C+	C+	C+	C+	○	○	○	○	○	○
CONTROL NEGATIVO	H	C-	C-	C-	C-	C-	C-	○	○	○	○	○	○

Figura 30. Selección aleatoria de pocillos con *S. mutans* para observación en microscopio.

Fuente: directa

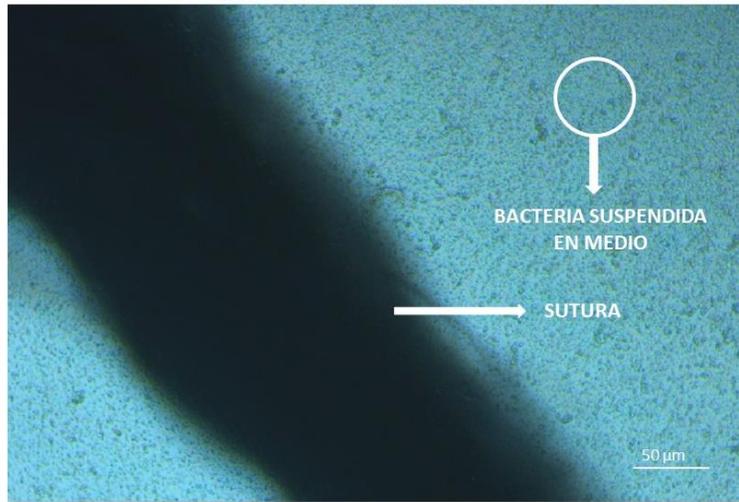


Figura 31. Sutura suspendida en medio con bacteria. Fuente: directa

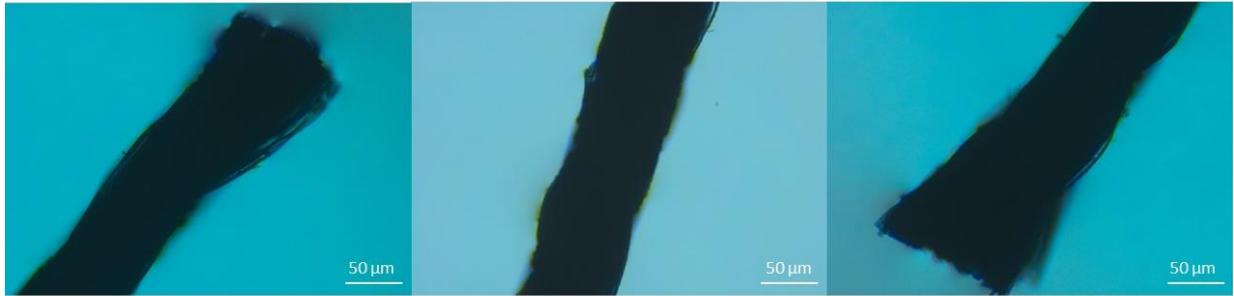


Figura 32. Sutura de seda suspendida en medio. Fuente: directa

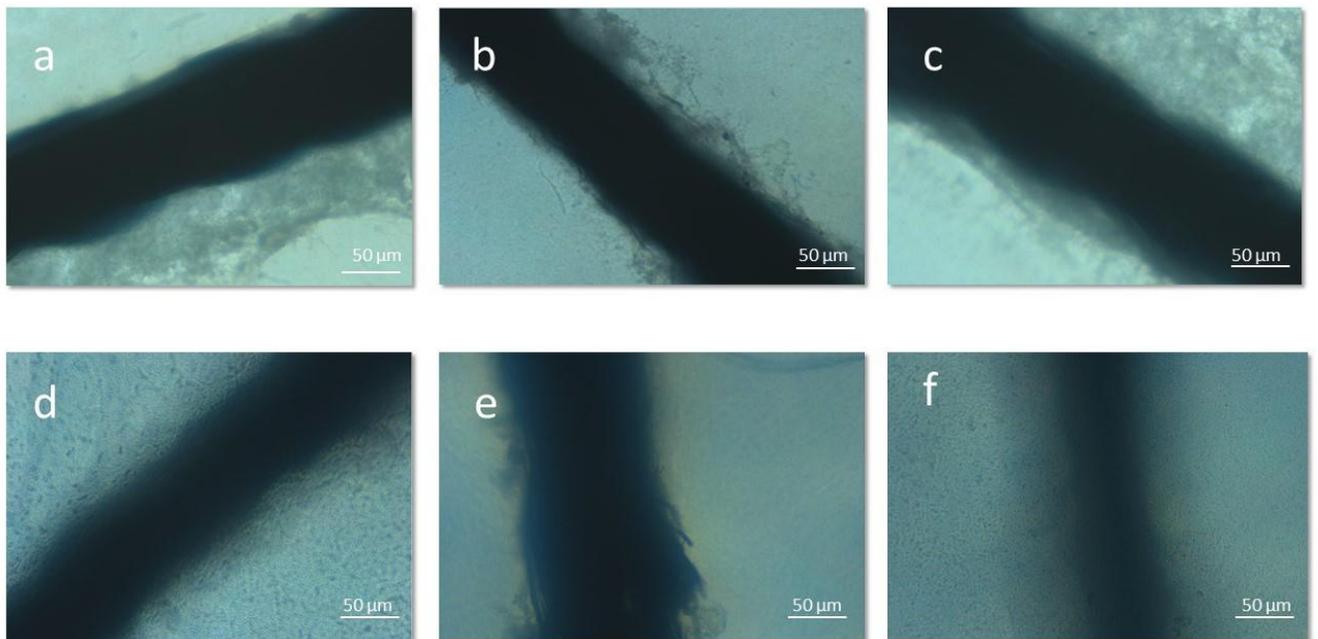


Figura 33. Sutura de seda suspendida en medio con *E. coli*. Fuente: directa

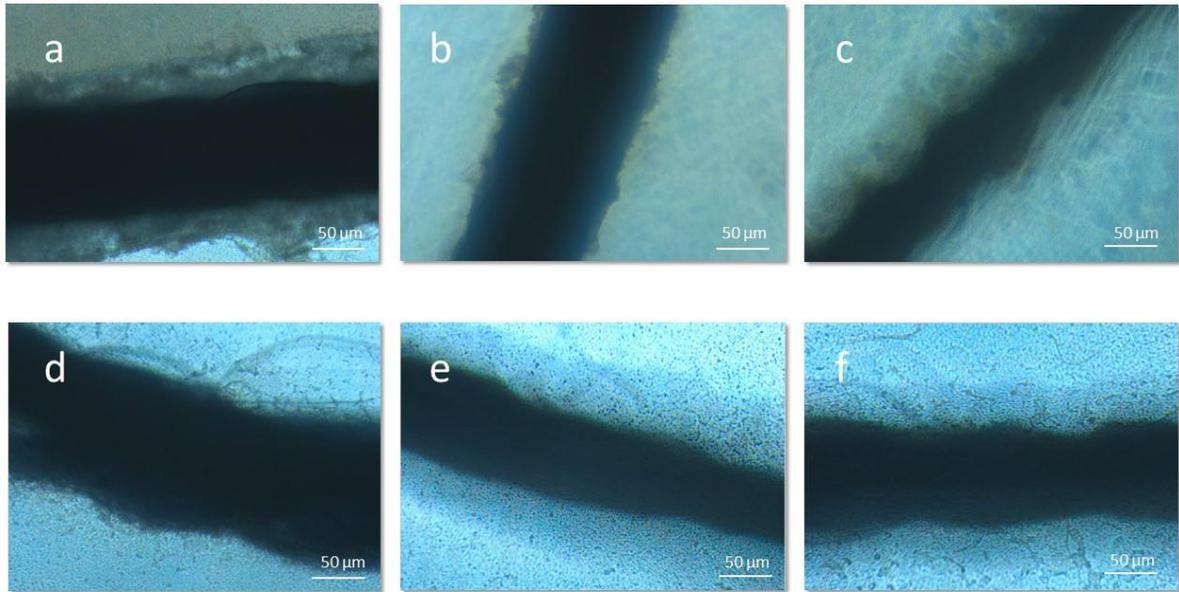


Figura 34. Sutura de seda suspendida en medio con *S. aureus*. Fuente: directa.

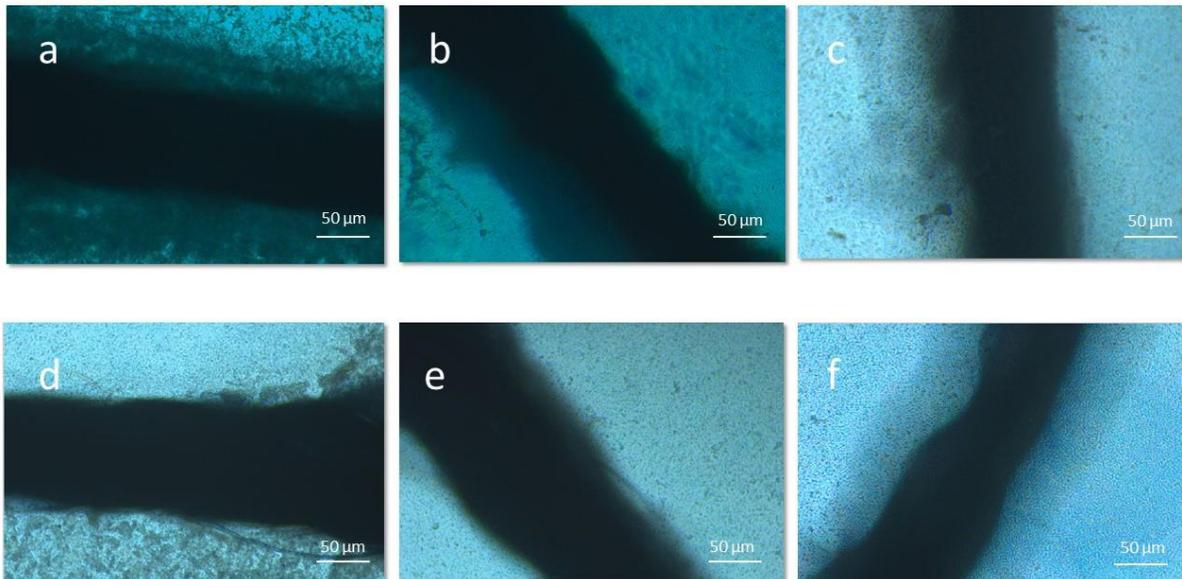


