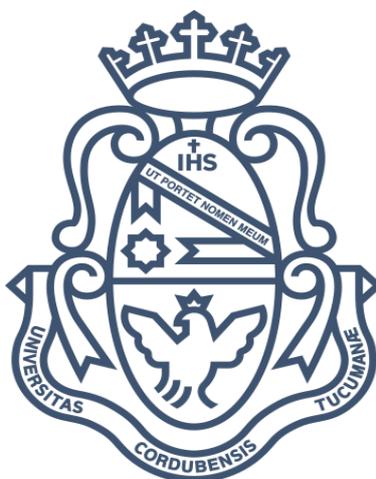


UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES  
INGENIERÍA BIOMÉDICA

PROYECTO INTEGRADOR

## DESARROLLO DE HIDROGELES DE ALGINATO PARA ÚLCERAS DIABÉTICAS



ALUMNAS

Elizondo, Silvana Gisel

Matrícula: 37628413

Mendoza, Debora Solange

Matrícula: 37882622

ASESOR

Nieva, Eduardo Gabriel

CO-ASESOR

Tavera Busso, Iván



Córdoba, diciembre de 2018

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por poner un día en nuestro corazón este gran sueño, que hoy se hace realidad.*

*A nuestra familia, que se esforzó para brindarnos lo mejor, por ser sostén cuando caíamos, por ser fuerza cuando nos inundaba la debilidad, por ser aliento cuando todo era desgano, por ser alegría en medio de tristezas y desilusiones, por festejar con nosotras cada logro.*

*A aquellas personas que pasaron por nuestra vida a lo largo de toda la carrera, a los que se fueron y a los que se quedaron, convirtiéndose en amigos y familia. Porque todas dejaron huellas, historias y aprendizaje. Sin ellas esto no sería posible.*

*A Iván y Eduardo, que con sus personalidades singulares y sus vastos conocimientos nos acompañaron, exigieron y enseñaron. Sin ellos esto hubiera sido un caos. Son personas hermosas, con un corazón inmenso. ¡Qué bueno fue cruzarnos con ustedes en este pedacito de vida!*

*A Fourier Nicanor, que nos salvó sin ser consciente, nos brindó amor sincero, alegría, compañía incondicional en cada día y noche de estudio. ¡Que seas eterno!*

*“En realidad, todo fue creado por Dios; todo existe por él y para él. Así que, ¡demos gracias a Dios por siempre!”*

*Rom. 11:36*

## RESUMEN

En el presente trabajo se propone el desarrollo de un hidrogel a base de alginato de sodio con capacidad bacteriostática e higroscópica. Tras un encuadre teórico, se describe, en primera instancia, el proceso de preparación general del hidrogel base y la selección de un acotado número de formulaciones a ensayar mediante el análisis de propiedades organolépticas y ensayos de difusión. Una vez determinada la formulación base, se realizó una caracterización mediante microscopía confocal con el fin de determinar la estructura microscópica del gel.

Para evaluar la capacidad bacteriostática se llevó a cabo un ensayo de concentración inhibitoria mínima, empleando cepas de *Escherichia coli* de referencia. Una vez optimizada la concentración del agente bacteriostático, se analizó la capacidad del hidrogel de absorber agua del medio mediante un ensayo de deshidratación con carbonato de magnesio. Tras obtener la composición final, se evaluó el desempeño reológico del hidrogel, debido a que, y dada su naturaleza funcional, el mismo será sometido a esfuerzos y deformaciones.

Por último, una vez obtenido el producto final se evaluó su biocompatibilidad según Norma ISO 10993, comprobando su potencial citotóxico e índice de irritación primaria.

## ABSTRACT

In the present work we proposed the production of a sodium alginate based-hydrogel with bacteriostatic and hygroscopic properties. After a theoretical introduction, we described the general process for the base-hydrogel manufacturing and the selection of a delimited number of formulations through organoleptic and diffusion properties. Then, a characterization by confocal microscopy was performed to determinate the microstructure of the gel. To evaluate the bacteriostatic capacity of an antimicrobial supplemented hydrogel, a minimal inhibitory concentration test was carried out employing a standard *Escherichia coli* strain. After the optimization of the bacteriostatic agent concentration, supplement the formula with magnesium carbonate and a water absorption capacity was performed. After obtaining a final composition, we test the rheological performance of the product, since due to its functional nature it would be subjected to efforts and changes. Finally, we checked its biocompatibility (cytotoxicity and primary irritation index) according to the 10993 ISO Standard.

## CONTENIDO

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>1 -</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>2 -</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3 -</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>1</b>
<b>Índice de Ilustraciones</b> .....	<b>4</b>
<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>6</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>8</b>
Objetivo General .....	8
Objetivos Específicos .....	8
<b>Capítulo 1 - Marco Teórico</b> -.....	<b>9</b>
1 - Diabetes: Fisiopatología y Clínica .....	9
1.1 - Anatomía del Páncreas.....	9
1.1.1 - Anatomía Funcional.....	9
1.1.2 - Páncreas Endócrino .....	10
1.1.3 - Homeostasis de la Glucosa.....	10
1.2 - Fisiopatología del Páncreas: Diabetes .....	11
1.2.1 - Patogenia de la DM Tipo 1 .....	12
1.2.2 - Patogenia de la DM tipo 2 .....	14
1.2.3 - Anatomopatología de la DM y Complicaciones Tardías .....	15
1.2.3.1 - Morfofisiopatología .....	16
1.2.3.2 - Macroangiopatía Diabética .....	17
1.2.3.3 - Microangiopatía Diabética.....	17
1.3. - Pie Diabético .....	18
1.3.1 - Definición .....	18
1.3.2 - Epidemiología .....	18
1.3.3 - Etiopatogenia.....	18
1.3.3.1 - Factores Predisponentes .....	19
1.3.3.2 - Factores Desencadenantes Ulceración .....	21
1.3.3.3 - Factores Agravantes .....	22
1.4 - Úlceras en Pie Diabético (UPD).....	22

1.4.1 - Tratamientos de UPD .....	23
1.4.1.1 - Tratamiento Físico: Selección del Apósito Óptimo .....	24
1.4.1.2 - Tratamientos con Agentes Tópicos.....	24
1.4.1.3 - Aplicación de Nuevas Terapias.....	25
2 - Hidrogeles .....	25
2.1 - Introducción.....	25
2.1.1 - Polímeros e Hidrogeles .....	26
2.1.2 - Clasificación de Hidrogeles .....	28
2.1.3 - Aplicaciones de Hidrogeles .....	29
2.1.4 - Alginato.....	30
2.1.4.1 - Estabilidad de los Alginatos Sólidos .....	30
2.1.4.2 - Estructura del Alginato .....	30
2.2 - Soluciones de Alginato: Hidrogel.....	32
2.2.1 - Propiedades.....	32
2.2.1.1 - Químicas .....	32
2.2.1.2 - Físicas .....	33
2.2.1.3 - Biológicas .....	37
2.2.2 - Formación de Hidrogel .....	38
2.2.3 - Estabilidad de las Soluciones.....	40
2.2.4 - Intercambio Iónico y Estabilidad.....	40
2.2.5 - Suplementos.....	40
2.2.5.1 - Agentes Antimicrobianos: Definición y Clasificación .....	40
2.2.5.2 - Agentes Higroscópicos.....	43
<b>Capítulo 2 - Materiales y Métodos -.....</b>	<b>45</b>
1 - Formulación de Hidrogel Base .....	45
1.2 - Análisis Cualitativo .....	46
1.3 - Análisis Cuantitativo.....	46
2 - Caracterización Microscópica .....	47
3 - Análisis Químico.....	47
3.1 - Ensayo de Difusión .....	47
3.2 - Ensayo de Capacidad Antiséptica .....	48
3.2.1 - Concentración Inhibitoria Mínima.....	48
3.2.2 - Ensayo de Difusión.....	50

3.3 - Ensayo de Capacidad Deshidratante .....	51
4 - Análisis Reológico .....	52
5 - Análisis de Biocompatibilidad.....	53
5.1 - Citotoxicidad.....	53
5.2 - Irritación.....	55
<b>Capítulo 3 - Resultados - .....</b>	<b>57</b>
1 - Formulación de Hidrogel Base .....	57
2 - Caracterización Microscópica .....	58
3 - Análisis Químico.....	60
3.1 - Ensayo de Difusión .....	60
3.2 - Ensayo de Capacidad Antiséptica .....	60
3.2.1 - Concentración Inhibitoria Mínima .....	60
3.2.2 - Ensayo de Difusión.....	61
3.3 - Ensayo de Capacidad Deshidratante .....	61
4 - Ensayo Reológico.....	64
5 - Análisis de Biocompatibilidad.....	67
5.1 - Citotoxicidad.....	67
5.2 - Irritación.....	68
6 - Análisis de Costos .....	69
<b>Conclusiones.....</b>	<b>71</b>
<b>Bibliografía y Referencias.....</b>	<b>73</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>76</b>
Anexo 1 - Tipos de Apósitos Disponibles para Heridas .....	76
Anexo 2 - Curvas de Calibración de Azul de Metileno.....	78
609 nm.....	78
651 nm.....	78
Anexo 3 - Escala de McFarland .....	79

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1	Configuración externa del páncreas.	9
Ilustración 2	Ubicación anatómica de la ampolla hepatopancreática o Ampolla de Vater.	10
Ilustración 3	Acción metabólica de la insulina.	11
Ilustración 4	Etapas en la evolución de la diabetes mellitus de tipo 1.	13
Ilustración 5	Desarrollo de la diabetes tipo 2.	15
Ilustración 6	Complicaciones de la diabetes a largo plazo.	16
Ilustración 7	Áreas de riesgo donde pueden aparecer lesiones y deformidades de los pies.	20
Ilustración 8	Desarrollo de úlceras por presión.	21
Ilustración 9	Monómeros del ácido algínico.	31
Ilustración 10	Bloques poliméricos de ácido manurónico y ácido gulurónico.	31
Ilustración 11	Cadenas de alginato mostrando los bloques de copolímeros M y G.	32
Ilustración 12	Interpretación gráfica del módulo complejo.	35
Ilustración 13	Espectro mecánico dinámico típico de una solución polimérica.	36
Ilustración 14	Ensayos a considerar según la clasificación del dispositivo médico.	37
Ilustración 15	Esquema del test de Citotoxicidad.	38
Ilustración 16	Estructura del gel de alginato de calcio.	39
Ilustración 17	Entrecruzamiento de alginato con iones calcio.	39
Ilustración 18	Balanza de precisión.	45
Ilustración 19	Hidrogel de alginato 4% p/p utilizado en el análisis cualitativo.	46
Ilustración 20	Preparación de hidrogeles en tubos de ensayo.	46
Ilustración 21	Esfera de hidrogel de alginato con azul de metileno.	48
Ilustración 22	Esquema de procedimientos del ensayo de CIM	50

Ilustración 23	Reómetro Rheoplus Physica MCR 301 (Anton Paar).	52
Ilustración 24	Software utilizado para la realización del ensayo.	53
Ilustración 25	Cámara de Neubauer	54
Ilustración 26	Modelo de siembra en P96	54
Ilustración 27	Ensayo de citotoxicidad	55
Ilustración 28	Lector de placas Thermo Cientific.	55
Ilustración 29	Ensayo de Irritación según ISO 10993-5.	56
Ilustración 30	Espesor de capa externa vs. tiempo.	58
Ilustración 31	Imagen del hidrogel de alginato base al 4% p/p.	59
Ilustración 32	Relación porcentual en función del tiempo analizado.	62
Ilustración 33	Relación de crecimiento en función del tiempo.	63
Ilustración 34	Relación de crecimiento de cada concentración de $MgCO_3$ vs. tiempo.	63
Ilustración 35	Velocidad de crecimiento en función del tiempo.	63
Ilustración 36	Gráfica de los diferentes $G'$ y $G''$ .	64
Ilustración 37	Módulo de almacenamiento vs. frecuencia angular.	65
Ilustración 38	Módulo de pérdida vs. frecuencia angular.	65
Ilustración 39	$\tan(\delta)$ vs. frecuencia angular.	66
Ilustración 40	Resultados de ensayo MTT.	67
Ilustración 41	Resultados del ensayo de citotoxicidad.	67
Ilustración 42	Ensayo de Irritación en las diferentes horas.	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de Meggit – Wagner.	22
Tabla 2	Clasificación de lesiones de pie diabético de la Universidad de Texas.	23
Tabla 3	Polímeros naturales, sintéticos y monómeros utilizados en la preparación de hidrogeles.	26
Tabla 4	Clasificación de las principales sulfamidas.	42
Tabla 5	Codificación del ensayo en caldo de cultivo.	50
Tabla 6	Codificación del ensayo en solución fisiológica.	50
Tabla 7	Caracterización cualitativa de hidrogeles con CaCl <sub>2</sub> 2,5 M.	57
Tabla 8	Caracterización cualitativa de hidrogeles con CaCl <sub>2</sub> 3 M.	57
Tabla 9	Tamaño de las células.	59
Tabla 10	Resultado de la CIM.	61
Tabla 11	ANOVA de las mediciones reológicas a 1 Hz.	66
Tabla 12	Puntuación de los signos de irritación registrados.	68
Tabla 13	Análisis de costos inherentes al proyecto.	69
Tabla 14	Detalle de composición y costo de producto final.	70

## INTRODUCCIÓN

Se define como pie diabético a toda infección, úlcera o destrucción tisular del pie asociada a neuropatía y/o enfermedad vascular periférica de miembros inferiores en personas con diabetes (IWGDF, 2015). Según la Sociedad Argentina de Diabetes, más del 5% de los diabéticos han presentado úlceras en los pies. Recientemente, se estima que la incidencia de úlceras de pie en personas con diabetes es cercana al 25%. De hecho, cada año aproximadamente 4 millones de personas con diabetes desarrollan una úlcera, de los cuales el 85% termina con amputaciones (SAD, 2009).

Dentro de los tratamientos de las úlceras de pie diabético, los apósitos juegan un papel preponderante. La mayoría de estos se han diseñado para crear un entorno húmedo en la herida y contribuir a la progresión hacia la curación de la misma. Debido a ello, en los últimos tiempos, los hidrogeles se han impuesto como los materiales que mejor se adaptan para tal función. De hecho, los hidrogeles han encontrado un amplio rango de aplicaciones en el ámbito de la ingeniería biomédica, entre los que se incluyen sistemas de liberación controlada de principios activos, ingeniería de tejidos, apósitos para heridas, lentes de contacto, etc.

En líneas generales, los hidrogeles son coloides constituidos por redes poliméricas de estructura tridimensional, capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Entre los polímeros naturales (biopolímeros) capaces de formar hidrogeles se destacan los alginatos, polisacáridos que pueden ser extraídos de ciertas especies de algas pardas marinas. Particularmente, la fuerte interacción electrostática del alginato con iones divalentes de tamaño reducido, como por ejemplo el  $\text{Ca}^{2+}$ , conduce a la formación de hidrogeles con excelentes propiedades (Avendaño Romero et al., 2013).

El presente Proyecto Integrador pretende formular un hidrogel de alginato de sodio que permita acelerar el proceso de regeneración de tejido sano en úlceras de pie diabético mediante la incorporación de diversos agentes, evaluando sus propiedades estructurales, físicas, químicas y biológicas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un hidrogel a base de alginato con capacidad higroscópica y bactericida para ser empleado en úlceras de pie diabético.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Formular hidrogeles base para ser enriquecidos con diversos agentes que permitan cumplir con el objetivo general planteado.
- 2) Evaluar las propiedades estructurales de los hidrogeles formulados y seleccionar uno para ser empleado como base del producto final en función del uso previsto.
- 3) Suplementar el hidrogel base seleccionado con agentes bactericidas e higroscópicos y evaluar sus propiedades químicas, físicas y biológicas.
- 4) Evaluar el comportamiento reológico de los hidrogeles suplementados.
- 5) Evaluar las propiedades citotóxicas e irritantes del producto final.
- 6) Realizar un breve análisis de costos, a fin de estimar la viabilidad económica del producto final.

# CAPÍTULO 1

## - MARCO TEÓRICO -

### 1 - DIABETES: FISIOPATOLOGÍA Y CLÍNICA

#### 1.1 - Anatomía del Páncreas<sup>1</sup>

El páncreas es una glándula mixta de forma alargada de derecha a izquierda, aplastada en sentido anteroposterior. Se relaciona estrechamente con el duodeno, que enmarca su cabeza en el extremo derecho. Está íntimamente relacionado con el conducto colédoco. La porción izquierda del páncreas se afina en forma progresiva en dirección del bazo. Se describen en el páncreas una cabeza, un cuello, un cuerpo y una cola (Ilustración 1).

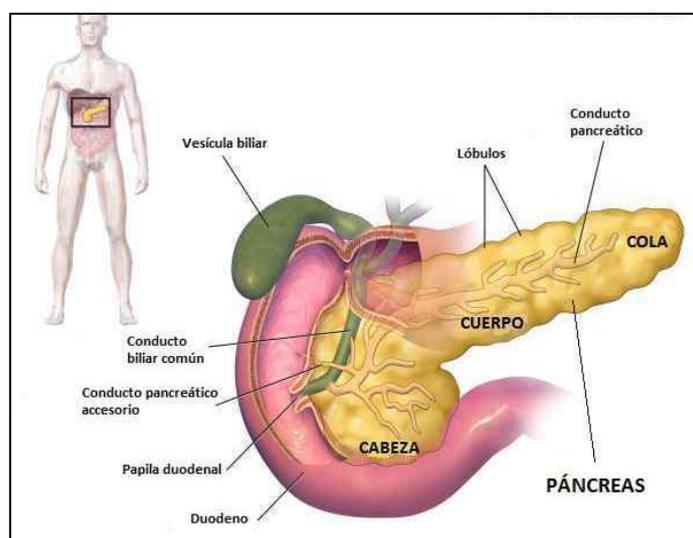


Ilustración 1 - Configuración externa del páncreas.<sup>2</sup>

#### 1.1.1 - Anatomía Funcional

La anatomía funcional macroscópica sólo revela la secreción externa de la glándula (páncreas exógeno), conducida al duodeno por los conductos excretores glandulares. La secreción se produce por reflejos suscitados por la llegada del quimo ácido al duodeno. La excreción es controlada por el músculo esfínter de la ampolla hepatopancreática, cuyo mecanismo delicado se opone al reflujo, no solo del contenido duodenal, sino también de la bilis, hacia el conducto pancreático.

<sup>1</sup> Latarjet M. y Ruíz Liard A. Anatomía Humana. Editorial Médica Panamericana. Barcelona (1993) Tomo II, pág 1410 - 1420

<sup>2</sup> Imagen obtenida de <https://cancersintomas.com/cancer-de-pancreas>. Última visita a la página: 02/09/2018

La secreción interna (páncreas endógeno), generadora de hormonas (glucagón, insulina, somatostatina, polipéptido pancreático) vierte su contenido en las venas tributarias de la vena porta hepática, por lo que la secreción interna del páncreas pasa, en primera instancia, por el hígado.

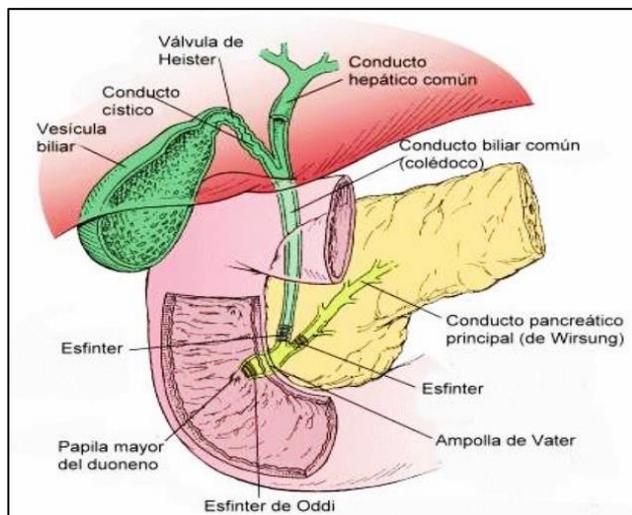


Ilustración 2 - Ubicación anatómica de la ampolla hepatopancreática o Ampolla de Vater.<sup>3</sup>

### 1.1.2 - Páncreas Endócrino

El páncreas endócrino tiene alrededor de un millón de agregados celulares denominados islotes de Langerhans, que contienen cuatro tipos principales y dos secundarios de células. Los cuatro tipos principales son células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP. Se distinguen por las características ultraestructurales de sus gránulos y por su contenido hormonal, lo cual hace que cada tipo presente una función diferente bien definida. Las células tipo  $\alpha$  secreta glucagón que produce hiperglucemia por su actividad glucogenolítica en el hígado; las células  $\beta$  producen insulina, hormona con actividad hipoglucemiante; las células  $\delta$  contienen somatostatina que suprime la liberación de insulina y de glucagón; y por último, las células PP secretan un polipéptido pancreático exclusivo con diversas acciones digestivas, tales como estimular la secreción de enzimas gástricas e intestinales e inhibir la motilidad intestinal.

Si bien las alteraciones del páncreas endócrino no suelen ser frecuentes, existen dos trastornos asociados que han sido ampliamente estudiados a lo largo de la historia: diabetes mellitus (DM) tipo 1 y carcinoma endocrino pancreático.

### 1.1.3 - Homeostasis de la Glucosa

La homeostasis de la glucosa está regulada de modo intensivo por tres procesos interrelacionados: producción hepática de glucosa, captación y

<sup>3</sup> Imagen obtenida de <https://esthernajeraw.blogspot.com/2013/04/?view=snapshot> Última visita a la página: 03/09/2018

utilización de glucosa por los tejidos periféricos y la acción las hormonas insulina y glucagón en la captación y el metabolismo de la glucosa.

La insulina y el glucagón tienen efectos reguladores opuestos en la homeostasis de la glucosa. Durante el ayuno una concentración baja de insulina y alta de glucagón facilitan la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepáticas y disminuyen la síntesis de glucógeno evitando así la hipoglucemia. Por tanto, la glucosa plasmática en ayunas está determinada principalmente por la secreción hepática de glucosa. Después de cada ingesta, la concentración de insulina sube y la de glucagón baja en respuesta a la carga de glucosa proveniente de la asimilación de nutrientes, promoviéndose la captación y utilización de la glucosa por los tejidos. Particularmente, el músculo estriado es el órgano principal sensible a la insulina y es esencial para evitar la hiperglucemia y mantener la homeostasis de la glucosa.

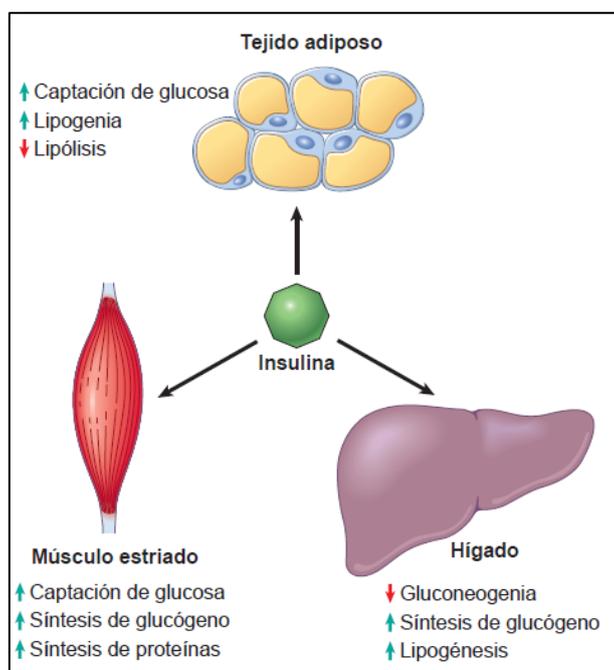


Ilustración 3 - Acción metabólica de la insulina en el músculo estriado, tejido adiposo e hígado.<sup>4</sup>

## 1.2 - Fisiopatología del Páncreas: Diabetes

La DM no es un ente patológico *per se* sino un grupo de trastornos metabólicos que comparten una característica común: la hiperglucemia. La hiperglucemia en la diabetes se debe a defectos en la secreción de la insulina, acción de misma o ambas. La hiperglucemia crónica y la alteración metabólica asociada pueden asociarse a daño secundario en múltiples sistemas de órganos como riñones, ojos, nervios y vasos sanguíneos.

<sup>4</sup> Imagen obtenida de Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 8va Edición. Año 2010. Pág. 1133

Aunque todas las formas de diabetes mellitus comparten la hiperglucemia como característica común, las anomalías implicadas en la aparición de la hiperglucemia son diversas. La gran mayoría de los casos de diabetes corresponden a dos clases principales diabetes: tipo 1 y tipo 2. La primera presentación clínica corresponde a una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por destrucción de la célula pancreática y por una deficiencia absoluta de insulina. Supone alrededor del 5 al 10% de todos los casos y es el subtipo más frecuente en los pacientes menores de 20 años. Por otra parte, la diabetes de tipo 2 está causada por una combinación de resistencia periférica a la acción de la insulina y de respuesta secretora inadecuada por las células pancreáticas (deficiencia relativa de insulina). Aproximadamente del 90 al 95% de los pacientes diabéticos sufren este tipo de diabetes y la inmensa mayoría de estas personas presentan sobrepeso. Aunque clásicamente se considera de inicio en la adultez, la prevalencia de diabetes de tipo 2 en niños y adolescentes está aumentando a un ritmo alarmante (Robbins y Cotran, 2010).

Es importante notar que, si bien ambos tipos de diabetes tienen mecanismos fisiopatológicos diferentes, las complicaciones a largo plazo son similares, y la morbimortalidad causadas por cada una suele ser contabilizadas por igual.

Si bien la *American Diabetes Association* ha determinado que los americanos nativos, afroamericanos e hispanos tienen 1,5 a 2 veces más probabilidad de sufrir diabetes a lo largo de su vida, la enfermedad no discrimina edad, sexo, fronteras o categorías sociodemográficas. La prevalencia de diabetes está aumentando bruscamente en el mundo industrializado conforme las personas adoptan un estilo de vida sedentaria e India y China son los principales responsables de la carga mundial de diabetes. De hecho, se espera que para el año 2030 366 millones personas en todo el mundo presente diabetes (Robbins y Cotran, 2010).

Respecto a la situación en nuestro país, la III Encuesta Nacional de Factores de Riesgo realizada en 2013 por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos informó que el 9,8% de los mayores de 18 años presentaba diabetes tipo 2. De acuerdo con el censo de 2011, eso se traduce en más de 2,7 millones de personas (INDEC, 2006).

### 1.2.1 - Patogenia de la DM Tipo 1<sup>5</sup>

La DM de tipo 1 es una enfermedad autoinmune en la que la destrucción de los islotes está causada principalmente por células efectoras inmunitarias que reaccionan contra antígenos de las células  $\beta$ , e igual que la mayoría de las enfermedades autoinmunes, la patogenia de la diabetes tipo 1 resulta de la interacción entre factores genéticas y ambientales.

Esta enfermedad se presenta con más frecuencia en la infancia, se manifiesta en la pubertad y avanza con la edad. La denominación “diabetes juvenil” se

---

<sup>5</sup> Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 8<sup>va</sup> Edición. Año 2010. Pág. 1131- 1146

considera obsoleta en la actualidad ya que puede afectar a personas de cualquier edad, incluso ancianos. De modo similar, el término “insulinodependencia” ha quedado en desuso ya que la dependencia de insulina no es un factor distintivo. No obstante, la mayoría de los pacientes con DM tipo 1 dependen de la insulina para sobrevivir ya que sin la misma padecen complicaciones metabólicas graves que pueden llevar a la cetoacidosis diabética (un cuadro caracterizado por el incremento de ácidos orgánicos) y coma. Es necesario mencionar que existe una forma idiopática de DM tipo 1 que no presenta evidencias de autoinmunidad.

Aunque el inicio clínico de la DM tipo 1 suele ser brusco, el proceso autoinmune comienza habitualmente muchos años antes de que la enfermedad se manifieste (Ilustración 4). De hecho, las manifestaciones clásicas de la enfermedad (hiperglucemia y cetosis) aparecen tarde en la evolución después de la destrucción de más del 90% de las células  $\beta$ .

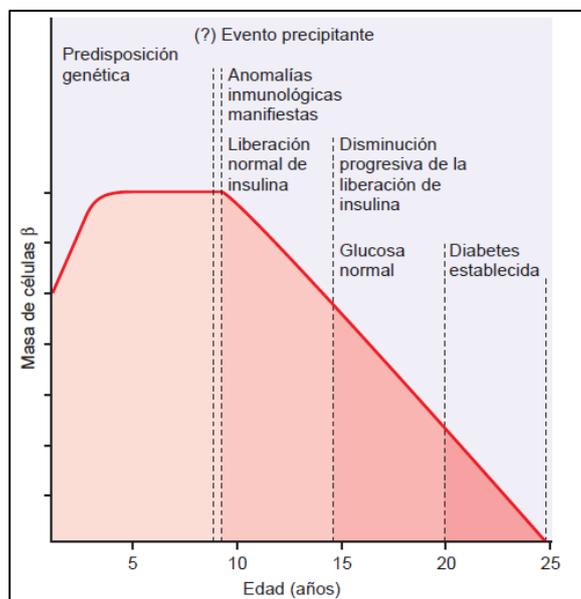


Ilustración 4 - Etapas en la evolución de la DM de tipo 1. Las etapas se presentan de izquierda a derecha y se muestra la masa hipotética de células respecto a la edad.<sup>6</sup>

La anomalía inmunitaria fundamental en este tipo de diabetes es un defecto de autotolerancia en los linfocitos T. Este defecto puede ser consecuencia de una combinación de delección clonal defectuosa de los linfocitos T autorreactivos en el timo, así como defectos en las funciones de los linfocitos T reguladores o resistencia de los linfocitos T efectores a la supresión por células reguladoras. Por tanto, los linfocitos T autorreactivos no sólo sobreviven, sino que están listos para responder a los autoantígenos. Se cree que la activación inicial de estas células tiene lugar en los ganglios linfáticos peripancreáticos en respuesta a los

<sup>6</sup> Imagen obtenida de Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 8va Edición. Año 2010. Pág. 1135

antígenos liberados por los islotes dañados. Así, los linfocitos T activados migran hacia el páncreas donde lesionan las células  $\beta$ . En este último proceso participan linfocitos T helper 1 ( $T_H1$ ), que causan lesiones mediante secreción de citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF, linfocitos T citotóxicos, que producen lisis celular por contacto directo. Más aun, se estima que existe una participación de anticuerpos, ya que se han encontrado autoanticuerpos contra los antígenos del islote en la inmensa mayoría de los pacientes con diabetes tipo 1, así como en familiares asintomáticos con riesgo de progresión a enfermedad establecida. De hecho, la presencia de anticuerpos contra la célula del islote es un marcador de predicción de la enfermedad. Sin embargo, no está claro si los autoanticuerpos producen la lesión o son un producto de la lesión del islote.

### 1.2.2 - Patogenia de la DM tipo 2<sup>7</sup>

La DM tipo 2 es una enfermedad compleja multifactorial prototípica. Es indudable la participación de factores ambientales, como un estilo de vida sedentario y los hábitos dietéticos. Sin embargo, también se encuentran implicados factores genéticos, lo cual queda demostrado a través de la concordancia de hasta un 60% en gemelos monocigóticos. Dicha concordancia es todavía mayor que en la diabetes de tipo 1. Más aún, el riesgo de padecer diabetes de tipo 2 es más del doble si ambos progenitores están afectados.

Si bien los eventos bioquímicos que conducen al establecimiento de la DM tipo 2 pueden ser múltiples (no lisis de somatomedina C, defectos en la secreción, alteraciones en los transportadores, ente otros), los dos defectos metabólicos que caracterizan la diabetes de tipo 2 son una respuesta alterada de los tejidos periféricos a la insulina (resistencia a la insulina) y disfunción de la célula  $\beta$  que se manifiesta por una secreción inadecuada de insulina en presencia de resistencia a la insulina y la hiperglucemia. La resistencia a la insulina precede a la hiperglucemia y suele estar asociada a una hiperfunción compensadora de la célula  $\beta$  e hiperinsulinemia en las fases iniciales de la evolución de la diabetes (Ilustración 5).

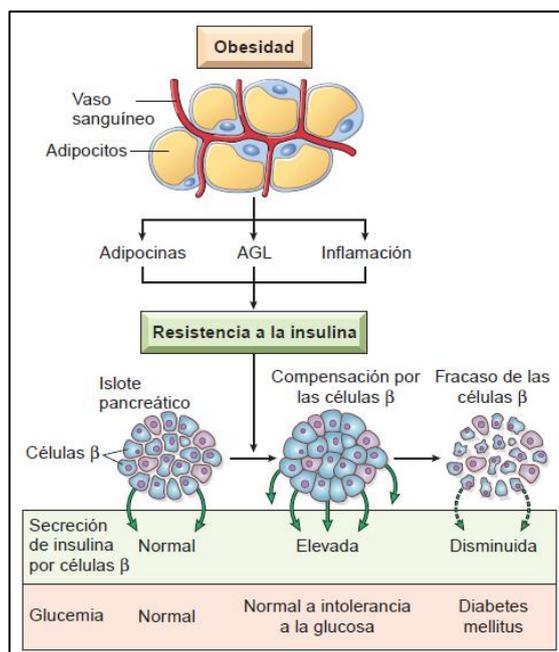
La resistencia a la insulina se define como un defecto en la respuesta de los tejidos diana a la insulina. El principal efecto es la disminución de la captación de glucosa en el músculo, reducción de la glucólisis y oxidación de los ácidos grasos en el hígado. Asimismo, se pierde la capacidad para suprimir la gluconeogénesis hepática.