Figura 35. Sutura de seda suspendida en medio con *S. mutans*. Fuente: directa

En las imágenes obtenidas no se puede apreciar una diferencia entre las suturas del grupo 1 y las del grupo 2, ya que en todas se observa presencia de las bacterias.



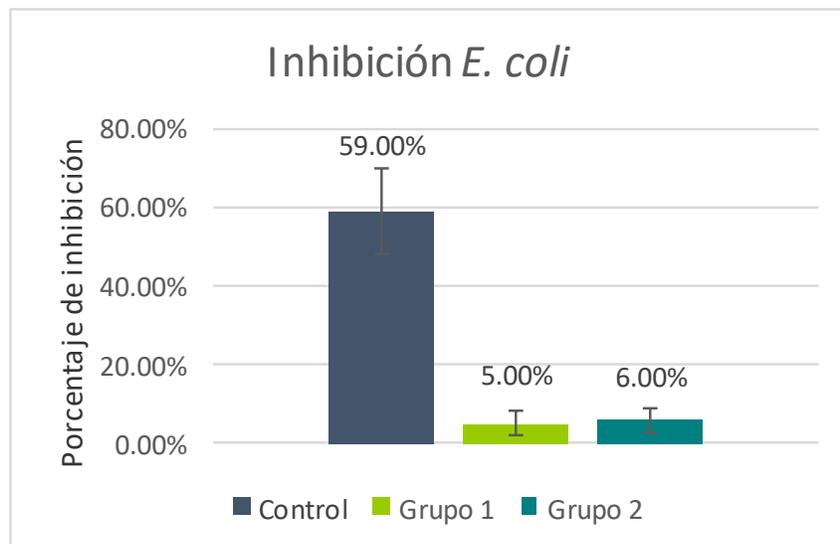
4.6 Cuantificación de viabilidad bacteriana mediante reducción metabólica del MTT

Posterior a la caracterización en el microscopio, se realizó el ensayo de MTT a las 72 horas para corroborar la existencia de bacterias metabólicamente activas después del experimento. Los grupos fueron divididos de la siguiente manera:

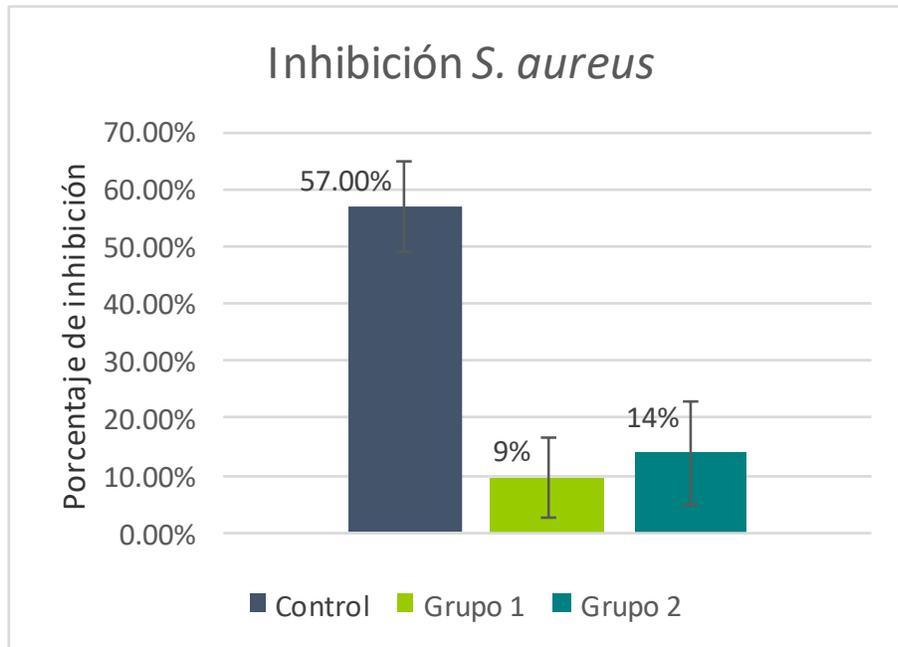
Tabla 15. División de grupos para ensayo de MTT

Grupos	Descripción
Grupo 1	100 µl de bacteria + 100 µl de medio + sutura con 0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 25 °C
Grupo 2	100 µl de bacteria + 100 µl de medio + sutura con 0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C.
Control	100 µl de antibiótico + 100 µl de medio

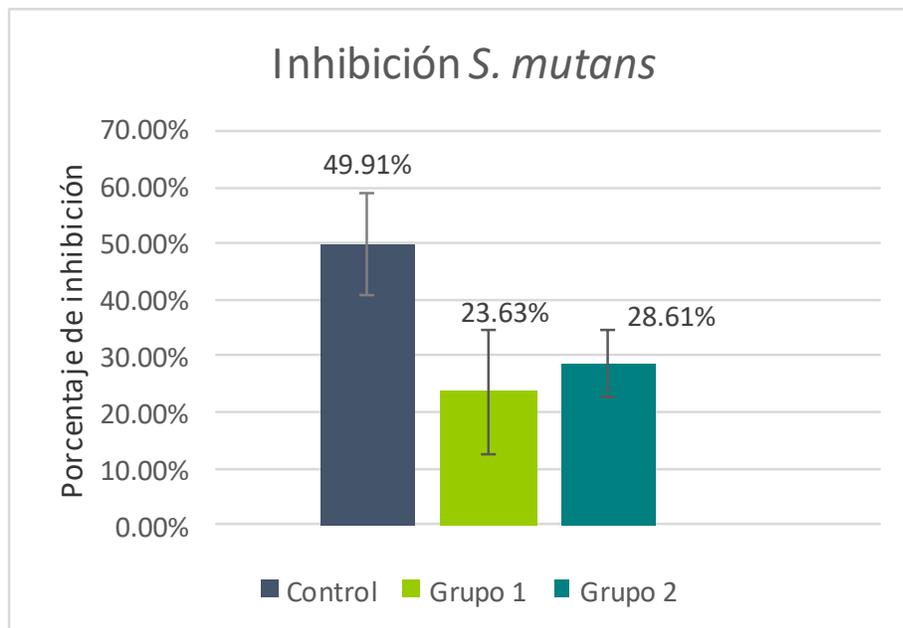
Al igual que en la microdilución, las lecturas se realizaron con base a lo establecido por los estándares internacionales, con una densidad óptica de *E. coli* de 625 nm, en *S. aureus* de 570 nm y en *S. mutans* de 600 nm, obteniendo los siguientes porcentajes:



Gráfica 4. Porcentaje de inhibición de los grupos experimentales y control (ciprofloxacino) ante la cepa *E. coli* en el ensayo de MTT. Fuente: directa.



Gráfica 5. Porcentaje de inhibición de los grupos experimentales y control (eritromicina) ante la cepa *S. aureus* en el ensayo de MTT. Fuente: directa.



Gráfica 6. Porcentaje de inhibición de los grupos experimentales y control (penicilina) ante la cepa *S. mutans* en el ensayo de MTT. Fuente: directa



En la gráfica 4 se puede observar un efecto antibacteriano escaso con la cepa *E. coli* tanto del grupo 1 como del grupo 2, con una inhibición del 5 y 6 % respectivamente, en comparación con el control negativo, donde se generó una inhibición del 59 % con el antibiótico empleado (ciprofloxacino).

Con la cepa *S. aureus* (gráfica 5), el grupo 1 presentó un porcentaje de inhibición del 9.4 %, siendo evidente su diferencia con el grupo 2, del cual se obtuvo un 14 %, sin embargo, ninguno de los dos dio resultados tan favorables como el generado por el control negativo (eritromicina), el cual dio un porcentaje de 57 % de inhibición.

Los resultados que más se acercaron a los del control negativo fueron los pertenecientes a los probados con la cepa *S. mutans* (gráfica 6), donde se obtuvo un porcentaje de inhibición del 23.63 % y 28.61 % del grupo 1 y 2 respectivamente, en contraste con el generado por el control negativo (penicilina), el cual dio un resultado de 49.91 % de inhibición de la cepa bacteriana.

Los resultados arrojados en estas tablas indican que el quitosano empleado en las condiciones en las que fueron divididos nuestros grupos sí tienen un efecto bacteriostático, sin embargo, su efecto todavía es escaso en comparación con antibióticos que son utilizados ya de forma comercial. En comparación con el grupo control, la cepa *S. mutans* fue la que mejor resultados arrojó, ya que es la que se encuentra más cercana a los datos generados por el antibiótico.

4.7 Análisis estadístico Levene, ANOVA y prueba Tukey

Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante el software IBM SPSS Statistics versión 25 para la medición de datos obtenidos en el espectrofotómetro en el ensayo de MTT. Para analizar los resultados se aplicó la prueba Levene ($P < 0.05$) (tablas 16, 17 y 18), en donde se observó una igualdad en las varianzas, posteriormente, se llevó a cabo el análisis ANOVA de una vía, ($P < 0.05$) y finalmente, como evaluación Post Hoc, se realizó la prueba Tukey con el mismo valor de significancia, tal y como se muestra en las tablas 19, 20 y 21.



Tabla 16. Análisis estadístico Levene en ensayo MTT con *E. coli*.

Fuente: directa.

Prueba de homogeneidad de varianzas *E. coli* *Significancia (P<0.05)

		Estadístico de			
		Levene	gl1	gl2	Sig.
Datos	Se basa en la media	2.463	3	60	0.071
	Se basa en la mediana	1.472	3	60	0.231
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.472	3	44.596	0.235
	Se basa en la media recortada	2.204	3	60	0.097

Tabla 17. Análisis estadístico Levene en ensayo MTT con *S.aureus*.

Fuente: directa.

Prueba de homogeneidad de varianzas *S. aureus* *Significancia (P<0.05)

		Estadístico de			
		Levene	gl1	gl2	Sig.
Datos	Se basa en la media	2.157	3	65	0.102
	Se basa en la mediana	1.772	3	65	0.161
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.772	3	38.846	0.169
	Se basa en la media recortada	2.150	3	65	0.102

Tabla 18. Análisis estadístico Levene en ensayo MTT con *S. mutans*.

Fuente: directa.

Prueba de homogeneidad de varianzas *S. mutans* *Significancia (P<0.05)

		Estadístico de			
		Levene	gl1	gl2	Sig.
Datos	Se basa en la media	1.124	3	61	0.346
	Se basa en la mediana	1.110	3	61	0.352
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.110	3	45.297	0.355
	Se basa en la media recortada	1.138	3	61	0.341

Tabla 19. Análisis estadístico ANOVA y HSD Tukey en ensayo MTT con *E. coli*. Fuente: directa.