Por otra parte, se produce un agotamiento de la capacidad de adaptación de las células  $\beta$  a las demandas prolongadas por la resistencia periférica a la insulina. Comparativamente, en estados de resistencia la secreción de insulina es más alta para cualquier concentración de glucosa. Este estado hiperinsulinémico es una compensación de la resistencia periférica y a menudo permite mantener una glucemia normal durante años. No obstante, con el correr

---

<sup>7</sup> Robbins y Cotran. *Op. Cit*

del tiempo la compensación de las células es inadecuada y se produce hiperglucemia.



*Ilustración 5 - Desarrollo de la diabetes tipo 2. La resistencia a la insulina asociada a obesidad está causada por adipocinas, ácidos grasos libres (AGL) e inflamación crónica del tejido adiposo. Las células β pancreáticas compensan la resistencia a la insulina mediante hipersecreción. No obstante, en algún momento la compensación de las células β se convierte en insuficiencia de las células β y aparece la diabetes.<sup>8</sup>*

Pocos factores tienen un papel tan importante en la aparición de la resistencia a la insulina como la obesidad. La asociación epidemiológica entre obesidad y DM tipo 2 es conocida desde hace décadas. La obesidad tiene efectos notables sobre la sensibilidad de los tejidos a la insulina y, por tanto, en la homeostasis sistémica de la glucosa. La resistencia a la insulina está presente incluso en la obesidad simple no asociada a hiperglucemia, lo que indica una anomalía fundamental de la señalización de la insulina. En consecuencia, el riesgo de diabetes aumenta al hacerle el índice de masa corporal (un indicador del contenido de grasa corporal). Esta condición, no sólo influye en la sensibilidad a la insulina, sino también la distribución de la grasa: la obesidad central (grasa abdominal) se asocia con mayor probabilidad a una resistencia a la insulina que los depósitos periféricos de grasa (glúteos/subcutáneos).

### 1.2.3 - Anatomopatología de la DM y Complicaciones Tardías

Los hallazgos anatomopatológicos en el páncreas son heterogéneos y no siempre llamativos. Los importantes cambios morfológicos están relacionados

<sup>8</sup> Imagen obtenida de Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 8va Edición. Año 2010. Pág. 1136

con las numerosas complicaciones sistémicas tardías de la diabetes. Existe gran variabilidad entre los pacientes en el momento de inicio de estas complicaciones, su gravedad y órganos afectados. En las personas con un control estricto de la enfermedad es posible retrasar el inicio. No obstante, en la mayoría de los pacientes es probable observar cambios morfológicos en las arterias (macroangiopatía), membranas basales de los pequeños vasos (microangiopatía), retina, nervios y otros tejidos (Ilustración 6). Estos cambios están presentes tanto en la diabetes tipo 1 como en la tipo 2.

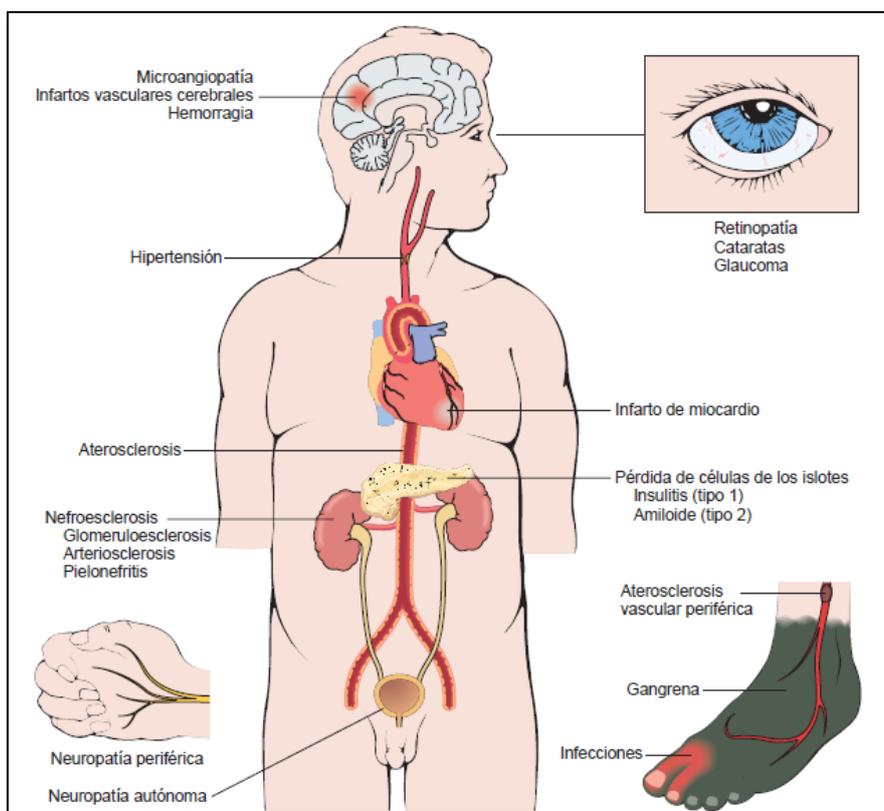


Ilustración 6: Complicaciones de la diabetes a largo plazo<sup>9</sup>

### 1.2.3.1 - Morfofisiopatología

Las lesiones en el páncreas son inconstantes y pocas veces tienen utilidad diagnóstica. Los cambios distintivos son más frecuentes en la diabetes tipo 1 que en la tipo 2. Pueden estar presentes una o más de las siguientes alteraciones:

- Reducción del número y tamaño de los islotes. Es más frecuente en la diabetes de tipo 1, sobre todo cuando la evolución es rápida. La mayoría de los islotes son pequeños y poco visibles.

<sup>9</sup> Imagen obtenida de Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 8va Edición. Año 2010. Pág. 1140.

- Infiltrados leucocitarios en los islotes formados principalmente por linfocitos T. Los infiltrados linfocíticos pueden estar presentes en los diabéticos tipo 1 en el momento de la presentación clínica. También puede haber infiltrados de eosinófilos.
- En la diabetes de tipo 2 puede haber una reducción ligera de la masa de células de los islotes.
- El depósito de amiloide en los islotes en la diabetes de tipo 2 comienza en y alrededor de los capilares y entre las células.
- El aumento del número y tamaño de los islotes es muy característico de los recién nacidos no diabéticos de madre diabética. Probablemente los islotes fetales sufren hiperplasia en respuesta a la hiperglucemia materna.

### 1.2.3.2 - Macroangiopatía Diabética

La diabetes provoca un daño considerable en el sistema vascular. La disfunción endotelial, que predispone a la aterosclerosis y a otras comorbilidades cardiovasculares, es generalizada como consecuencia de los efectos dañinos en el compartimento vascular de la hiperglucemia y de la resistencia a la insulina persistentes. La característica clave de la macroangiopatía diabética es la aterosclerosis acelerada que afecta a la aorta y a arterias de tamaño grande y mediano. Excepto por su mayor gravedad y aparición a edad más temprana, la aterosclerosis de la diabetes es indistinguible de la de las personas no diabéticas. La gangrena de las extremidades inferiores como consecuencia de una vasculopatía avanzada es unas 100 veces más frecuente en los diabéticos que en la población general. Las arterias renales grandes sufren también aterosclerosis intensa, aunque el efecto más dañino de la diabetes en los riñones se localiza en los glomérulos y en la microcirculación. La arterioloesclerosis hialina, la lesión vascular asociada a la hipertensión es más prevalente y pronunciada en los diabéticos que en los no diabéticos, aunque no es específica de la diabetes y puede afectar a personas ancianas no diabéticas sin hipertensión.

El infarto de miocardio por aterosclerosis de las arterias coronarias es la causa más frecuente de muerte en los diabéticos, e incluso los prediabéticos tienen un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular. De modo relevante, el infarto de miocardio es casi tan frecuente en las mujeres diabéticas como en los hombres diabéticos.

### 1.2.3.3 - Microangiopatía Diabética

Uno de los rasgos morfológicos más constantes de la diabetes es el engrosamiento difuso de las membranas basales. El engrosamiento es más evidente en los capilares de la piel, músculo estriado, retina y glomérulos. No obstante, también puede estar presente en estructuras no vasculares, como los túbulos renales, cápsula de Bowman, nervios periféricos y placenta. Esta hipertrofia resulta más preocupante si se tiene en cuenta que a pesar del

aumento de grosor de la membrana basal, los capilares diabéticos son más permeables que los normales a las proteínas plasmáticas.

La microangiopatía es responsable de la nefropatía diabética, retinopatía diabética y algunas formas de neuropatía diabéticas. En personas ancianas no diabéticas puede hallarse una microangiopatía similar a la de los pacientes con diabetes de larga evolución.

### 1.3. - Pie Diabético

#### 1.3.1 - Definición

Según el Consenso Internacional del Grupo Internacional de Trabajo sobre Pie Diabético se define como pie diabético a toda infección, úlcera o destrucción tisular del pie asociada a neuropatía y/o enfermedad vascular periférica de miembros inferiores en personas con diabetes<sup>10</sup>.

#### 1.3.2 - Epidemiología

El pie diabético es una seria complicación de la DM porque incrementa el riesgo de amputación y muerte a mediano y largo plazo. Si bien la sobrevivida a luego de una amputación mayor es del 50%, el 25% de las personas con diabetes desarrollarán una úlcera en el pie durante su vida, de las cuales un 10% a un 30% requerirán eventualmente una amputación (SAD, 2009). Se estima que la incidencia anual de úlcera de pie en los países en desarrollo es entre del 4 al 8% y se calculan que se producen 1,25 millones de amputaciones anuales en América Central y Sudamérica (IDF,2015). En nuestro país, el rango de amputaciones por pie diabético es del 45 al 75% de todas las causas de amputación (ALAD, 2010).

Con respecto al impacto económico, los costos de atención de personas con pie diabético comprenden entre el 12% y 15% del gasto total asignado a la atención de personas con diabetes, número que en países en desarrollo puede elevarse hasta el 40% (SAD, 2009).

#### 1.3.3 - Etiopatogenia

La vía causal que lleva a la ulceración y amputación del pie incluye varios componentes que actúan en conjunto con la polineuropatía diabética (PND) la cual puede afectar hasta el 50% de los individuos con DM mayores de 60 años.

La neuropatía sensitiva se comporta como el desencadenante de las lesiones a través de un traumatismo externo indoloro debido a la falta de las sensaciones protectoras (por ejemplo: bolsa de agua caliente, caminar descalzo, calzado inadecuado).

La neuropatía motora producirá el denominado traumatismo interno, responsable de la hiperpresión plantar que se evidencia a través de la

---

<sup>10</sup> IWGDF - International working group on the Diabetic Foot, I. (2015). IWGDF Guidance documents . Disponible en: <http://iwgdf.org/guidelines/>.

hiperqueratosis. Por último, juega un rol importante la neuropatía autonómica condicionando una piel fina, seca, atrófica y con fisuras, que facilita el ingreso de gérmenes y con ello la infección que agrava el pronóstico.

La entidad clínica del pie diabético es el síndrome resultante de la interacción de factores sistémicos y locales predisponentes sobre los que actúan factores desencadenantes. Estos factores, además de favorecer la aparición de lesiones preulcerativas y úlceras, junto a los factores agravantes, contribuyen a su perpetuación (Ministerio de Salud de la Nación, 2017).

#### 1.3.3.1 - Factores Predisponentes

Los factores predisponentes son aquellos factores que pueden ocasionar riesgo de sufrir alguna lesión en una persona con diabetes. Se dividen en neuropatía, enfermedad arterial periférica (EAP) y deformidades estructurales.

##### A) Neuropatía

La neuropatía diabética es la complicación crónica más frecuente de la diabetes. Incluye un heterogéneo grupo de condiciones, afecta a distintas partes del sistema nervioso y presenta diferentes manifestaciones clínicas. La neuropatía puede presentarse de manera asintomática hasta en el 50% de los casos. La hiperglucemia sostenida produce anormalidades moleculares por el aumento en la oxidación de glucosa y lípidos, generando así la formación de productos avanzados de la glicación y estrés mitocondrial. Las lesiones fundamentales de la neuropatía son la degeneración axonal y la desmielinización segmentaria.

La polineuropatía diabética (PND) distal y simétrica (periférica) es la neuropatía que se presenta con más frecuencia en las personas con diabetes. Se define por la presencia de síntomas y/o signos de disfunción nerviosa periférica, luego de excluir otras causas. Su prevalencia oscila entre el 16 y el 66%.<sup>11</sup> Los principales factores de riesgo asociados a la neuropatía periférica son: hiperglucemia, estatura elevada, tabaquismo, hipertensión arterial, sobrepeso y dislipemia. La polineuropatía diabética es el factor de riesgo aislado más importante para el desarrollo de úlceras de pie diabético (SAD, 2009).

##### A-1) Neuropatía Sensitiva

Según sea la afección de fibras y el momento evolutivo de la enfermedad, puede presentarse de forma hiperalgésica (hormigueos, ardor, alodinia, hiperestesia) o anestésica (pérdida del dolor, entumecimiento, insensibilidad a la presión, temperatura y propiocepción). La falta de sensación de dolor hace que los pacientes, en reiteradas oportunidades, consulten por una lesión ya establecida, disminuyendo las posibilidades de prevención.

##### A-2) Neuropatía motora

---

<sup>11</sup> IDF - International Diabetes Federation. (2017). Clinical Practice Recommendation on the Diabetic Foot: A guide for health care professionals. IDF\_DF\_Foot\_CPR\_2017\_Final.pdf

Produce la debilidad y atrofia de los músculos de la pierna, altera la presión plantar con aumento de la presión en cabeza de los metatarsianos y marcha anormal (SAD, 2009). Se genera la flexión de las articulaciones interfalángicas y la hiperextensión de las metatarsofalángicas. El desbalance muscular resulta en deformidades que alteran las propiedades biomecánicas del pie lo que condiciona aumento del estrés. En consecuencia, aparecen sobre la zona plantar puntos de riesgo para el desarrollo úlceras (Ilustración 7). En presencia de dedos en garra u otras protrusiones óseas como *hallux valgus* pueden aparecer úlceras por presión o fricción, en dorso o planta de los dedos.

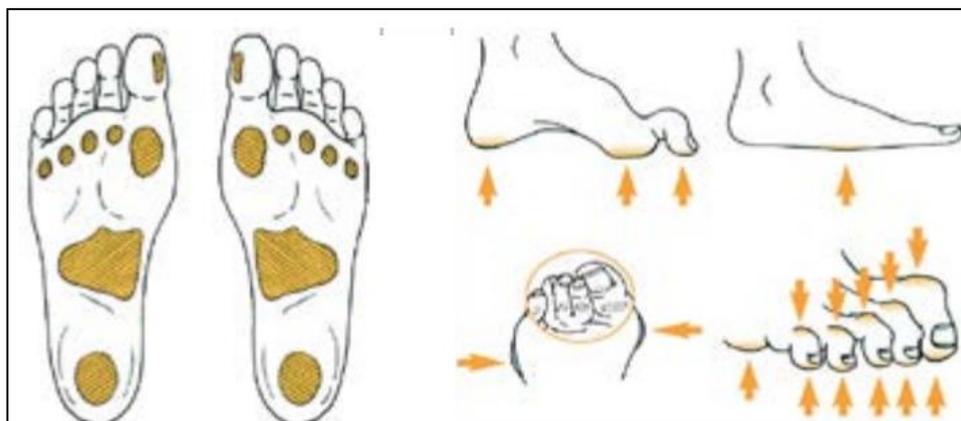


Ilustración 7 - Áreas de riesgo donde pueden aparecer lesiones y deformidades de los pies que deben rastrearse en el examen físico.<sup>12</sup>

### A-3) Neuropatía autonómica

El sistema nervioso autónomo controla la vasodilatación y vasoconstricción de los vasos sanguíneos. En las personas con diabetes su disfunción se relaciona con la depleción de óxido nítrico. La neuropatía autonómica condiciona una piel fina, seca, atrófica y con fisuras, que facilita el ingreso de gérmenes y con ello la infección, lo cual agrava el pronóstico. Hay aumento del flujo sanguíneo por la apertura de los *shunts* arteriovenosos, que provoca distensión de venas dorsales del pie, con aumento de la temperatura y edema. Se produce un signo semiológico característico, el pie caliente, insensible y seco.

### B) Enfermedad Arterial Periférica

La EAP se define como una enfermedad arterial aterosclerótica oclusiva por debajo del ligamento inguinal, resulta en una reducción del flujo sanguíneo en miembros inferiores.<sup>13</sup> La EAP es la principal causa de alteraciones isquémicas en las personas con diabetes. En presencia de DM, se desarrolla de una forma más rápida y precoz. La EAP, con o sin un traumatismo, puede causar una úlcera de pie generalmente dolorosa e isquémica. Además, es condicionante de

<sup>12</sup> Imagen obtenida de Ministerio de Salud de la Nación – Prevención y cuidados del pie en personas con diabetes – pág 19.