ANOVA

*Significancia (P<0.05)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3.950	3	1.317	126.766	0.001
Dentro de grupos	0.623	60	0.010		
Total	4.573	63			

Pruebas post hoc HSD Tukey

*Significancia (P<0.05)

(I) Grupos	(J) Grupos	Desv. Error	Sig.
Control negativo	Grupo1	.03916	0.993
	Grupo2	.03916	0.671
	Control positivo	.04364	0.001
Grupo1	Control negativo	.03916	0.993
	Grupo2	.03145	0.709
	Control positivo	.03688	0.000
Grupo2	Control negativo	.03916	0.671
	Grupo1	.03145	0.709
	Control positivo	.03688	0.001
Control positivo	Control negativo	.04364	0.001
	Grupo1	.03688	0.001
	Grupo2	.03688	0.001

Tabla 20. Análisis estadístico ANOVA y HSD Tukey en ensayo MTT con *S. aureus*. Fuente: directa.



ANOVA

*Significancia (P<0.05)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.389	3	0.130	13.238	0.001
Dentro de grupos	0.657	67	0.010		
Total	1.046	70			

Pruebas post hoc HSD Tukey

*Significancia (P<0.05)

(I) Grupos	(J) Grupos	Desv. Error	Sig.
Control negativo	Grupo1	0.03849	0.702
	Grupo2	0.03829	0.133
	Control positivo	0.04451	0.001
Grupo1	Control negativo	0.03849	0.702
	Grupo2	0.02774	0.419
	Control positivo	0.03583	0.001
Grupo2	Control negativo	0.03829	0.133
	Grupo1	0.02774	0.419
	Control positivo	0.03561	0.001
Control positivo	Control negativo	0.04451	0.001
	Grupo1	0.03583	0.001
	Grupo2	0.03561	0.001

Tabla 21. Análisis estadístico ANOVA y HSD Tukey en ensayo MTT con *S. mutans*. Fuente: directa.



ANOVA

*Significancia (P<0.05)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.222	3	0.074	10.037	0.001
Dentro de grupos	0.486	66	0.007		
Total	0.707	69			

Pruebas post hoc HSD Tukey *Significancia (P<0.05)

(I) Grupos	(J) Grupos	Desv. Error	Sig.
Control negativo	Grupo1	0.03352	0.066
	Grupo2	0.03334	0.016
	Control positivo	0.03782	0.001
Grupo1	Control negativo	0.03352	0.066
	Grupo2	0.02451	0.886
	Control positivo	0.03032	0.001
Grupo2	Control negativo	0.03334	0.016
	Grupo1	0.02451	0.886
	Control positivo	0.03012	0.008
Control positivo	Control negativo	0.03782	0.001
	Grupo1	0.03032	0.001
	Grupo2	0.03012	0.008



En los resultados se pudo observar con la prueba ANOVA que sí existe una diferencia significativa en los tres ensayos realizados, y de forma complementaria, en la prueba Tukey, se pudo identificar entre qué grupos se encuentran estas diferencias significativas.

Del primer ensayo, realizado con *E. coli*, la única diferencia significativa se encontró con el control positivo, que es el correspondiente a la cepa con el antibiótico. De igual manera, en el ensayo con *S. aureus*, se encontraron los mismos resultados que con *E. coli*, ya que únicamente se encontró diferencia significativa con el control positivo. Con el tercer ensayo, realizado con *S. mutans*, se encontró diferencia significativa entre el grupo 2 y el control negativo, así como entre el control positivo y los grupos 1, 2 y control negativo.

4.8 Ensayo de viabilidad bacteriana en agar Mueller-Hinton

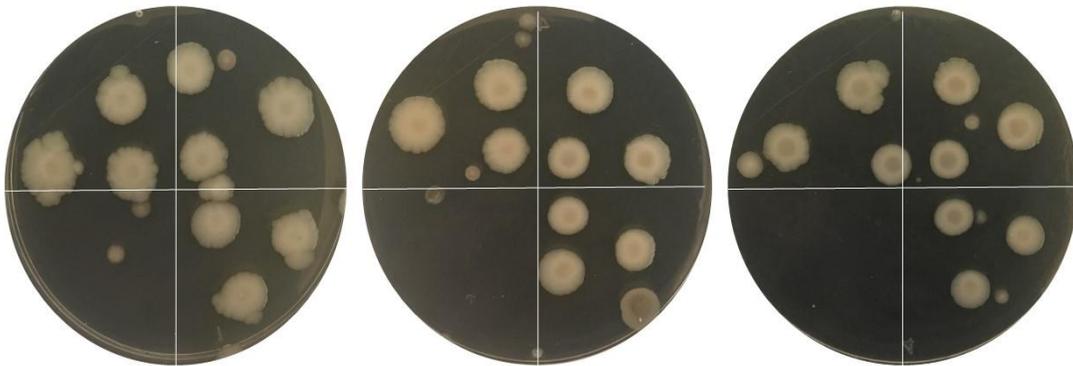


Figura 36. Ensayo de viabilidad bacteriana post MTT con la cepa *E. coli*. Fuente: directa.

Tabla 22. Resultados de ensayo de viabilidad bacteriana post MTT con la cepa *E. coli*

Cajas	Grupo 1	Grupo 2	Control +	Control -
Caja 1	✓	✓	✓	✗
Caja 2	✓	✓	✓	✗
Caja 3	✓	✓	✓	✗

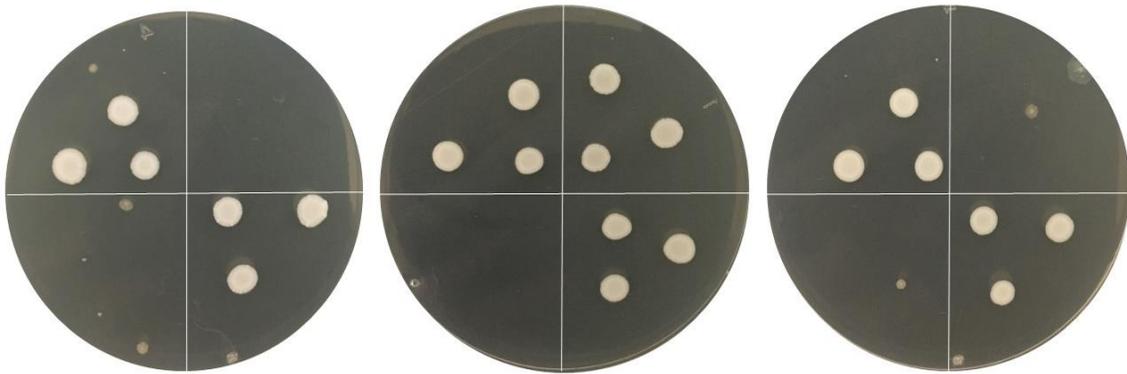


Figura 37. Ensayo de viabilidad bacteriana post MTT con la cepa *S. aureus*. Fuente: directa.