<sup>13</sup> IWGDF - International working group on the Diabetic Foot, I. (2015). *Op. Cit.*

cicatrización de heridas. Está producida por alteraciones de las arterias de mediano y gran calibre de los miembros inferiores (macroangiopatía), en tanto que la microangiopatía tiene un papel secundario en la aparición de la isquemia en el pie diabético (Ministerio de Salud de la Nación, 2017).

### C) Deformidades Estructurales

La hiperglucemia favorece la glicosilación del colágeno en articulaciones, tejidos blandos y piel afectando la movilidad articular, lo que conlleva a una alteración en la biomecánica del pie con aumento de la presión plantar y de las fuerzas de fricción (Ilustración 8). A causa de la pérdida de la sensación de dolor, este aumento de la presión o de la fricción no es percibido por la persona y al no tomar medidas de protección o preventivas, se produce la aparición de hiperqueratosis (SAD, 2009).

La hiperqueratosis condiciona el desarrollo de callos o helomas que se comportan como un cuerpo extraño sobre la superficie cutánea lo cual incrementa la presión local. En consecuencia, se puede desarrollar una úlcera, generalmente precedida por una hemorragia subcutánea (IWGDF, 2015).

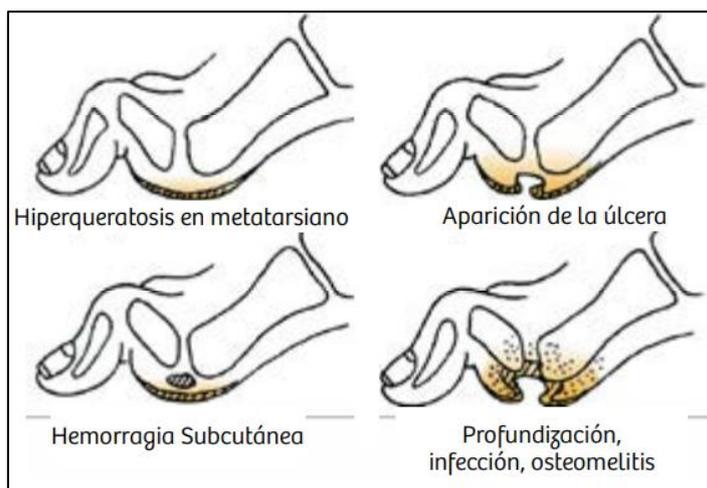


Ilustración 8 Desarrollo de úlceras por presión<sup>14</sup>

### 1.3.3.2 - Factores Desencadenantes Ulceración

Son aquellos factores que aceleran el inicio de la lesión. Pueden ser catalogados en:

- 1) Traumatismos extrínsecos: Se dividen según la causa en mecánicos, térmicos y químicos. El traumatismo mecánico se suele producir a causa de calzados mal ajustados y aparece como el factor precipitante más importante, llegando a ocasionar hasta el 50% de nuevos casos de todos los tipos de úlcera. El traumatismo térmico generalmente se produce al

<sup>14</sup> Imagen obtenida de Ministerio de Salud de la Nación – Prevención y cuidados del pie en personas con diabetes – pág 21

introducir el pie en agua a temperatura excesivamente elevada; usar mantas eléctricas o bolsas de agua caliente, dejar los pies cerca de una fuente de calor o no proteger los pies adecuadamente a temperaturas bajas. El traumatismo químico suele producirse por el uso inadecuado de agentes queratolíticos, cuyo máximo exponente es el ácido salicílico (Del Castillo Tirado et al., 2014).

- 2) Traumatismos intrínsecos: Corresponden a las úlceras que se producen en las superficies donde se ejerce presión al caminar, como la cabeza de los metatarsianos y el talón, consecuencia de las deformidades estructurales. La presión plantar es un factor etiológico mayor en las úlceras de pie y a menudo aparece antes que la neuropatía clínica.

### 1.3.3.3 - Factores Agravantes

Son aquellos factores que retardan la cicatrización. Se dividen en:

- 1) Isquemia subclínica
- 2) Necrosis tisular
- 3) Infección progresiva

## 1.4 - Úlceras en Pie Diabético (UPD)

Existen diversos tipos y grados de úlcera diabética según la afectación del pie. De forma habitual las úlceras están localizadas en la planta del pie y rara vez en el dorso. La clasificación más usada es la Escala de Wagner (Del Castillo Tirado et al., 2014), que fue descrita por primera vez en 1976 por Meggitt pero fue popularizada por Wagner en 1981. Este sistema consiste en la utilización de 6 categorías o grados (Tabla 1).

GRADO	LESIÓN	CARACTERÍSTICAS
0	Ninguna, pie de riesgo	Callos gruesos, cabezas de metatarsianos prominentes, dedos en garra, deformidades óseas.
I	Úlceras superficiales	Destrucción del espesor total de la piel.
II	Úlceras profundas	Penetra la piel grasa, ligamentos pero sin afectar hueso, infectada.
III	Úlceras profundas más absceso (osteomielitis)	Extensa y profunda, secreción, mal olor.
IV	Gangrena limitada	Necrosis de una parte del pie o de los dedos, talón o planta.
V	Gangrena extensa	Todo el pie afectado, efectos sistémicos.

Tabla 1 - Clasificación de Meggitt – Wagner

Posterior a la clasificación de Wagner-Meggitt surge la clasificación de Texas (Escala Texas), siendo a la fecha la más popular de las clasificaciones de lesiones de pie diabético. Desarrollada en la *University of Texas Health Science Center* de San Antonio fue la primera clasificación de tipo bidimensional. La escala fue diseñada por Lavery y Armstrong en 1996 y posteriormente validada en 1998. Es un sistema de clasificación donde las lesiones son estudiadas en base a dos criterios principales: profundidad y existencia de infección/isquemia. De esta forma el eje horizontal de la tabla se ocupa del parámetro profundidad, otorgándole cuatro grados (desde el grado 0 al grado 3) y el eje vertical se ocupa del parámetro infección/isquemia, clasificando este parámetro mediante la asignación de cuatro letras (A-no presencia de infección o isquemia, B-presencia de infección, C-presencia de isquemia, D-presencia de infección e isquemia) (González de la Torre, 2012)

ESTADIO	GRADO			
	0	I	II	III
A	Lesiones pre o postulcerosas completamente epitelizadas	Herida superficial, no involucra tendón, cápsula o hueso	Herida a tendón o cápsula	Herida penetrante a hueso o articulación
B	Infectada	Infectada	Infectada	Infectada
C	Isquémica	Isquémica	Isquémica	Isquémica
D	Infectada e Isquémica	Infectada e Isquémica	Infectada e Isquémica	Infectada e Isquémica

Tabla 2 - Clasificación de lesiones de pie diabético de la Universidad de Texas.

#### 1.4.1 - Tratamientos de UPD

El objetivo principal del tratamiento de UPD es el cierre de la herida. Los componentes esenciales del tratamiento son (Chadwick et al., 2013) tratar los procesos patológicos subyacentes, garantizar una irrigación sanguínea adecuada, cuidado local de la herida, incluido el control de infecciones, y descarga de presión.

La *European Wound Management Association* afirma que, en el cuidado de heridas en UPD, debe hacerse hincapié en un desbridamiento radical y repetido, una inspección frecuente y en el control bacteriano, así como en el equilibrio en la humedad para evitar la maceración. El documento que describe la preparación del lecho de la herida sugiere el siguiente esquema, denominado TIME, para el tratamiento de UPD:

- Desbridamiento de tejido.

- Control de la inflamación y de la infección.
- Equilibrio de la humedad (selección del apósito óptimo).
- Avance de los bordes epiteliales.

#### 1.4.1.1 - Tratamiento Físico: Selección del Apósito Óptimo

La mayoría de los apósitos se han diseñado para crear un entorno húmedo en la herida y contribuir a la progresión hacia la curación de la misma. La curación húmeda de la herida tiene la posibilidad de abordar múltiples factores que afectan a su mejoría y conlleva el mantenimiento de un entorno equilibrado en la herida que no sea ni demasiado húmedo ni demasiado seco. Los apósitos que contribuyen a tratar el exudado de la herida de forma óptima y a fomentar un entorno equilibrado son vitales para mejorar los pronósticos. Sin embargo, un apósito que podría ser idóneo en heridas con otras etiologías puede ser totalmente inapropiado en determinadas UPD. De hecho, el apósito seleccionado puede tener un efecto considerable en el resultado y, debido a la complejidad cambiante de las UPD, no existe un único apósito que sea adecuado en todos los escenarios.

La revisión periódica de las heridas y del apósito por parte del paciente es fundamental. En el caso de heridas infectadas o con una elevada exudación, un profesional sanitario debe inspeccionar la herida y cambiar el apósito diariamente, y a continuación cada dos o tres días una vez se haya estabilizado la infección. Incluso puede ser necesario un tipo diferente de apósito conforme cambie el estado de la herida (Anexo 1). Paralelamente, debe aconsejarse a los pacientes el uso de una técnica aséptica, y debe continuarse con la revisión de la herida a intervalos regulares por parte del equipo multidisciplinar para el cuidado del pie u otros miembros del equipo sanitario.

#### 1.4.1.2 - Tratamientos con Agentes Tópicos

Las úlceras del pie diabético deben limpiarse con suero fisiológico en cada cura, procurando eliminar bien los restos de exudado y secando después para evitar que la herida se macere. Lo ideal es realizar esta limpieza mediante irrigación, con una fuerza lo suficientemente fuerte para que arrastre los microorganismos y parte del tejido desvitalizado presente en el lecho, pero sin dañarle.

Asimismo, en el caso de las úlceras infectadas puede estar indicado el uso de antimicrobianos tópicos además de antibióticos de acción sistémica, fundamentalmente en los casos en los de úlceras cronicadas y cuando la afectación vascular comprometa la llegada de los antibióticos sistémicos a la zona de la úlcera. Estos antimicrobianos incluyen tanto antisépticos como antibióticos de uso tópico. Los antimicrobianos más usados en estas úlceras son los productos con plata, el yodo y la miel (Rincón Martín, 2015).

### 1.4.1.3 - Aplicación de Nuevas Terapias

#### A) Factores de Crecimiento y Plasma de Forma Tópica

En los últimos años se ha estudiado la utilidad de la aplicación tópica de distintos productos que contienen factores de crecimiento para la curación de las úlceras del pie diabético. Entre los productos que demostraron mayor eficacia en mostrando mejores resultados en cuanto a porcentaje de úlceras curadas y disminución del tiempo de cicatrización se encuentran la becaplermina (Regranex®), un gel fabricado con factores de crecimiento derivados de plaquetas, y algunos productos fabricados a partir de plasma, cuyo uso se basa en aprovechar las elevadas concentraciones de factores de crecimiento que posee.

#### B) Terapia con Presión Negativa

Esta terapia consiste en la aplicación de un flujo de presión subatmosférica en el lecho de la herida, de modo que se favorece la aproximación de los bordes epiteliales, la disminución del edema y la retirada del exudado, al mismo tiempo que se mejora la perfusión tisular. Por otra parte, puede usarse para retirar mediante la presión negativa soluciones tópicas (suero y agentes antimicrobianos) que pueden ser aplicados a la herida.

#### C) Oxigenoterapia Hiperbárica

Consiste en el uso de una cámara con una presión significativamente superior a la atmosférica para administrar oxígeno al paciente, de tal manera que se incrementa la oxigenación de los tejidos hipóxicos del lecho de la herida, favoreciendo así la angiogénesis, la actividad fibroblástica y la síntesis de colágeno. Permite, además, disminuir el edema subyacente y reducir la carga bacteriana de las úlceras

#### D) Terapia Electrofísica

Este tipo de terapéutica engloba distintas terapias en las que se usa energía eléctrica, ultrasonidos, láser o fuentes electromagnéticas, con el objetivo de provocar pequeños estímulos en el organismo que podrían ayudar en la curación de las heridas al actuar sobre la síntesis de colágeno, favorecer el reclutamiento de factores de crecimiento y citoquinas y promover la migración celular (Rincón Martín, 2015).

## 2 - HIDROGELES

### 2.1 - Introducción

Los hidrogeles pueden definirse como sistemas coloidales compuestos por uno o varios polímeros hidrófilos cuyas cadenas están entrecruzadas por uniones físicas o químicas formando una red tridimensional. Se caracterizan principalmente por su capacidad para captar fluidos acuosos del medio que los rodea hinchándose hasta el equilibrio (Martínez, 2016).

### 2.1.1 - Polímeros e Hidrogeles

El conocimiento de los polímeros constituye uno de los pilares fundamentales para el estudio de las propiedades y características de los hidrogeles. Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión repetida de una o varias moléculas unidas por enlaces covalentes. Estas moléculas se denominan monómeros y las reacciones a través de las cuales se obtienen se denominan reacciones de polimerización. Cuando se parte de un sólo tipo de molécula se habla de homopolímero. Cuando son dos o más moléculas diferentes las que se repiten en la cadena se nomina copolimerización, comonómeros y copolímero. Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser naturales o sintéticos. La Tabla 3 resume algunos ejemplos de polímeros usados en la síntesis de hidrogeles.

CLASIFICACIÓN	NATURALES	SINTÉTICOS
Aniónicos	Ácido hialurónico Carboximetilcelulosa Carragenina Sulfato de condroitina Xantano	Poli(ácido acrílico) Poli(ácido metacrílico)
Catiónicos	Quitósán Polilisina	Poliamidoamina Polietilenamina Polietilenimina Polivinilamina
No Iónicos	Metilcelulosa Etilcelulosa Hidroxietilcelulosa Hidroxipropilcelulosa Manano Pululano Goma guar Goma garrofín	Poli(etilenglicol) Poli(glicidol) Poli(hidroxitbutirato) Poloxámero Alcohol/Acetato de polivinilo
Otros	-	Poli(ácido láctico) Poli(ácido glicólico) Poli(caprolactona) Poli(vinilcaprolactona) Polidimetilsiloxano Poliestireno

Tabla 3 - Polímeros naturales, sintéticos y monómeros utilizados en la preparación de hidrogeles.

Los hidrogeles basados en polímeros naturales pueden tener propiedades mecánicas no óptimas y pueden contener patógenos (según la fuente de obtención) o provocar respuestas inmunes e inflamatorias, pero ofrecen ventajas

frente a los polímeros sintéticos debidas a sus inherentes propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y reconocimiento biológico celular. En contraste, los polímeros sintéticos no poseen estas propiedades bioactivas, pero presentan una estructura bien definida que puede modificarse para lograr determinada funcionalidad y controlar su biodegradabilidad.

En general, los polisacáridos son biocompatibles, no tóxicos y tienen propiedades fisicoquímicas que los hacen adecuados para distinto tipo de aplicaciones, como sistemas de liberación de fármacos, encapsulación de células vivas para ingeniería tisular, etc. Por otra parte, los polisacáridos son abundantes y fácilmente obtenibles a partir de fuentes renovables, como algas, plantas, cultivos de cepas microbianas seleccionadas, así como a través de técnicas de ADN recombinante. Debido a esto, los polisacáridos presentan una gran variedad de composiciones y propiedades que no son fácilmente imitables en un laboratorio. Mas aun, su fácil producción hace que muchos de ellos sean más baratos que los polímeros sintéticos (Martínez, 2016).

En cuanto a los hidrogeles, éstos se definen como redes poliméricas tridimensionales obtenidas a partir de polímeros hidrófilos que pueden absorber y retener una cantidad significativa de agua. Esta capacidad de hinchamiento les permite hidratarse hasta el equilibrio en presencia de un exceso de agua, siendo este equilibrio el resultado de un balance entre hidratación y fuerzas elásticas. La naturaleza hidrófila se debe a la presencia de grupos funcionales polares en su estructura tales como -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -CONH-, -SO<sub>3</sub>H. En un ambiente acuoso, estos grupos hidrófilos se hidratan sin que se disuelva el hidrogel debido al entrecruzamiento entre las cadenas de polímero.

Estos sistemas presentan una serie de propiedades óptimas para su aplicación en el campo biomédico tales como (Hoffman, 2002):

- Alto contenido en agua lo cual los hace altamente compatibles con la mayoría de los tejidos vivos.
- Naturaleza blanda y elástica que minimiza la irritación de los tejidos.
- Superficie hidrófila que origina una baja tensión interface en contacto con fluidos biológicos, lo que contribuye a una reducción de la adherencia de las proteínas y las células a esta superficie.
- Estructura altamente porosa que puede modularse mediante el control de la densidad de reticulación. Esta porosidad constituye un reservorio con alta capacidad de carga de activos terapéuticos (fármacos, proteínas, etc.) que le permite protegerlos de la degradación ambiental y posteriormente liberarlos por diferentes mecanismos.
- Capacidad de hinchamiento que proporciona alta permeabilidad para fármacos y metabolitos de bajo peso molecular.