Tabla 23. Resultados de ensayo de viabilidad bacteriana post MTT con la cepa *S. aureus*.

Cajas	Grupo 1	Grupo 2	Control +	Control -
Caja 1	✓	✗	✓	✗
Caja 2	✓	✓	✓	✗
Caja 3	✓	✗	✓	✗

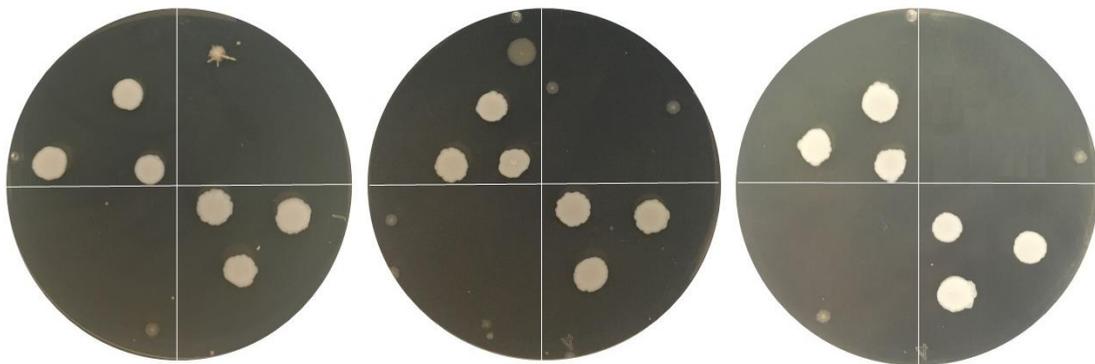


Figura 38. Ensayo de viabilidad bacteriana post MTT *S. mutans*. Fuente: directa.

Tabla 24. Resultados de ensayo de viabilidad bacteriana post MTT con la cepa *S. mutans*.

Cajas	Grupo 1	Grupo 2	Control +	Control -
Caja 1	✓	✗	✓	✗
Caja 2	✓	✗	✓	✗
Caja 3	✓	✗	✓	✗



Con base en los resultados anteriores, se puede observar en la tabla 22 y figura 36, que hubo un crecimiento bacteriano tanto del grupo 1, como del 2, así como del control positivo, lo cual nos indica que el efecto del quitosano en ambos grupos es bacteriostático y no bactericida para la cepa *E. coli*.

Asimismo, se encontró que los grupos experimentales en contacto con la cepa *S. aureus*, mostraron un efecto positivo en el grupo 2, obteniendo inhibición en dos de los tres experimentos realizados, mientras que para el grupo 1, hubo colonización bacteriana en los tres ensayos, tal como se puede apreciar en la tabla 23 y la figura 37.

En los resultados correspondientes a la tabla 24 y figura 38, de la cepa *S. mutans* se puede concluir que el efecto bactericida está presente en todos los ensayos correspondientes al grupo 2, mientras que aquellos que pertenecen al grupo 1, mostraron colonización en los tres grupos.

En todas las cepas evaluadas, se encontró crecimiento bacteriano en el control positivo y una zona libre de colonias en lo que corresponde al sitio del control negativo, los cuales son los resultados que se esperaban encontrar y que nos ayudan a confirmar que no existe contaminación en los ensayos realizados.



CAPÍTULO

5

- Discusión
- Conclusiones



5.1 Discusión:

El material utilizado en la sinéresis después de un procedimiento quirúrgico influye directamente en el proceso de cicatrización, tal y como lo menciona Fawed Javed *et al.* (67), el recuento de bacterias en suturas de seda y PGA son similares; mientras que otros estudios han reportan que las suturas de seda son más susceptibles a la invasión bacteriana y que producen más reacciones inflamatorias del tejido en comparación con otros tipos de sutura, como lo describe López García en su manual de suturas (71). También, en su estudio *in vitro*, Katz *et al.* (72), investigaron la capacidad de las bacterias para adherirse a varios tipos de suturas para causar reacciones en los tejidos; los resultados mostraron que la adherencia bacteriana a las suturas de seda trenzada fue de cinco a ocho veces mayor en comparación con el nylon al que se adhirió el menor número de bacterias. En otro estudio realizado por Banche *et al.* (73), se investigó la colonización en diversos materiales de sutura intraoral de pacientes sometidos a cirugía dentoalveolar, y los resultados mostraron un mayor número de bacterias en la seda en comparación con otro tipo de suturas. Asimismo, en un estudio histológico realizado por Abi Rached *et al.* (74), se comparó las reacciones del tejido oral con diversos materiales de sutura, teniendo como resultado la presencia de un gran número de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos en los tejidos circundantes a donde se utilizó la seda, en comparación con tejidos en los que no. Otro hallazgo fue que los fibroblastos y los nuevos capilares propios del proceso de cicatrización se formaron a un ritmo más lento en los tejidos orales cercanos a las suturas de seda, lo cual podría ser una justificación para la cicatrización tardía y las reacciones tisulares asociadas con las suturas de seda.

Referente a la preparación del quitosano con dos grupos (uno a temperatura ambiente y otro con 60 °C), se realizó de esta manera para medir la diferencia de la eficacia entre ambos métodos. En un estudio realizado por Blanquicet *et al.* (75), se fabricaron filmes a base de quitosano y lactosuero en los que se prepararon soluciones de quitosano al 1 %, 1.5 % y 2 % en una solución de ácido acético al 1 % y en todos los casos la muestra se disolvió a 60 °C con agitación constante, esto con la finalidad de incrementar el nivel de homogeneidad de la solución. En contraste con esto, Martínez *et al.* (76), estudiaron la influencia de algunos parámetros en la elaboración de soluciones de quitosano, como la temperatura, el tipo de ácido y la adición de sal, y encontraron que la viscosidad y el estrés normal disminuyeron al aumentar la temperatura y disminuir la concentración de quitosano, información corroborada por El-Hefian *et al.* (77), quienes llegaron a la



conclusión de que a menor temperatura, incrementa la viscosidad, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestros experimentos. Con relación a la actividad antibacteriana del quitosano, Lin Lin *et al.* (78), demostraron que los efectos bactericidas del quitosano frente a *E. coli* y *S. aureus* aumentaban según su peso molecular (a mayor peso molecular, mayor efecto), sin embargo, Liu *et al.* (43), reportaron lo contrario, al igual que Rejane *et al.* (44), mientras que Wu *et al.* (79), demostraron que no existe diferencia significativa del efecto bacteriostático del quitosano con diferentes grados de desacetilación y mismo peso molecular frente a *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *Pseudomonas*. Asimismo, existe controversia relacionada a la eficacia antibacteriana según la naturaleza de la cepa, algunos autores han declarado que el quitosano generalmente mostró efectos más fuertes para las bacterias grampositivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaris*, *etc.*) que para las bacterias gramnegativas (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *etc.*)(79-80).



5.2 Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se puede concluir que el uso de quitosano como agente antibacteriano sí es efectivo, ya que mostró efectos positivos en la inhibición de las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans*., sin embargo en comparación de los controles utilizados en cada prueba, aún hace falta investigación para potencializar la actividad antibacteriana, ya que se mostró una diferencia significativa entre el uso de antibióticos y los grupos de quitosano utilizados, siendo los primeros notoriamente más favorables en la inhibición de bacterias.

Con referencia a los grupos experimentales, se puede concluir que, aunque se encontró un efecto más favorable en la acción inhibitoria en el grupo correspondiente al quitosano preparado con 60 °C en comparación con el grupo al que no se le agregó temperatura, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa con base en los resultados en la prueba Tukey.

Se requiere de más experimentación complementaria para desarrollar el quitosano como recubierta de suturas, sin embargo, se ha demostrado que es un agente prometedor para inhibir el crecimiento bacteriano.



Bibliografía

1. World Health Organization. Global Report on Surveillance [Internet]. Geneva, Switzerland; 2014. Available from: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
2. Hered RM, Hered RM. Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana ¿hacia dónde vamos? 2018;(7):3–4.
3. Alliance for the Prudent Use of Antibiotics. When do I need an antibiotic? What is Antibiotic Resistance? What Can I Do to Help? When do I need an antibiotic? 2014.
4. Wells CM, Beenken KE, Smeltzer MS, Courtney HS, Jennings JA, Haggard WO. Ciprofloxacin and Rifampin Dual Antibiotic-Loaded Biopolymer Chitosan Sponge for Bacterial Inhibition. *Mil Med.* 2018;183(April):433–44.
5. Ahmed, S; Ahmad, M; Ikram S. Chitosan: A Natural Antimicrobial Agent- A Review. *J Appl Chem.* 2014;3(2):493–503.
6. Zahedi S, Safaei J, Shahbazi-alavi H. Preparation of chitosan nanoparticles from shrimp shells and investigation of its catalytic effect in diastereoselective synthesis of dihydropyrroles. *Ultrason - Sonochemistry* [Internet]. 2018;40(February 2017):260–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.07.023>
7. Maity J, Ray SK. Chitosan based nano composite adsorbent — Synthesis , characterization and application for adsorption of binary mixtures of Pb (II) and Cd (II) from water. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2018;182(October 2017):159–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.086>
8. Poonguzhali R, Basha SK, Kumari VS. International Journal of Biological Macromolecules Synthesis and characterization of chitosan-PVP-nanocellulose composites for in-vitro wound dressing application. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;105:111–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.006>
9. Matalon S, Kozlovsky A, Anda K, Levartovsky S. The effect of commonly used sutures on inflammation inducing pathogens e An in vitro study. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg.* 2013;41:593–7.
10. Knut L, Knut S, Munksgaard B. Tissue reactions to sutures in the presence and absence of anti-infective therapy. *J Clin Periodontol.* 2005;130–8.
11. Busquets-Utrera M, Sánchez-Martínez D, Núñez-Hernández A. Cirugía; Anestesia local y suturas. In: *Formación médica continuada en atención primaria* [Internet]. Madrid: Elsevier; 2015. p. 38–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/S1134->



2072(15)30008-6

12. Gay Escoda C, Berini Aytés LM. Tratado de cirugía bucal. Tomo I. Madrid: Ergón; 2011.
13. Galindo F. Enciclopedia de Cirugía Digestiva. Tratado de Fisiología médica. 2007. 543-558 p.
14. Suture Materials. In: Concise Encyclopedia of Medical and Dental Materials. 1990. p. 346–53.
15. Otten J, Jahnke H, Pelz K. Bacterial Colonization on Different Suture Materials — A Potential Risk for Intraoral Dentoalveolar Surgery. Wiley Intersci. 2005;627–35.
16. Belda-lozano R, Ferrer-ma M. Barbed Sutures in General and Digestive Surgery. Cirugía Española. 2016;4:65–9.
17. Kadirkamanathan S, Shelton J, Hepworth C, Laufer J, Swain C. A comparison of the strenght of knots tied by hand and at laparoscopy. J Am Coll Surg. 1996;182:46–54.
18. Trimbos JB, Brohim R, van Rijssel EJC. Factors relating to the volume of surgical knots. Int J Gynecol Obstet. 1989;30(4):355–9.
19. Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. Norma Oficial Mexicana NOM-067-SSA1-1993, que establece las especificaciones sanitarias de las suturas quirúrgicas [Internet]. 1993. Available from: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/067ssa13.html>
20. Kozlowski R. Handbook of Natural Fibres Processing and Applications. In 2012. p. 96–103.
21. Sánchez A., Peña-Paras L, Leyva A., Mendoza E. M. BL. Materiales híbridos de silica-quitosano para aplicaciones biomédicas. Materiales Avanzados. 2014.
22. Whawell S, Lambert D. Basic Sciences for Dental Students. 2018. 115-134 p.
23. Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Periodontología Clínica de Carranza. AMOLCA; 2014.
24. Marsh PD, Martin M V. Microbiología Oral. Quinta Edi. AMOLCA; 2011.
25. Düzgünes N. Medical Microbiology and Immunology for Dentistry. 2016. 151-156 p.
26. Socransky S, Manganiello S. The oral microbiota of man from birth to senility. J Periodontol. 1971;42(8):485–96.
27. Al-Hashimi I, Levine M. Characterization of in vivo saliva-derived enamel pellicle. Arch Oral Biol. 1989;34:289–295.
28. Busscher H, Van der Mei H. Physico-chemical interactions in initial microbial



- adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res.* 1994;11:24–32.
29. Jenkinson H, Lamont R. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8:175–200.
 30. Lee S, Li Y, Bowden G. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzyme activity. *Infect Immun.* 1996;64:1035–1038.
 31. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187–209.
 32. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun.* 1994;62(3):915–21.
 33. Rebelo R; Fernandes M, Fangueiro R. Biopolymers in Medical Implants : A Brief Review. *Procedia Eng [Internet].* 2017;200:236–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.034>
 34. Rebelo R, Vila N FR. Poly Lactic Acid Fibre Based Biodegradable Stents and Their Functionalization Techniques. *Nat Fibres Adv Sci Technol Towar Ind Appl.* 2016;12:331–42.
 35. Balan V; Berestiuc L; Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *Eur Polym J.* 2014;53:171–88.
 36. Lárez C. *Avances en Química: una década de logros.* Vol. 10. 2006.
 37. Whistler RL. *Polysaccharide Chemistry.* Acad Press Nueva York. 1983;
 38. Yalpani MJLER. *Chitin, Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications.* Elsevier, Amsterdam. 1992;
 39. Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebato MA, Rivero-González ; D, Bosquez-Molina E, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños ; S. Propiedades Químico-Estructurales Y Actividad Biológica De La Quitosana En Microorganismos Fitopatógenos. *Rev Chapingo Ser Hortic.* 2009;15(3):307–17.
 40. Marcia, Silva; Cristina T A. Evaluating conditions for the formation of chitosan/gelatin microparticles. *Polim Cienc y Tecnol.* 2009;19(3):241–7.
 41. Chen, C.; Liau, W.; Tsai G. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *J Food Prot.* 1998;(61):1124–8.
 42. Sudarsham, N.; Hoover, D.; Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.* 1992;(6):257.
 43. Liu N, Chen XG, Park HJ, Liu CG, Liu CS, Meng XH, et al. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydr*



Polym. 2006;64(1):60–5.