Los hidrogeles poseen, a su vez, múltiples ventajas como sistemas de liberación modificada de fármacos en biomedicina y como matrices en ingeniería tisular, entre las que se encuentran:

- Mantenimiento de niveles plasmáticos terapéuticos durante más tiempo debido a la liberación prolongada.
- Selectividad terapéutica.
- Protección de las mucosas frente a fármacos irritantes.
- Reducción de la dosis administrada debido a un mayor aprovechamiento del fármaco.
- Disminución de los efectos secundarios.
- Mejora de la adherencia terapéutica de los pacientes.
- Menor costo terapéutico por paciente debido a que se requieren menos unidades de dosificación.
- Reducción de la pérdida de fármaco cuando el metabolismo de primer paso es elevado.
- Capacidad de transporte de nutrientes a las células y otros productos desde las células.
- Protección frente a la degradación ambiental y enzimática de fármacos, péptidos, proteínas, oligonucleótidos y material genético.
- Posibilidad de cambio de estado líquido/gel (temperatura ambiente/temperatura fisiológica) lo que permite su administración mediante inyección *in vivo* (hidrogeles termosensibles).

### 2.1.2 - Clasificación de Hidrogeles

Los hidrogeles se pueden clasificar de varias formas en función de distintos criterios:

- Tipo de Entrecruzamiento: se distinguen hidrogeles reticulados física y químicamente. Los hidrogeles físicos son reversibles y están formados por enlaces no covalentes. En cambio, los químicos son más estables e irreversibles y se forman por enlaces covalentes entre las cadenas de polímero.
- Tamaño: se pueden distinguir hidrogeles macroscópicos, microgeles o nanohidrogeles.
- Sensibilidad a los Estímulos: existen hidrogeles no sensibles a estímulos, que se hinchan por absorción de agua sin responder a cambios del ambiente, e hidrogeles sensibles a estímulos o hidrogeles inteligentes que se hinchan en respuesta a alteraciones sutiles del medio ambiente como temperatura, pH, fuerza iónica, luz, campo eléctrico o presencia de biomoléculas.
- Carga: los hidrogeles pueden ser no iónicos, catiónicos, aniónicos o anfóteros, según los grupos funcionales presentes en los polímeros que los constituyen.
- Degradabilidad: existen hidrogeles biodegradables o no biodegradables. En el campo de la biomedicina los materiales biodegradables son muy útiles ya que no requieren cirugía para su extracción.

- Origen: como se mencionó previamente, los hidrogeles pueden ser naturales o sintéticos.
- Método de Preparación: pueden ser homopolímeros, copolímeros o hidrogeles interpenetrados o semi-interpenetrados. Los hidrogeles homopoliméricos están formados por un solo tipo de monómeros; los copoliméricos por dos o más monómeros diferentes con al menos un componente hidrófilo dispuesto de forma aleatoria, alterna o en bloque a lo largo de las cadenas del polímero (Martínez, 2016).

### 2.1.3 - Aplicaciones de Hidrogeles

- Liberación de Fármacos: las formas farmacéuticas de liberación convencional son preparaciones en las que la liberación de la sustancia o sustancias activas no está deliberadamente modificada por un diseño de formulación particular ni por un método de fabricación especial. En contraste, las formas farmacéuticas de liberación controlada logran una concentración terapéutica estable en el tiempo sin la necesidad de recurrir a administraciones sucesivas. A su vez, permiten una liberación dirigida a dianas terapéuticas o lugares específicos.
- Ingeniería Tisular: consiste en la mejora o sustitución de tejidos u órganos específicos utilizando materiales de ingeniería y estrategias sintéticas. Los hidrogeles son materiales extremadamente útiles en este campo debido a sus características de porosidad, consistencia blanda, alto contenido en agua y capacidad de respuesta, además susceptibles de ser empleados en impresión 3D. Se emplean principalmente como andamios celulares.
- Apósitos para Heridas: los hidrogeles concentran la mayoría de las condiciones que debe reunir un apósito "ideal": absorber el exceso de exudado y toxinas, mantener una buena humedad entre la herida y el apósito, preservar la herida de fuentes externas de infección, prevenir el exceso de calor, tener una adecuada permeabilidad a los gases, ser suministrado completamente estéril y ser fácil de quitar sin causar mayor traumatismo en la herida. Los hidrogeles pueden absorber y retener el exudado contaminado en su interior a través de la expansión de cadenas de polímero reticulado favoreciendo el aislamiento de bacterias, detritos y moléculas de olor en el líquido. Su alto contenido de agua permite mantener la humedad en la herida, favoreciendo la transmisión de vapor y el oxígeno necesario a las heridas y el desbridamiento autolítico (que facilita la eliminación del tejido muerto) (Martínez, 2016).
- Lentes de contacto
- Productos de higiene

#### 2.1.4 - Alginato

Los alginatos son los polisacáridos más abundantes presentes en las algas marinas, comprendiendo hasta un 40% de su peso seco. Son los componentes estructurales de la pared celular cuya función principal es dar rigidez, elasticidad, flexibilidad y capacidad de enlazar agua. Los alginatos son extraídos principalmente de tres especies de algas marrones. Éstas incluyen *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. En su estado natural, los alginatos se presentan como una mezcla de sales de los cationes que comúnmente se localizan en el agua de mar, principalmente  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+}$ . Las proporciones en las que estos iones están unidos al alginato dependen de su composición, así como de la selectividad de enlace de los cationes alcalinotérreos por el alginato (Avendaño Romero et al., 2013).

Los alginatos se emplean en productos alimenticios, farmacéuticos, textiles entre otros. En la industria alimenticia son utilizados como espesantes o estabilizantes en jugos de frutas, salsas, cremas o cervezas. Algunas de sus aplicaciones farmacéuticas son espesantes de emulsiones, jarabes y cremas. Otras aplicaciones industriales son las propiedades de formación de películas, interacción con silicatos y espesantes y estabilizadores en barnices y pinturas.

##### 2.1.4.1 - Estabilidad de los Alginatos Sólidos

Los diferentes compuestos de alginato presentan pequeñas diferencias en cuanto a estabilidad, con ciertas excepciones. La regla general es que los compuestos con un elevado grado de polimerización son menos estables que aquellos con un grado de polimerización bajo.

El ácido algínico es el menos estable de los productos, más aún aquellos materiales con alto grado de polimerización en los cuales las largas cadenas pueden degradarse en unidades menores en unos pocos meses a temperatura ambiente. Sin embargo, los compuestos de cadenas más cortas resultan estables.

Independientemente de las diferencias en cuanto a estabilidad, todo compuesto algínico comercial debe almacenarse en un lugar fresco a temperaturas de 25°C o menores, pues la elevación de la misma puede causar una significativa despolimerización que afecta las propiedades comercialmente útiles como la viscosidad y la fuerza de los geles. El área de almacenaje deberá también tener un medio de control de la humedad ambiente a fin de que el producto no supere su contenido usual de humedad (10-13%), lo que incrementa la despolimerización (González Alvarado, 2009).

##### 2.1.4.2 - Estructura del Alginato

Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales, conteniendo cantidades variables de ácido  $\beta$ -D-manurónico y de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico. (Ilustración 9). Su composición, dada por la relación característica manurónico/gulurónico (M/G) y secuencias varían dependiendo de la fuente de

la cual proviene el polisacárido. El grado de polimerización (GP) de un alginato es una medida del peso molecular promedio de sus moléculas y corresponde al número de unidades de ácidos urónicos en la cadena polimérica.

Este polímero debe su carácter polianiónico a los grupos carboxilo que aparecen a lo largo de la cadena. Estos se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo bloques G (-GGG-) y bloques M (-MMM-) (Ilustración 10) o heteropolímeros en los cuales los bloques M y G se alternan (-MGMG-) (Ilustración 11).

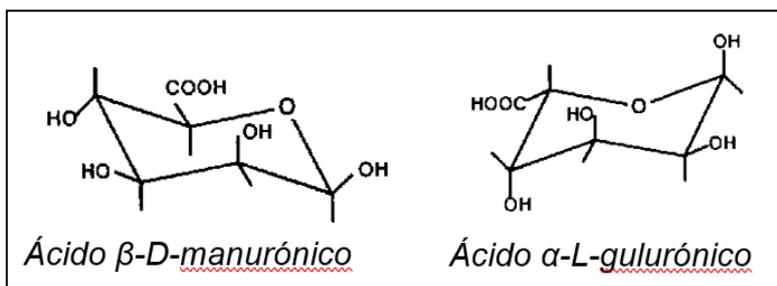


Ilustración 9 - Monómeros del ácido algínico<sup>15</sup>

Tanto la distribución de los monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido de gulurónico. Si en la estructura polimérica hay mayor cantidad de bloques G, generalmente el gel es duro y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de bloques M, el gel formado se presenta suave y elástico. Los bloques de secuencias MM y MG se encuentran unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$  (1-4), en tanto que los bloques GG y GM, por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4) (Avenidaño Romero et al., 2013).

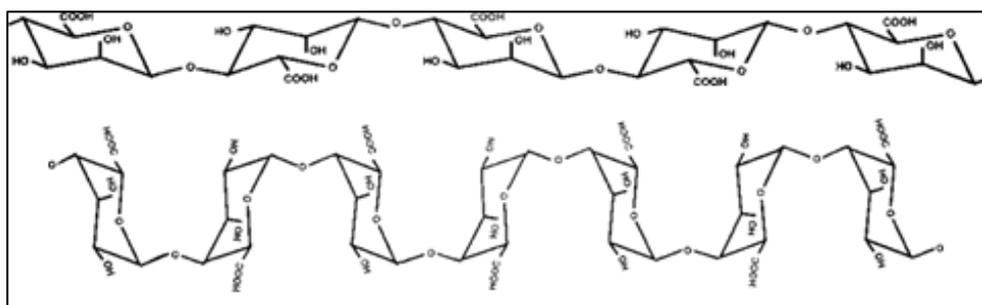


Ilustración 10 - Bloques poliméricos de ácido manurónico (superior) y ácido gulurónico (inferior)<sup>16</sup>

<sup>15</sup> Imagen obtenida de: Alvarado G. *Estabilidad e Intercambio de iones calcio en geles de alginato*. Disponible en <http://tecno.cruzferro.com/residencias/03040882-gonzalez-residencia> [consultado 19/09/18]

<sup>16</sup> Imagen obtenida de: Alvarado G. *Estabilidad e Intercambio de iones calcio en geles de alginato*. Disponible en <http://tecno.cruzferro.com/residencias/03040882-gonzalez-residencia> [consultado 19/09/18]

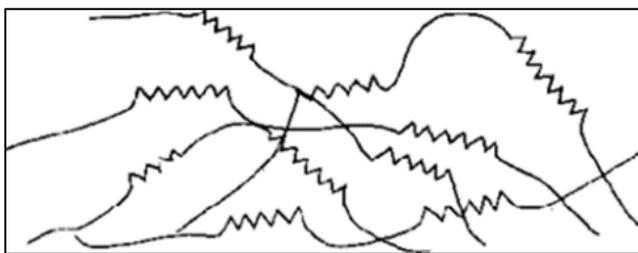


Ilustración 11 - Cadenas de alginato mostrando los bloques de copolímeros M y G<sup>17</sup>

## 2.2 - Soluciones de Alginato: Hidrogel

### 2.2.1 - Propiedades

#### 2.2.1.1 - Químicas

El alginato, en forma de sal con cationes monovalentes es soluble en soluciones acuosas a pH mayores de 3,5. Por el contrario, el ácido algínico y sus sales con cationes polivalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  son insolubles en agua. El alginato también es soluble en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles con ella, pero es insoluble en suspensiones que contengan elevado nivel de iones divalentes.

La solubilidad es influida por diversos factores físicos y por factores químicos. Dentro de los factores físicos destacan el tamaño y la forma de las partículas. Las partículas gruesas resultan más fáciles de dispersar y suspender, aunque tienen una baja velocidad de hidratación. Por el contrario, las partículas finas se disolverán más rápidamente, pero existe mayor riesgo de que se aglomeren. Este efecto puede disminuirse mezclando el alginato con otro polvo, por ejemplo, azúcar. Al incrementarse la concentración de alginato, la solución pasa de un estado de líquido viscoso a una pasta espesa. Con respecto a los químicos, los principales implican la presencia de otras sustancias en el medio. Así, la solubilidad del alginato disminuye en presencia de compuestos que compiten con las moléculas de alginato por el agua necesaria para su hidratación. La presencia de azúcares, almidón o proteínas en el agua reducirá la proporción de hidratación y se requerirán mayores tiempos de mezcla. Las sales de cationes monovalentes tienen un efecto similar. Por lo tanto, es recomendable agregar las sustancias extra a las formulaciones base después de que el alginato fue hidratado y disuelto. La presencia de pequeñas cantidades de cationes polivalentes inhibe la hidratación de los alginatos y proporciones elevadas de los mismos causan su precipitación. Los alginatos en general son insolubles en solventes miscibles con el agua como alcoholes y cetonas. Las soluciones

---

<sup>17</sup> Imagen obtenida de Alvarado G. *Estabilidad e Intercambio de iones calcio en geles de alginato*. Disponible en <http://tecno.cruzferro.com/residencias/03040882-gonzalez-residencia> [consultado 19/09/18]

acuosas (1% p/p) de la mayoría de los alginatos toleran la adición de 10 a 20% de tales solventes; pero proporciones mayores impiden una correcta hidratación de las moléculas (González Alvarado, 2009).

Por otra parte, las propiedades de intercambio iónico de los alginatos son importantes debido a las fuertes interacciones específicas con cationes tales como Ba, Sr y Ca que dan un gel que es reversible en presencia de un gran exceso de sales monovalentes o agentes complejantes (tales como etilendiaminotetraacetato de sodio, oxalato de sodio o citrato de sodio).

Por último, la distribución de las masas molares y la masa molar promedio controlan la viscosidad de la solución y la rigidez de los geles (Rinaudo, 2014).

### 2.2.1.2 - Físicas

#### Rigidez

La rigidez de los geles de alginatos está directamente relacionada con el contenido del bloque GG. Bajo su forma de sal monovalente (especialmente en forma de sodio), los alginatos son perfectamente solubles en agua y aumentan la viscosidad del solvente en la disolución, lo que causa un interesante carácter espesante (en relación con la conformación semirígida de este copolímero).

#### Viscosidad

La viscosidad es una de las características principales de las soluciones de alginato. Estas soluciones exhiben una alta viscosidad que depende principalmente de la concentración y de la estructura molecular y grado de polimerización del alginato. Comercialmente se producen alginatos (principalmente alginato de sodio) de baja, media y alta viscosidad. La viscosidad puede ser muy variable y es función de numerosos factores, entre los que se mencionan:

- Peso Molecular: cuanto mayor es peso molecular del alginato, más viscosas resultan sus soluciones. Los productores pueden controlar el peso molecular de los compuestos de alginato (grado de polimerización) variando las condiciones de extracción y manufactura. Se ofrecen generalmente productos con grado de polimerización comprendidos entre 100 y 1000 unidades, que dan viscosidades en el rango de 0,01 a 1 Pa s para soluciones al 1% p/p.
- Concentración: la viscosidad se eleva muy rápidamente al aumentar la concentración por encima del 2% p/p.
- Temperatura: dentro de cierto rango, la viscosidad de las soluciones decrece aproximadamente 2,5% por cada grado de incremento en la temperatura. El proceso es reversible, pudiendo la solución volver a su viscosidad inicial por enfriamiento. Sin embargo, si las soluciones de alginatos se mantienen a temperaturas elevadas (mayores a 50°C) durante períodos extensos, la viscosidad decrece irreversiblemente debido a un proceso de despolimerización.

- pH: la viscosidad de las soluciones de alginato de sodio es casi independiente del pH en el rango entre 5 y 10, presentando un valor ligeramente mayor cerca de la neutralidad debido a efectos repulsivos de los grupos carboxilos cargados negativamente ( $\text{COO}^-$ ), los que mantienen extendidas las cadenas del polímero e incrementan su capacidad de unión de moléculas de agua. Por debajo de pH 4,5 la viscosidad tiende a incrementarse por la disminución de la solubilidad del ácido algínico libre, el cual precipita en forma de gel a un pH inferior a 3,5.
- Fuerza iónica: la viscosidad decrece levemente por la adición de sales de cationes monovalentes. Como es frecuente con otros polielectrólitos, el polímero en solución tiende a contraerse al aumentar la fuerza iónica de la misma. Este efecto se hace máximo a concentraciones salinas cercanas a 0,1 N (González Alvarado, 2009).

### Reología

Los ensayos reométricos dinámicos consisten en aplicar un esfuerzo o deformación oscilatoria de entrada sobre la muestra y monitorear la deformación o esfuerzo oscilatorio de salida, es decir, se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante y se mide como respuesta la tensión generada dentro de la muestra como el esfuerzo de corte. Los materiales responden a la deformación aplicada disipando energía en forma de calor (disipación viscosa), almacenando energía elástica, o a través de la combinación de ambos mecanismos. El análisis dinámico mecánico permite medir ambos tipos de propiedades.