44. Goy RC, Britto D De, Assis OBG. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. 2009;19:241–7.
45. Liu, N.; Chen, X.; Park, H.; Liu, C.; Meng G. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. Carbohydr Polym. 2006;(64):60–5.
46. Toan N Van, Hanh TT, Vo P, Thien M. Antibacterial Activity of Chitosan on Some Common Food Contaminating Microbes. 2013;1–5.
47. Faraldos M, Consuelo G. Técnicas de Análisis y Caracterización de Materiales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid. 2011. 551-579 p.
48. Clavijo J. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Rev Elem. 2013;3:133–46.
49. Ampliación de Química Inorgánica. Parte II: Técnicas estructurales. [Internet]. 2004. Available from: http://webdeptos.uma.es/qicm/Doc_docencia/Tema14_me.pdf
50. Vazquez A, Damborenea J. Ciencia e ingeniería de la superficie de los materiales metálicos. Cons Super Investig científicas. 2000;
51. Piña C. Los sistemas terrestres y sus implicaciones medioambientales. In 2004.
52. Welsch U, Sobotta J. Histología. Ed. Médica Panamericana, editor. 2008.
53. Pawley J. Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3rd ed. Springer Berlin Heidelberg; 2006.
54. CLSI. M100S Performance Standards for Antimicrobial. 2015. 1-282 p.
55. Nacional E, Superiores DE, Posdoctoral E, Nacional E, Superiores DE, Juriquilla C. Manual para la enseñanza práctica de los ensayos de susceptibilidad antifúngica de nanopartículas.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th Edition. 2018.
57. Woods G, Washington J. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Methods. Washington D.C.; 1995.
58. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65:55–63.
59. Garcia-contreras R. Suturas funcionalizadas con nanomateriales para cirugía oral : revisión sistemática Cirugía Oral y Maxilofacial Suturas funcionalizadas con nanomateriales para cirugía oral : revisión sistemática Sutures functionalised with



-
- nanomaterials for oral surgery . *Rev Española Cirugía Oral y Maxilofac* [Internet]. 2017;(March). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.maxilo.2017.01.001>
60. Cheng L, Huang H, Chen S, Wang W, Dai F, Zhao H. Materials & Design Characterization of silkworm larvae growth and properties of silk fibres after direct feeding of copper or silver nanoparticles. *Mater Des* [Internet]. 2017;129(May):125–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2017.04.096>
 61. Garza-Rojas J.M. Rodríguez-Martínez C. Síntesis, adecuación y caracterización de biocompatibilidad de híbrido silica-quitosano para aplicaciones biomédicas. 2016.
 62. Lara D. Propiedades morfológicas y antimicrobianas de sutura de seda funcionalizada con PDADMAC y nanopartículas metálicas. *Development*. 2016.
 63. Meghil MM, Rueggeberg F, El-Awady A, Miles B, Tay F P. Novel coating of surgical suture confers antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. *JPeriodontol*. 2015;86:784–94.
 64. Mang-de la Rosa M-R, Castellanos-Cosano L, Romero-Perez M-J, Cutando A. The bacteremia of dental origin and its implications in the appearance of bacterial endocarditis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19(1):67–73.
 65. Okabe K, Nakagawa IC, Factors EY. Factors affecting the occurrence of bacteremia associated with tooth extraction. 1995;239–42.
 66. Chiapasco M, Cicco ML De, Marrone G. Side effects and complications associated with third molar surgery. 1993;
 67. Javed F, Al-askar M, Almas K, Romanos GE, Al-hezaimi K. Tissue Reactions to Various Suture Materials Used in Oral Surgical Interventions. 2012;2012.
 68. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(1):5–16.
 69. Valencia A. Efecto Antimicrobiano Del Quitosano: Una Revisión De La Literatura Antimicrobial Effect of Chitosan: a Review. *Sci Agroaliment ISSN*. 2015;2:2339–4684.
 70. BD BBL. Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs. 2011.
 71. López-García de Viedma A. Manual de suturas. Area científica 2018.
 72. Katz S, Izhar M, Mirelman D. Bacterial adherence to surgical sutures. A possible factor in suture induced infection. *Ann Surg*. 1981;194(1):34–41.
 73. Banche G, Roana J, Mandras N. Microbial adherence on various intraoral suture materials in patients undergoing dental surgery. *J Oral Maxillofac Surg*.



2007;65(8):1503–1507.

74. Abi Rached R, De Toledo B, Okamoto T. Reaction of the human gingival tissue to different suture materials used in periodontal surgery. *Braz Dent J.* 1992;2(2):103–13.
75. Macea RB, Ruiz JIR, Fuentes EM, Montes YG, De Hoyos CF. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polímeros.* 2015;25(1):58–69.
76. Martinez A, Chornet E, Rodriguez D. Steady-Shear rheology of concentrated chitosan solutions. *J Texture Stud.* 2007;35(1):53–74.
77. El-hefian EA, Elgannoudi EA, Mainal A, Yahaya AH. Characterization of chitosan in acetic acid : Rheological and thermal studies. *Turkish J Chem.* 2010;34:47–56.
78. Lin S Bin, Lin YC, Chen HH. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity. *Food Chem [Internet].* 2009;116(1):47–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.002>
79. Wu X, Zeng Q, Mo S, Ruan Z. Antibacterial activities of chitosan with different degrees of deacetylation and molecular masses. *J South China.* 2006;34(3):58–62.
80. Coma V, Deschamps A, Martial-Gros A. Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer-Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants. *J Food Sci.* 2003;68(9):2788–92.
81. Dutta P, Tripathi S, Mehrotra G, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.* 2009;114(4):1173–82.



Anexos

La primera parte del trabajo de investigación consistió en la realización de pruebas piloto con cuatro grupos:

Tabla 21. Grupos experimentales para pruebas piloto.

Grupos	Condiciones de preparación	
	Quitosano (g)/10 ml ácido acético al 0.5 %, 24 h de agitación	Temperatura de solución (°C)
Grupo 1	0.1 g	Temp. Ambiente
Grupo 2	0.2 g	Temp. Ambiente
Grupo 3	0.1 g	60 °C
Grupo 4	0.2 g	60 °C

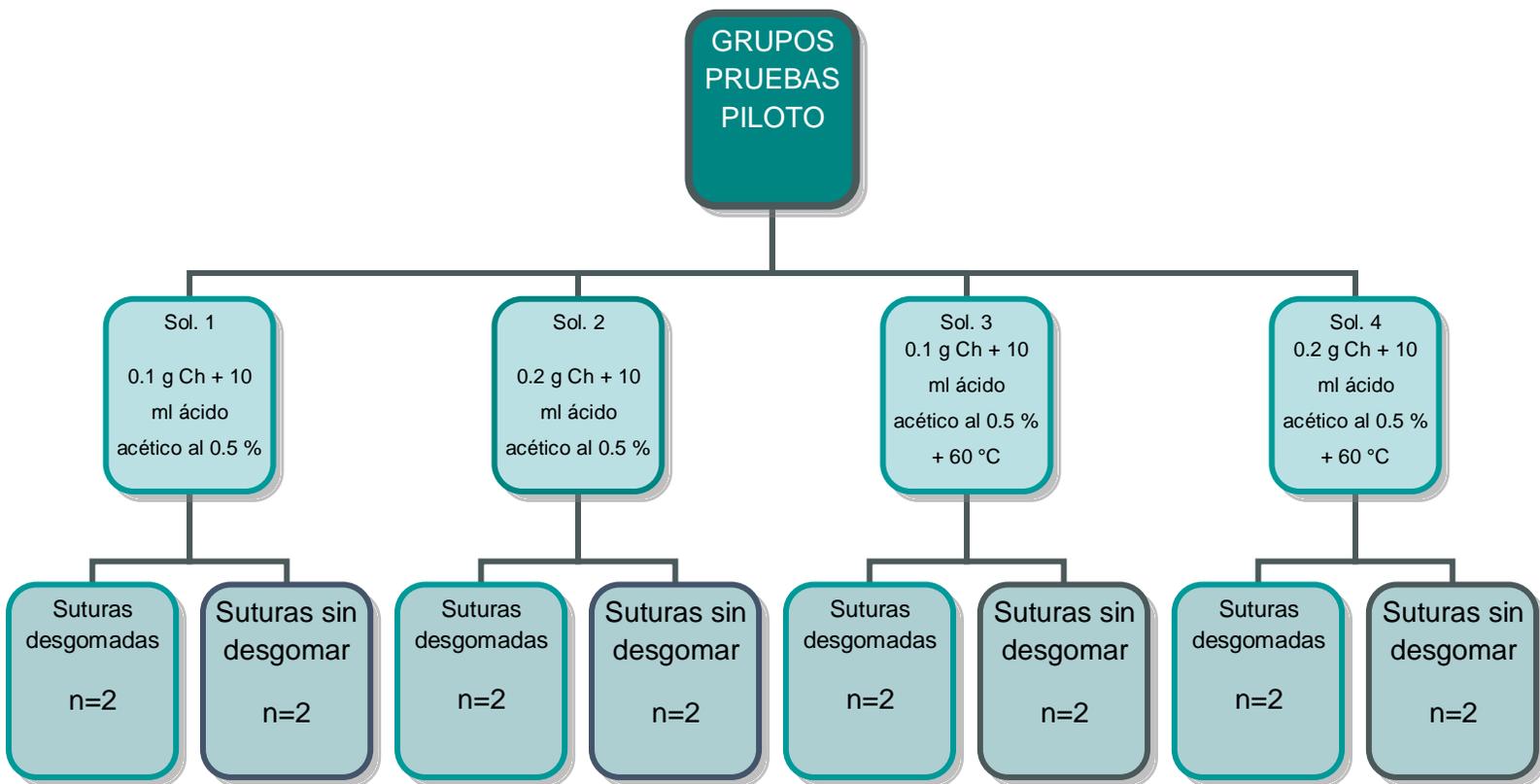


Figura 39. Esquematización de grupos de prueba piloto. Fuente: directa.



Por cada grupo se recubrieron dos muestras de seda, el primero con sutura sin desgomar y el segundo con suturas desgomadas (para la eliminación de sericina que las recubre) con el propósito de evaluar si este proceso aumenta la adhesión del quitosano en la superficie de la sutura.

Así mismo, se almacenó una muestra de cada grupo en diferentes medios. El primero se almacenó en tubos Eppendorf con solución de quitosano, mientras que el segundo se almacenó en una caja Petri sin ningún medio de dispersión.

El proceso de desgomado se llevó a cabo utilizando una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 10 % (10 g de NaOH, 90 ml de HO) a temperatura ambiente con ayuda de un agitador magnético por un periodo de 10 min, posteriormente se lavaron las suturas con H₂O destilada dentro de una tina ultrasónica (Branson 2510) durante 5 min. (62)

Se colocaron dos muestras de seda por cada grupo (desgomado y sin desgomar) en una caja de agar con capacidad de 20 ml, inoculada con *E. coli*, empezando por las dos muestras del grupo 1 y siguiendo su respectivo orden los siguientes grupos según las manecillas del reloj, de tal manera que quedaron acomodados de como se muestra en la figura 40.

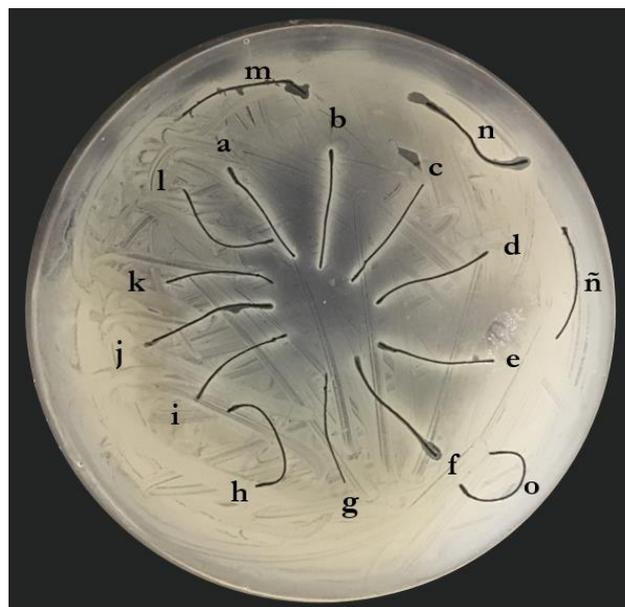


Figura 40. Caja de Petri con *S. aureus* y suturas de seda recubiertas con quitosano.

Fuente: directa



Grupo	Condiciones	Medio de almacenamiento	Sutura sin desgomadar	Zona de inhibición	Sutura desgomada	Zona de inhibición
1	0.1 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 %	Eppendorf	a	×	b	✓
		Caja de Petri	c	×	d	×
2	0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 %	Eppendorf	e	×	f	✓
		Caja de Petri	g	×	h	×
3	0.1 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C	Eppendorf	i	×	j	✓
		Caja de Petri	k	×	l	×
4	0.2 g Ch + 10 ml ácido acético al 0.5 % + 60 °C	Eppendorf	m	×	n	✓
		Caja de Petri	ñ	×	o	×

Con base en lo anterior, se decidió realizar las pruebas únicamente con suturas desgomadas, con 0.2 g. de quitosano y almacenar las suturas en la disolución de quitosano correspondiente, ya que fue lo que dio mejores resultados ante la generación de una posible zona de inhibición.