La respuesta particular de una muestra depende de la escala del tiempo de observación del proceso en relación con el tiempo de relajación. Si el experimento es relativamente lento, la muestra puede parecer más viscosa que elástica, mientras que, si el experimento es relativamente rápido, esta puede parecer más elástica que viscosa. De la coexistencia de ambas observaciones a escalas de tiempo intermedio, donde la muestra puede parecer tanto elástica como viscosa, es de donde se obtiene un comportamiento viscoelástico (Espinosa et al., 2014).

La energía almacenada durante la deformación está representada por el módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ) y la energía disipada en el elemento viscoso por el módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ). Las unidades de ambos módulos son Pa y están definidos por las ecuaciones:

$$G' = G^* \cdot \cos \delta$$
$$G'' = G^* \cdot \sin \delta$$

Las variables implicadas en las ecuaciones anteriores se obtienen del siguiente desarrollo a partir de las leyes de Hooke (1) y Newton (2), que describen los extremos del comportamiento elástico y viscoso (respectivamente) de los materiales:

$$\tau_e = G \cdot \gamma_e \quad (1)$$

$$\tau_v = \eta \cdot \gamma_v \quad (2)$$

Donde  $\tau$  es el esfuerzo de corte,  $G$  es el módulo constante del resorte,  $\gamma_e$  es la deformación,  $\eta$  es la viscosidad y  $\gamma_v$  es la velocidad de corte.

La ecuación para una deformación oscilatoria de una muestra puede escribirse como:

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \text{sen}(\omega t) \quad (3)$$

Donde  $\gamma_0$  es la deformación máxima o amplitud y  $\omega$  la velocidad angular. Reemplazando (3) en (1) se obtiene:

$$\tau_e = G \cdot \gamma_0 \cdot \text{sen}(\omega t) \quad (4)$$

La ecuación 4 describe el esfuerzo de corte resultante que actúa sobre el resorte e indica que la deformación aplicada y el esfuerzo de corte elástico se encuentran en fase. Derivando la ecuación 3 respecto del tiempo  $t$  y reemplazando en la Ecuación 2 se obtiene:

$$\tau_v = \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cdot \text{cos}(\omega t) \quad (5)$$

La ecuación 5 es una función coseno que describe el esfuerzo de corte viscoso y tiene un desfase de  $90^\circ$  respecto de la deformación aplicada.

La relación entre la amplitud del esfuerzo de corte y la deformación máxima se denomina módulo complejo ( $G^*$ ):

$$G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \quad (6)$$

Donde  $G^*$  es una medida de la resistencia total del material a la deformación aplicada (García, 2008).

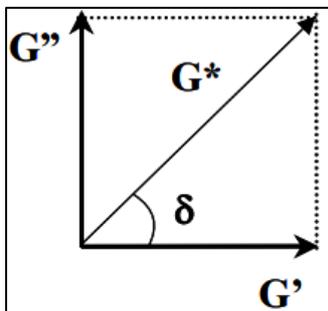


Ilustración 12 - Interpretación gráfica del módulo complejo como combinación de dos vectores, que son los módulos elástico y viscoso.

En la Ilustración 12 se puede observar que  $\delta$  es el ángulo de desfase entre el esfuerzo de corte y la deformación. Si la muestra es puramente elástica,  $\delta=0^\circ$ ,  $G^*=G'$  y  $G''=0$ . Por el contrario, si es puramente viscosa,  $\delta=90^\circ$ ,  $G^*=G''$  y  $G'=0$ . En este sentido, si el ángulo de desfase es un indicador de la presencia de propiedades elásticas o viscosas de un fluido, se puede establecer que si el valor de  $\delta$  está comprendido entre  $0^\circ$  y  $45^\circ$  el fluido tiene un comportamiento más elástico que viscoso, o viceversa, cuando  $\delta$  está comprendido entre  $45^\circ$  y  $90^\circ$ .

Otra función que se utiliza habitualmente para describir el comportamiento viscoelástico de un material es la tangente del ángulo de desfase. Esta se define como:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (7)$$

La viscosidad compleja ( $\eta^*$ ) es una función alternativa al  $G^*$  y representa una medida de la magnitud de la resistencia total de la muestra al corte dinámico. Esta se define como:

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \frac{1}{\omega} \quad (8)$$

Para caracterizar un gel se deben definir los términos de dos mecanismos dinámicos: el módulo elástico (o de almacenamiento),  $G'(\omega)$ , que cuando se grafica con el tiempo (o frecuencia), exhibe una pronunciada meseta extendiéndose por el tiempo al menos en orden de segundos, y un módulo viscoso (o de pérdida),  $G''(\omega)$  que es considerablemente menor que el módulo elástico en la región de la meseta (Ilustración 13).

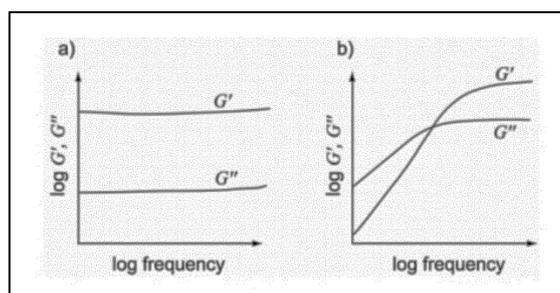


Ilustración 13 - Espectro mecánico dinámico típico de una solución polimérica. (a) Sin entrecruzamiento; (b) Entrecruzamiento de un gel polimérico.

En el régimen de viscoelasticidad lineal, donde se dan pequeñas deformaciones, cuando los módulos elásticos ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) son independientes de la frecuencia ( $G' > G''$ ), comportamiento es típico de geles "fuertes", se muestra una región de meseta del espectro viscoelástico del material. Por otro lado, algunas sustancias pueden fluir fácilmente, por lo que no

pueden ser consideradas como geles verdaderos (gel “débil”). Se consideran geles débiles a aquellos materiales que se encuentran entre el gel fuerte y soluciones poliméricas o coloidales concentradas (Espinosa et al., 2014).

### 2.2.1.3 - Biológicas

La molécula de alginato tiene diferentes efectos en los sistemas biológicos debido a la gran variedad de composiciones químicas y pesos moleculares de las preparaciones (Draget et al., 2005). Los alginatos han sido utilizados como dispositivos en diversas aplicaciones en el área biomédica, fundamentalmente por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad (Lencina, 2013).

#### Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para desempeñar una función deseada de forma segura, sin causar efectos biológicos adversos. Es necesario realizar un proceso de evaluación biológica completo y determinar las pruebas necesarias para cada dispositivo, siendo éste previamente categorizado. En cuanto a los hidrogeles de alginato aplicado a úlceras de pie diabético, se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Categoría: Dispositivo de superficie.  
→ Superficies comprometidas o dañadas.
- Duración del contacto: Limitado, menor a 24hs.
- Evaluación: Citotoxicidad, Sensibilización e Irritación.

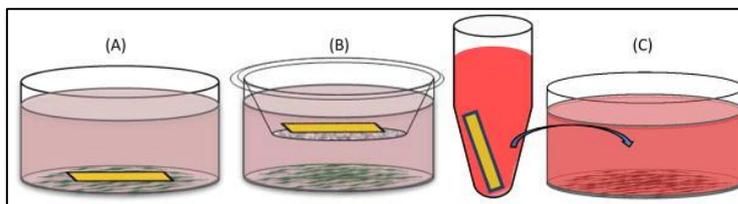
Medical device categorization by			Biological effect							
Category	Contact	Contact duration (see 4.3)  A — Limited (< 24 h)  B — prolonged (24 h to 30 days)  C — permanent (> 30 days)	Cytotoxicity	Sensitization	Irritation or intracutaneous reactivity	Systemic toxicity (acute)	Subacute and subchronic toxicity	Genotoxicity	Implantation	Haemocompatibility
Surface device	Skin	A	x	x	x					
		B	x	x	x					
		C	x	x	x					
	Mucosal membrane	A	x	x	x					
		B	x	x	x					
		C	x	x	x		x	x		
	Breached or compromised surface	A	x	x	x					
		B	x	x	x					
		C	x	x	x		x	x		

Ilustración 14 - Ensayos a considerar según la clasificación del dispositivo médico<sup>18</sup>

<sup>18</sup> Imagen obtenida de Norma ISO 10993-1.

### A) Citotoxicidad

La citotoxicidad es la capacidad de una sustancia de generar toxicidad en células y tiene como finalidad determinar el grado de lisis causado por dicha sustancia mediante uso de técnicas de cultivo celular (ISO 10993-5).



*Ilustración 15 - Esquema del test de Citotoxicidad. (A) Prueba de contacto directo donde las células se siembran y el material se coloca directamente. (B) Prueba de contacto indirecto en la que el material se coloca en un inserto Transwell, que se cultiva con células sembradas en el fondo. (C) Prueba de extractos donde el material se incuba en el medio de cultivo apropiado durante 24 h y luego se reemplaza el medio de cultivo en células sembradas en una placa.<sup>19</sup>*

### Sensibilización

La sensibilización hace referencia al nivel de dermatitis a causa de alergia por contacto. El objetivo es estimar el potencial de sensibilidad por contacto con la dermis de materiales, extractos o lixiviados (ISO 10993-10). Este ensayo no se llevará a cabo en el este Proyecto Integrador.

### Irritación

La irritación se define como dermatitis a causa de alergia por contacto. A diferencia del anterior, tiene como fin la estimación del potencial de irritación de los dispositivos médicos, materiales o extractos en la piel, los ojos y mucosas de acuerdo con el tipo y duración del contacto (ISO 10993-10).

### 2.2.2 - Formación de Hidrogel

La formación del de alginato se genera por entrecruzamiento (*crosslinking*, en inglés) químico de dos o más moléculas por enlaces covalentes o iónicos. Cuando dos cadenas de bloque G de alginato se alinean, se forma sitios de coordinación debido a la forma de bucles de estas cadenas. Las cavidades que se forman entre ellas tienen el tamaño adecuado para acomodar un catión polivalente. A su vez, los grupos carboxílicos y otros átomos de oxígeno electronegativos actúan como ligandos, permiten un alto grado de coordinación con estos iones. Este modelo es llamado el modelo de la caja de huevos (Ilustración 16).

---

<sup>19</sup> Imagen obtenida de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670822/>. Consultado el 1/10/18

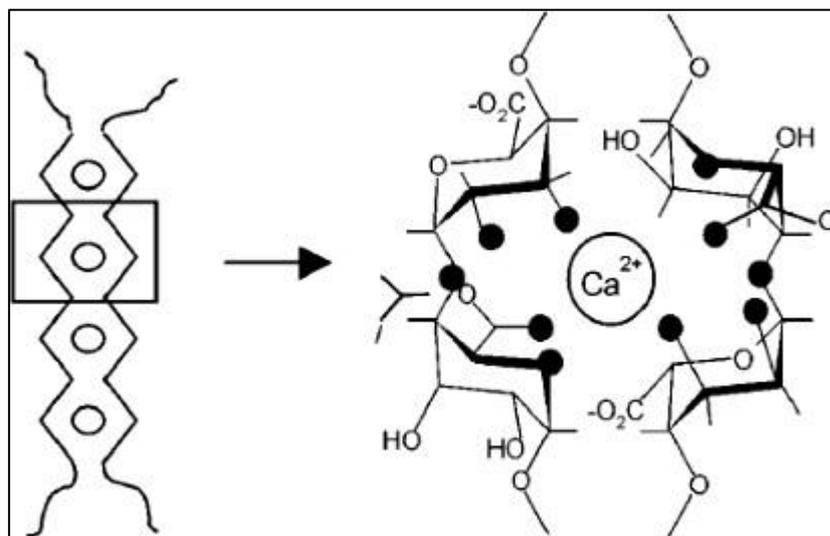


Ilustración 16 - Estructura del gel de alginato de calcio.<sup>20</sup>

Debido a esta configuración estructural, se puede emplear cationes polivalentes como agentes de entrecruzamiento para solidificar soluciones de alginato de sodio y formar geles mecánicamente estables. El catión más empleado es el  $\text{Ca}^{2+}$ , pero también se pueden emplear  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ , entre otros. Al suministrar dichos cationes, éstos comienzan a reemplazar al sodio en los extremos carboxílicos del alginato. Los cationes actúan atrayendo electrostáticamente los extremos aniónicos de dos cadenas adyacentes de alginato conformando así la red polimérica (Ilustración 17).

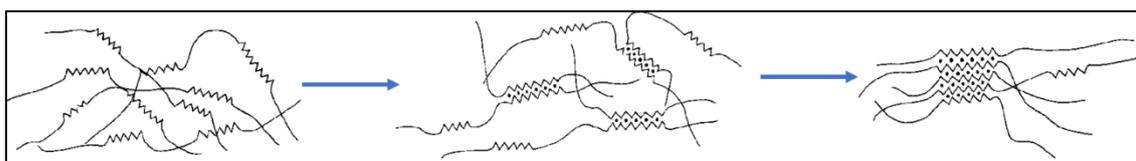


Ilustración 17 - Entrecruzamiento de alginato con iones calcio.<sup>21</sup>

La estabilidad del gel depende de la composición química del alginato y del catión polivalente empleados. Se requiere que el medio en el que se mantendrán las partículas tenga una concentración mínima del ión entrecruzante para evitar la disgregación del alginato (González Alvarado, 2009).

<sup>20</sup> Imagen obtenida de González Alvarado. Estabilidad e Intercambio de Iones Calcio en Geles de Alginato, (C), 1–44. (2009).

<sup>21</sup> Imagen obtenida de González Alvarado. Estabilidad e Intercambio de Iones Calcio en Geles de Alginato, (C), 1–44. (2009).

### 2.2.3 - Estabilidad de las Soluciones

Las soluciones neutras de alginatos de baja a media viscosidad pueden ser mantenidas a 25°C por varios años sin apreciable pérdida de viscosidad y además con muy baja susceptibilidad al ataque microbiano. La disminución de la viscosidad, producido comúnmente durante almacenaje prolongado, es una medida de la extensión de un proceso de despolimerización del alginato.

Sin embargo, las soluciones de alginatos altamente polimerizados son poco estables aún a temperatura ambiente y tienen tendencia a sufrir despolimerización a medida que se incrementa la temperatura (González Alvarado, 2009).

### 2.2.4 - Intercambio Iónico y Estabilidad

El intercambio iónico es una reacción química reversible que tiene lugar cuando un ion de una disolución se intercambia por otro ion de igual signo que se encuentra unido a una partícula sólida inmóvil. Este proceso tiene lugar constantemente en la naturaleza, tanto en la materia inorgánica como en las células vivas. En el caso del alginato, al entrecruzarse las cadenas del polímero con el cloruro de calcio, ocurre una reacción de intercambio iónico, en la que el sodio es remplazado por calcio, dando al gel su consistencia sólida característica. Dado que la reacción se supone reversible, es posible en principio remplazar el calcio a su vez con otros iones. Por ejemplo, si las partículas de alginato de calcio se dejan en una solución que contenga iones aluminio  $Al^{+3}$ , el aluminio puede intercambiarse con el calcio. Por su mayor valencia, el gel de alginato de aluminio tiene una mayor dureza que el alginato de calcio.

Si las partículas de alginato de calcio se colocan en una solución con nulas concentraciones de calcio, pueden eventualmente sufrir una reacción de intercambio iónico en la que pierdan iones calcio a favor de otros iones presentes en la solución, originando la descalcificación del gel y la modificación (o pérdida) de sus características deseables.

En agua destilada, el intercambio ocurriría entre los iones calcio  $Ca^{+2}$  y los iones hidrógeno  $H^{+}$ , dando lugar a la formación de ácido algínico. Por otro lado, si la solución contiene una elevada concentración de iones sodio  $Na^{+}$ , éstos remplazarían al calcio, regenerando así el alginato de sodio (González Alvarado, 2009).

### 2.2.5 - Suplementos

#### 2.2.5.1 - Agentes Antimicrobianos: Definición y Clasificación

Se denomina antimicrobiana a cualquier sustancia producida por microorganismos o sintetizada químicamente que se utiliza para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Una propiedad común a todos los antimicrobianos es la toxicidad selectiva hacia los organismos invasores, superior a la que muestran frente a animales o seres humanos (Velázquez,

2008). Los agentes antimicrobianos pueden clasificarse según diversos criterios, lo que permite agruparlos de la siguiente manera:

- Estructura Química: los antibióticos se agrupan en familias con propiedades generales.
- Espectro de Acción:
  - De amplio espectro: tetraciclinas, cloranfenicol y algunos  $\beta$ -lactámicos.
  - De espectro intermedio: macrólidos y aminoglucósidos.
  - De espectro reducido: glucopéptidos.
- Efecto Antimicrobiano:
  - Bactericidas: producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso. Pertenecen a este grupo los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas.
  - Bacteriostáticos: bloquean el desarrollo de las bacterias: tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprima, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas.

El hecho de que un agente sea bactericida o bacteriostático depende de su mecanismo de acción y, por tanto, de su estructura, pero también contribuyen paralelamente otros factores tales como concentración alcanzada en el sitio de la infección, tipo de microorganismo, tamaño del inóculo, tiempo de acción y fase de crecimiento del germen. Así, los  $\beta$ -lactámicos sólo son bactericidas en la fase de crecimiento activo de la bacteria, mientras que las polimixinas son bactericidas en cualquier fase. Debe aclararse que un antibiótico bacteriostático puede comportarse como bactericida en determinadas condiciones favorables, tal como ocurre con los macrólidos.
- Por su mecanismo de acción:
  - Inhibidores de la síntesis de la pared celular.
  - Inhibidores de la permeabilidad de la membrana plasmática.
  - Inhibidores de la síntesis proteica.
  - Inhibidores de la síntesis o función de ácidos nucleicos.

#### Agentes Bacteriostáticos: Sulfamidas

Las sulfamidas o comúnmente llamadas “sulfas” fueron las primeras drogas usadas efectivamente para combatir las infecciones. Estos agentes que, juntamente con los antibióticos de biosintéticos, significaron uno de los más grandes avances terapéuticos de los tiempos modernos, generando una caída considerable de la morbimortalidad por infecciones desde la generalización de uso clínico.

Con el tiempo, debido a la aparición de resistencia bacteriana y al descubrimiento de fármacos más activos y menos tóxicos, las sulfas fueron dejadas de lado por mucho tiempo. Sin embargo, actualmente, con la recuperación de la sensibilidad de algunas bacterias y la aparición de la trimetoprima combinable, las sulfas han reconquistado algunos campos en

quimioterapia antimicrobiana. Se han sintetizado varios con el mismo mecanismo de acción, aunque sus farmacocinéticas pueden variar (Tabla 4).

Absorbibles por Vía Oral	Acción Rápida (< 6 h)	Sulfametazina Sulfapiridina Sulfisoxazol
	Acción Intermedia (11 - 18 h)	Sulfadiazina Sulfametoxazol
	Acción Prolongada (24 - 60 h)	Sulfadoxina Sulfadimetoxina Sulfametoxidiazina Sulfametoxipiridazina
No Absorbibles (acción intestinal)		Ftalilsulfacetamida Salazopirina Sulfasalazina Ftalilsulfatiazol Succinilsulfatiazol
Uso Tópico		Sulfadiazina de Plata Sulfamilón (mafénido)

Tabla 4 - Clasificación de las principales sulfamidas

#### A) Mecanismo de Acción

Las sulfas actúan, como antagonistas competitivos del ácido paraaminobenzoico (PABA), debido a que se unen a la enzima tetrahidro-pterico-sintetasa, es necesaria para la condensación del PABA y pteridina, que lleva a la formación de ácido fólico, el cual se transforma en tetrahidrofolato, que actúa como coenzima en la transferencia de grupos metilos a las bases púricas y pirimídicas para la síntesis del DNA y RNA.

De este modo, las sulfas impiden la incorporación de PABA a la molécula de ácido fólico, dificultando su biosíntesis, que es esencial para el crecimiento y multiplicación bacteriana. Los microorganismos sensibles son aquellos que deben sintetizar su propio ácido fólico, o son impermeables al ácido fólico de los líquidos circundantes. Por el contrario, los microorganismos resistentes, son aquellos que son permeables al ácido fólico o al igual que las células del hombre requieren ácido fólico preformado para normal desarrollo.

Por su mecanismo de acción, las sulfas son bacteriostáticas, y no bactericidas y la presencia de mecanismos inmunológicos normales es necesaria para completar la acción de las sulfas.

#### B) Indicaciones Terapéuticas

Las sulfamidas están indicadas en los siguientes procesos:

- Infecciones por *Nocardia*, *Chlamydia* y protozoarios.
- Infecciones dérmicas, urinarias, intestinales y meníngeas.
- Dermatitis herpetiforme.
- Infecciones meníngeas.
- Prevención de infecciones por quemaduras.

- Profilaxis y tratamiento de la fiebre reumática.

En el presente Proyecto Integrador se evaluará el antimicrobiano sulfadiazina de plata (SdP), ya que además de reunir la mayoría de las características terapéuticas que presentan las sulfas, el ion  $\text{Ag}^+$  actúa sinérgicamente (antimicrobiano y oxidante); a la vez que la droga es fácil acceso y económica. Los preparados conteniendo sulfadiazina de plata son inodoros, fáciles de aplicar y sin dolor, y a menudo reduce la necesidad de injertos de piel (Arévalo et al., 1998). Respecto a su espectro, la SdP presenta actividad frente a una gran variedad de bacterias Gram positivas (*S. aureus*), negativas (*P. aeruginosa*, *Enterobacterias*), y algunos hongos (como *Candida spp.*), al actuar sobre la pared celular y membrana citoplasmática.

#### 2.2.5.2 - Agentes Higroscópicos

Se define como sustancia higroscópica a aquellas sustancias que absorben con facilidad la humedad del medio, ya sea porque reaccionan químicamente con el agua, como los hidruros o los metales alcalinos, o porque actúan como atrapantes en su estructura cristalina, como es el caso del sulfato sódico. A su vez, el agua también puede adsorberse físicamente, por lo que la mayoría de las sustancias puras pulverizadas suele tener una leve capacidad higroscópica. En estos dos últimos casos, la retención es reversible y el agua puede ser desorbida.<sup>22</sup>

Algunos ejemplos de los compuestos higroscópicos más conocidos son:

- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ )
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ )
- La mayoría de los carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ )
- Silica gel

Para cada sustancia existe una humedad de equilibrio, es decir, un contenido de humedad tal de la atmósfera a la cual el material capta humedad del ambiente a la misma velocidad que la libera. Si la humedad ambiente es menor que este valor de equilibrio, el material se secará, si la humedad ambiente es mayor, se humedecerá. Así, ciertos minerales como el cloruro de calcio son capaces de captar agua de la atmósfera en casi cualquier condición, porque su humedad de equilibrio es muy alta. Sustancias como estas son usadas como desecadores.

#### Carbonato de Magnesio ( $\text{MgCO}_3$ )

El carbonato de magnesio es un polvo blanco, liviano, voluminoso, inodoro y estable al aire, soluble sólo en ácidos diluidos produciendo efervescencia. En contacto con el agua presenta ligera reacción alcalina (Ministerio de Salud de la Nación, 2003). Comercialmente se presenta como una sal anhidra de variada

---

<sup>22</sup> Enciclopedia <http://www.quimica.es/enciclopedia/Higrosc%C3%B3pico.html>. Consultado 15/09/2018

pureza, siendo las sustancias más puras destinadas a química analítica y farmacología, y las de pureza reducida a fines industriales. Gracias a ello, presenta variedad de usos que abarcan desde producción de ladrillos refractantes y polvo de extintores hasta desecantes, aditivo en la sal de mesa, cosméticos, dentífricos, antiácidos y laxantes. Particularmente, la presentación en polvo es comúnmente conocida como tiza utilizado para secar las manos en escalada, gimnasia, lanzamiento de peso y halterofilia.

## CAPÍTULO 2

### - MATERIALES Y MÉTODOS -

#### 1 - FORMULACIÓN DE HIDROGEL BASE

A fin de obtener un hidrogel base con las propiedades previamente definidas, se prepararon soluciones de alginato de 2 a 4% p/p concentraciones crecientes en intervalos de 0,25% p/p. Para ello, se pesaron diferentes masas de alginato de sodio (*grado técnico*) en balanza analítica con 0,0001 g de resolución de masa (*Ohaus*) (Ilustración 18) a las cuales se agregó agua destilada. Las preparaciones se colocaron luego en un baño ultrasónico termostatzado a 37°C por 3 h aproximadamente. Concentraciones inferiores fueron descartadas por defectos en la polimerización y, concentraciones superiores tampoco fueron consideradas debido a que la solución adquiere consistencia sólida (tipo masilla) y quebradiza.

Una vez obtenidas las soluciones, mediante el uso de una pipeta, las muestras fueron bañadas con 3 mL de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M y 3 M para generar la gelación externa. El  $\text{CaCl}_2$  se dejó reaccionar durante 10 min y luego se procedió al análisis de los hidrogeles. Debe destacarse que previo a la utilización, todo material en contacto con los hidrogeles fue lavado con agua destilada, agua MilliQ y esterilizado con etanol al 96 % v/v.

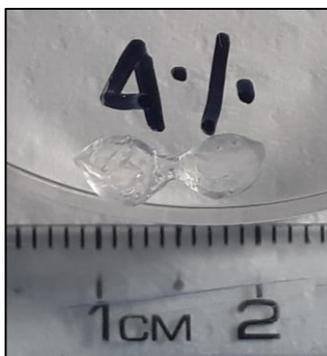
Los geles fueron evaluados cualitativa y cuantitativamente para poder seleccionar aquellos que mejor se adapten al uso previsto. A partir de esta elección se realizó un ensayo de difusión para seleccionar la formulación que se utilizará en el resto del proyecto.



Ilustración 18 - Balanza de precisión.

## 1.2 - Análisis Cualitativo

Para efectuar dicho análisis se formaron hidrogeles esféricos (diámetro aproximado de 4mm) empleando 0,1 mL de alginato de sodio (Ilustración 19), de cada concentración a ensayar mencionadas anteriormente.

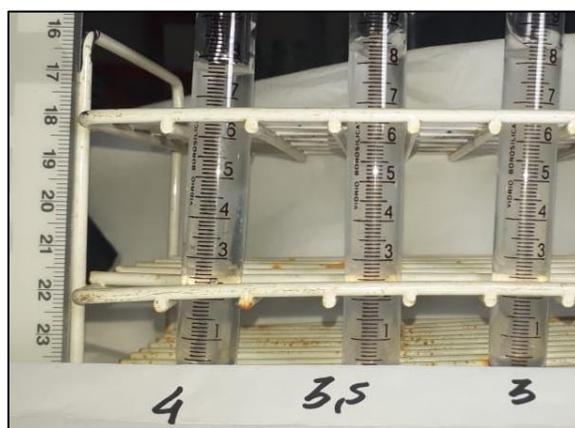


*Ilustración 19 - Hidrogel de alginato 4% p/p utilizado en el análisis cualitativo.*

Se realizó una escala cualitativa, considerando como mínima valoración al 1 y máxima al 5. Se analizaron, mediante 2 sujetos evaluadores, las variables Dureza, Transparencia, Resistencia al cambio de forma por presión y disminución de diámetro de las muestras, entre otras propiedades organolépticas.

## 1.3 - Análisis Cuantitativo

El objetivo de este ensayo fue evaluar el aumento de espesor en función del tiempo, de acuerdo a la concentración de los reactivos. Para ello, se realizaron muestras en tubos de ensayo de 10 mL (Ilustración 20). Se dejó reaccionar al  $\text{CaCl}_2$  en las concentraciones anteriormente mencionadas durante 3, 5, y 9 min, se retiraron del tubo utilizando pinzas, y luego se cortaron transversalmente las muestras para medir el espesor de la capa externa.



*Ilustración 20 - Preparación de hidrogeles en tubos de ensayo.*

## 2 - CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Se prepararon 3 muestras de hidrogel de alginato de sodio 4% p/p con cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$  3 M reaccionando 10 min (hidrogel base). Una de las muestras fue colocada en formaldehído 4% p/v (fijador), otra liofilizada y la última se analizó de manera natural. Las muestras fueron cortadas transversalmente y analizadas por microscopía confocal (*Olympus LEXT OLS4000*) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX) ubicado en la Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FAMAF-UNC). Este microscopio totalmente automatizado utiliza un láser de 405 nm para capturar imágenes en 3D con las cuales se puede realizar mediciones en alta resolución de microgeometría de superficies rugosas.

Las imágenes de las muestras en formaldehído y liofilizadas no fueron analizadas posteriormente ya que no se logró observar una estructura polimérica adecuada, a diferencia de la muestra de hidrogel al natural, la cual fue previamente secada con material absorbente, y visualizada con un zoom de 108x.

A través de micrografías, se analizó el tamaño de las células ( $n = 8$ ) mediante un procesador de imágenes (*ImageJ, Freeware*).

## 3 - ANÁLISIS QUÍMICO

### 3.1 - Ensayo de Difusión

A fin de evaluar la capacidad de difusión de una sustancia embebida en la matriz del hidrogel, se realizó un ensayo de difusión empleando azul de metileno como marcador. Para ellos, se prepararon hidrogeles de alginato al 3,5 y 4% p/p, conteniendo azul de metileno en una concentración final de  $2,02 \text{ mg L}^{-1}$  (alginato suplementado).

Para la realización del ensayo se realizaron esferas de 1 mL con cada solución de alginato suplementado (Ilustración 21), que fueron luego bañadas con  $\text{CaCl}_2$  3M mediante el uso de una pipeta. Una vez formado el hidrogel, las esferas fueron lavadas con agua destilada para eliminar el excedente del agente de entrecruzamiento y colocadas en viales independientes conteniendo cada uno 9 mL de solución fisiológica.

Se evaluó la concentración de azul de metileno en la solución a intervalos determinados mediante una espectrofotometría de absorción (*RD5000, Hach*), empleando una curva de calibración confeccionada con azul de metileno puro (*Sigma*) (Anexo 2). Para la selección de la longitud de onda se realizó una curva espectral observándose picos máximos de absorbancia a 609 y 651 nm.



Ilustración 21 - Esferas de hidrogel de alginato con azul de metileno.

Con los datos de masa de azul de metileno inicial ( $Masa_i$ ) en los hidrogeles y la masa en solución ( $Masa_s$ ) se calculó el porcentaje de masa de sustancia que difundió hacia la solución según la fórmula:

$$\text{Porcentaje de Difusión (\%)} = \frac{Masa_i \times 100}{Masa_s}$$

Para el análisis estadístico de los datos se realizó la prueba t-Student para pares, contrastando los valores obtenidos para cada concentración de alginato en un tiempo determinado.

### 3.2 - Ensayo de Capacidad Antiséptica

Para evaluar la capacidad del hidrogel de ser suplementado con algún agente antimicrobiano, se efectuaron los ensayos de concentración inhibitoria mínima (CIM) y difusión de antimicrobiano (Konemann et al., 2008). Para ambos ensayos, se prepararon discos de 11 mm de diámetro y 2 mm de alto de hidrogeles de alginato de sodio 4% p/p, a los cuales se le agregó SdP en las concentraciones 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10% p/p. Como agente de entrecruzamiento se utilizó cloruro de calcio 3 M, con un tiempo de acción de 1 min. Los discos fueron conservados a 4°C al abrigo de la luz hasta su utilización (1 hora como máximo).

#### 3.2.1 - Concentración Inhibitoria Mínima

La CIM se define como la mínima concentración de antimicrobiano que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado. El mismo se realizó empleando como medio de cultivo caldo de soja y caseína (*Tryptic Soy Broth*, TSB, *Biomerieux*) en una concentración de 30 g L<sup>-1</sup>. El medio fue seleccionado

debido a que presenta elevada transparencia y favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, en especial las bacterias anaerobias facultativas y aerobias comunes. El caldo fue fraccionado en alícuotas de 3 mL en tubos de ensayo. Luego los tubos fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a  $120 \pm 0,5^\circ\text{C}$  y almacenados a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

Para este ensayo se utilizaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa de referencia ATCC 25922 cultivadas en TBS estéril. La especie fue elegida en base a sus características fenotípicas y genotípicas definidas, lo cual las hace óptimas para ser empleadas como control en determinaciones de viabilidad y esterilidad de muestras y medios. El inóculo fue mantenido en estufa a  $36^\circ\text{C}$  hasta su uso (48 horas como máximo).

En una primera instancia se llevó a cabo un ensayo colocando en los tubos con medio de cultivo un disco de hidrogel perteneciente a cada concentración (6 concentraciones). Se empleó un séptimo tubo como control positivo conteniendo sólo hidrogel sin SdP. Posteriormente, los tubos fueron inoculados con una dilución 1:10 de la cepa de referencia de la escala McFarland 0,5 en solución fisiológica (Anexo 3). Se ensayaron inóculos de 10, 25 y 50  $\mu\text{L}$ , por lo que el ensayo final contempló un total de 21 tubos para analizar. Las muestras fueron luego cultivadas en estufa a  $36^\circ\text{C}$  por 24 h. Trascorrido ese tiempo, los tubos fueron analizados en busca de turbidez, propia del desarrollo bacteriano (muestra positiva). En este caso, al observar los tubos se detectó la presencia de bacterias en todos ellos, por lo que se decidió modificar el ensayo para verificar si el antimicrobiano elegido no presentaba actividad antimicrobiana en estas condiciones o el efecto observado se debía a un crecimiento bacteriano superior a la tasa de difusión de la SdP.

Para evaluar estas hipótesis, y a fin de evaluar la CIM en una situación de sobrecarga microbiana (herida “sucia”) y de baja carga microbiana (herida “limpia”), se repitió la técnica introduciendo algunas modificaciones. La misma consistió en emplear como inóculo una dilución 1:100 de una suspensión bacteriana en escala McFarland 0,5 en solución fisiológica, con la cual se realizaron dos pruebas de CIM, una en caldo de cultivo y otra en solución fisiológica (Ilustración 22). En la primera, se repitió el procedimiento anterior, sólo que una vez añadidos los discos conteniendo SdP se esperó por 1 h antes de inocular las bacterias (Tabla 5). Durante ese tiempo las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente. De esta forma se espera que el crecimiento de las bacterias fuere menor que en el ensayo previo, ya que la curva de crecimiento bacteriano no debería ser notablemente afectada por la curva de difusión del bacteriostático.

En el segundo ensayo se colocaron el inóculo y los discos de hidrogel con SdP simultáneamente en 3 mL de solución fisiológica (Tabla 6). Tras 1 h de incubación, las muestras fueron luego repicadas en caldo TSB a fin de comprobar si hubo o no crecimiento bacteriano. En este caso se espera que la difusión de SdP afecte al desarrollo microbiano (debido a la ausencia de un

medio nutritivo para que las bacterias se repliquen durante el tiempo de estacionamiento).

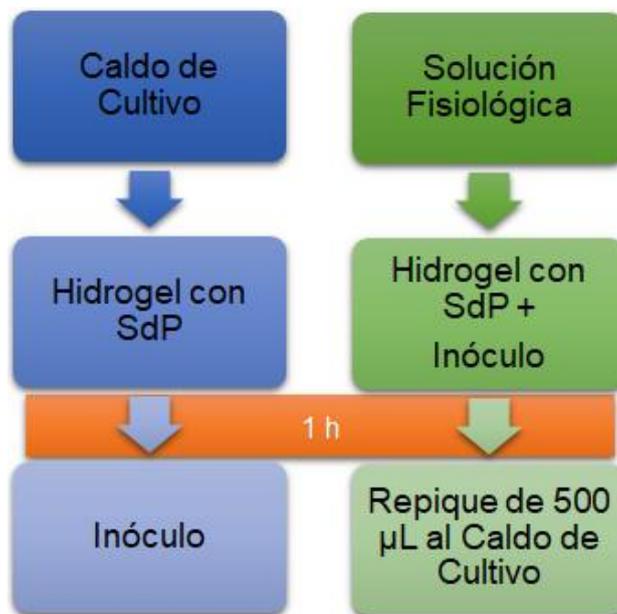


Ilustración 22 - Esquema de procedimientos del ensayo de CIM.

Para su análisis, las muestras fueron colocadas en la estufa a 36°C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, las mismas fueron centrifugadas a 2876 g durante 5 minutos para visualizar cambios en la turbidez.

Inóculo	Concentración de SdP						
	0%	0,01%	0,1%	0,5%	1%	5%	10%
10 µL	10-A	10-B	10-C	10-D	10-E	10-F	10-G
25 µL	25-A	25-B	25-C	25-D	25-E	25-F	25-G
50 µL	50-A	50-B	50-C	50-D	50-E	50-F	50-G

Tabla 5 - Codificación del ensayo en caldo de cultivo. Las letras colocadas como rótulos en los tubos (de A a G) representan las diferentes concentraciones de sulfadiazina de plata.

Inóculo	Concentración de SdP						
	0%	0,01%	0,1%	0,5%	1%	5%	10%
10 µL	10-A'	10-B'	10-C'	10-D'	10-E'	10-F'	10-G'
25 µL	25-A'	25-B'	25-C'	25-D'	25-E'	25-F'	25-G'
50 µL	50-A'	50-B'	50-C'	50-D'	50-E'	50-F'	50-G'

Tabla 6 - Codificación del ensayo en solución fisiológica. Las letras colocadas como rótulos en los tubos (de A a G) representan las diferentes concentraciones de sulfadiazina de plata.

### 3.2.2 - Ensayo de Difusión

A fin de establecer la concentración de SdP que difunde hacia el medio en cada caso, se ejecutó un ensayo de difusión similar al realizado con azul de

metileno. Para ello, los discos de hidrogel con SdP (por triplicado) se colocaron en viales de vidrio limpios con 3 mL de solución fisiológica donde permanecieron 1 h. Posteriormente se retiraron y se procedió a cuantificar la cantidad de plata difundida al medio mediante volumetría por precipitación (Método de Volhard Indirecto) (Day y Underwood, 1991). Se empleó como patrón una solución estandarizada de KSCN 0,002 M y como indicador 25  $\mu$ L de FeCl<sub>3</sub> 20% p/v con HNO<sub>3</sub> 1 M. La cuantificación del catión Ag<sup>+</sup> se produce por reacción del SCN<sup>-</sup>, el cual, en exceso (por ausencia de plata), reacciona con el Fe<sup>3+</sup>, generando el complejo coloreado rojizo [Fe(SCN)(H<sub>2</sub>O)<sub>5</sub>]<sup>2+</sup>, que indica el punto final de la titulación.

### 3.3 - Ensayo de Capacidad Deshidratante

Con el objeto de lograr una formulación de hidrogel que tenga la capacidad de reducir el contenido de agua de una UPD, se preparó una solución de alginato de sodio al 4% p/p suplementada con SdP al 5% p/p que fue empleada como base para dicho ensayo. Para una correcta homogeneización, la solución se colocó en un agitador mecánico vórtex (*CK-Tech*) durante  $7 \pm 2$  min.

Una vez obtenido el gel base, el mismo fue fraccionado en tres viales de 50 mL a los cuales agregó MgCO<sub>3</sub> en diferentes concentraciones 5, 10 y 20% p/p a fin de evaluar la capacidad higroscópica de cada uno. La sal fue elegida en base a sus propiedades higroscópicas y su aptitud para ser empleados en formulaciones medicinales. A continuación, se confeccionaron discos por duplicado de iguales a los descritos con anterioridad. Una vez completado el entrecruzamiento, se lavaron los discos con agua destilada 5 veces para eliminar el calcio remanente, evitando de esta manera que siga entrecruzándose y desplazando el agua de su estructura. Los mismos fueron luego secados con papel absorbente y pesados para obtener el dato de la masa inicial del hidrogel. Una vez obtenida la masa inicial, los hidrogeles se colocaron en viales independientes conteniendo cada uno 10 mL de solución fisiológica que fueron conservados a 4°C al abrigo de la luz.

A lo largo del ensayo, cada disco fue extraído, secado y pesado en balanza analítica (resolución 0,0001mg, *Ohaus*), registrando el tiempo de incubación alcanzado hasta el pesaje. Una vez pesados, los discos fueron colocados nuevamente en los respectivos recipientes con solución fisiológica y conservados a 4°C hasta el próximo pesaje. Se determinaron las masas en intervalos de tiempo durante una semana, aproximadamente.

Se calcularon variables tales como velocidad de deshidratación y relación de incorporación de agua en los diferentes tiempos de medición ( $t_1$  y  $t_2$ ), empleando la fórmula:

$$\text{Relación de Crecimiento} = \frac{\text{Masa}_{t_2}}{\text{Masa}_{t_1}}$$

A fin de verificar si existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con DGC como test *a posteriori*.

#### 4 - ANÁLISIS REOLÓGICO

Para el análisis reológico se prepararon suspensiones de alginato al 4% p/p con SdP al 5% p/p y distintas concentraciones de  $MgCO_3$  (0, 5, 10 y 20% p/p). Las muestras fueron preparadas 24 h previas al ensayo y se dejaron en reposo a 4°C con el fin de eliminar las burbujas de aire atrapadas. Dos horas antes del ensayo reológico, se prepararon los discos con  $CaCl_2$  3 M reaccionando durante 1 min. Los mismos fueron realizados por duplicado (Belalia & Djelali, 2014), y lavados con agua destilada 5 veces para eliminar el excedente de  $Ca^{2+}$  y frenar el entrecruzamiento. Dado que el  $MgCO_3$  tiende a nuclearse y formar cristales de gran tamaño en presencia de agua, se evaluaron diferentes concentraciones con el fin de establecer si la cantidad de sal era un factor condicionante.

Una vez listos los discos se procedió a su análisis mediante un Reómetro *Rheoplus Physica MCR 301* (Anton Paar) con geometría de placa PP8 (8 mm de diámetro de placa y 2,5 mm de separación) (Ilustración 23). El ensayo consistió en un barrido de amplitud a frecuencia constante y una segunda etapa de un barrido de frecuencia a amplitud contante. Ambas etapas se realizaron en cámara termoestabilizada a 37°C.



Ilustración 23- Reómetro Rheoplus Physica MCR 301 (Anton Paar).

Para el barrido de amplitud de tensión se fijó a 1 Hz para todas las muestras. El objetivo de esta etapa fue poder determinar la región viscoelástica lineal (RVL) de cada uno de los geles. A partir de estos datos se puede obtener un valor de deformación que se encuentre dentro de este rango para poder continuar con la siguiente etapa. En esta se varia la frecuencia entre 0,5Hz a 50 Hz a una

deformación obtenido en la instancia anterior. Los resultados obtenidos de este ensayo se calcularon y procesaron por medio del software Rheoplus® (Anton Paar) (Ilustración 24).

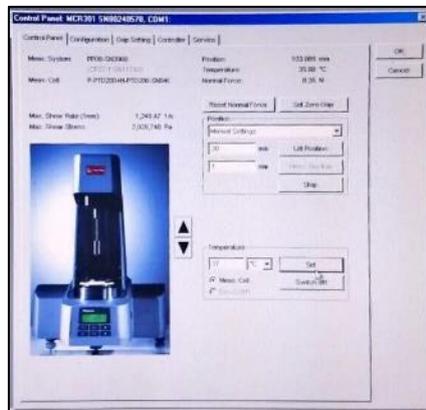


Ilustración 24 - Software utilizado para la realización del ensayo.

## 5 - ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD

A fin de establecer si el uso del producto desarrollado supone un riesgo para la salud, se efectuaron ensayos de citotoxicidad e irritación según las normas ISO 10993-5 e ISO 10993-10, respectivamente. En ambos casos se emplearon discos confeccionados con la formulación final de hidrogel suplementado (Alginato 4% p/p, SdP 5% p/p y MgCO<sub>3</sub> 5% p/p).

### 5.1 - Citotoxicidad

Para el ensayo de citotoxicidad se elaboraron extractos de hidrogel siguiendo las indicaciones de la Norma ISO 10993-12 (ISO, 1999). Para ellos, los discos de hidrogel listos y lavados se esterilizaron por sumersión en ácido peracético al 0,2% p/v. A continuación, en condiciones de esterilidad (cabina de flujo laminar), los discos se sumergieron en 1 mL de medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% p/v de Suero Fetal Bovino, 1% p/v de penicilina:estreptomina (1:1) y 1% p/v de glutamina. Para obtener el extracto, los discos fueron conservados a 37°C durante 24 ± 2 h. La evaluación de citotoxicidad *in vitro* se realizó empleando células epiteliales de riñón de mono verde (línea celular VERO). Como control positivo del ensayo se empleó dimetilsulfóxido puro, mientras que como control negativo se empleó el mismo medio de cultivo celular suplementado. Las células fueron levantadas con tripsina (5 min, 37°C) y se centrifugaron a 115 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el *pellet* con medio de cultivo celular. Se determinó el número de células viables totales por recuento en cámara de Neubauer (con tinción de azul Tripán) (Ilustración 25). La suspensión celular se ajustó a una densidad de 1x10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>. Se tomaron 100 µL de solución y se sembraron por sextuplicado en una placa de 96 pocillos.

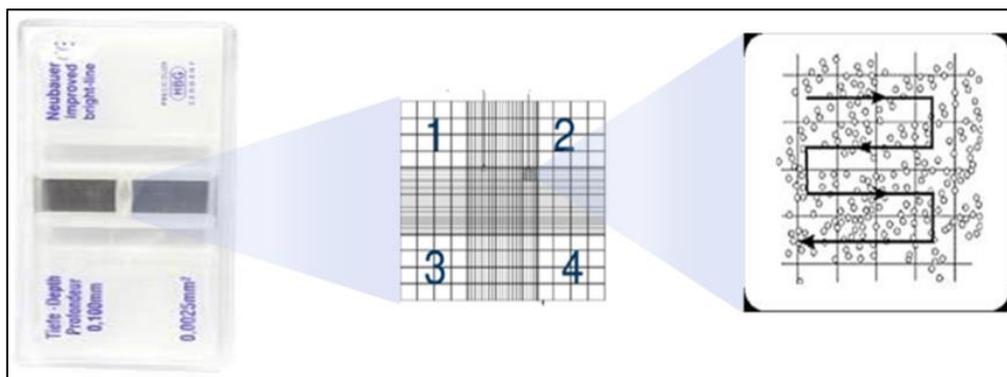


Ilustración 25 - Cámara de Neubauer.

Luego de 24 h de incubación, se aspiró el medio de cultivo sobrenadante y se agregó 100  $\mu\text{L}$  del extracto de muestra a cada pocillo, el control negativo y el control positivo (Ilustración 26). La placa fue luego en incubadora celular a 37°C por 24 h con atmósfera húmeda y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Una vez concluida las 24 h de incubación se retiró el medio de cultivo sobrenadante y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de la solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  en cada pocillo. Luego la placa se incubó durante 3 h más a 37°C. Una vez pasado el periodo de incubación, se retiró la solución de MTT sin eliminar los cristales formados y se añadió 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol para disolverlos (Ilustración 27). A continuación, se leyeron las absorbancias de cada pocillo empleando un lector de placas (*Thermo Cientific*) a 595 nm con referencia a 650 nm (Ilustración 28).

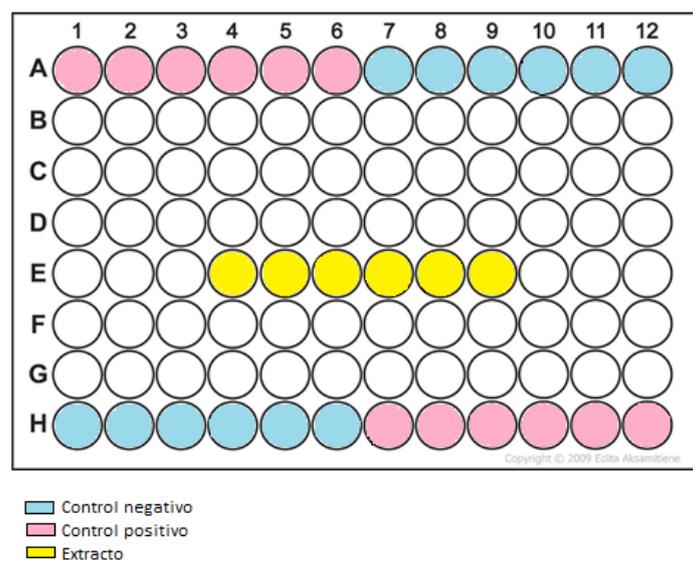
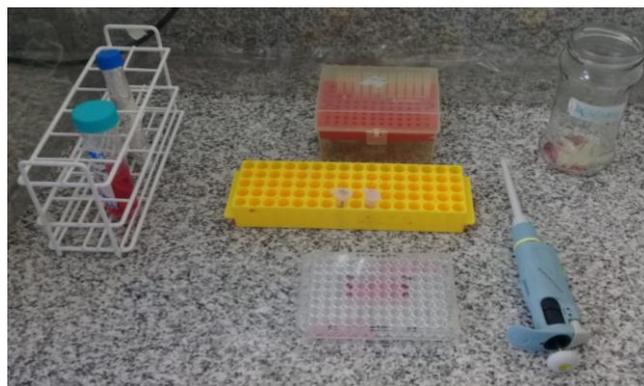


Ilustración 26 - Modelo de siembra en P96.



*Ilustración 27 - Ensayo de citotoxicidad.*



*Ilustración 28 - Lector de placas Thermo Cientific.*

Una disminución en el número de células vivas da como resultado una disminución en la actividad metabólica en la muestra. Esta disminución se relaciona directamente con la cantidad de formazán (azul-violeta) generado, un metabolito del MTT, según ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{100 * OD_{595e}}{OD_{595b}}$$

Donde  $OD_{595e}$  es el valor medio de la densidad óptica medida de los extractos de la muestra de prueba y  $OD_{595b}$  es el valor medio de la densidad óptica de los controles negativos. Cuanto menor sea el valor de viabilidad, mayor será el potencial citotóxico del elemento de prueba. Si la viabilidad se reduce a menos de un 70% del blanco se dice que el material tiene un potencial citotóxico.

## 5.2 - Irritación

Para el ensayo de irritación se elaboraron extractos de hidrogel siguiendo las indicaciones de la Norma ISO 10993-10 (ISO, 1999). Para ello, se colocaron 3 discos de hidrogel de formulación final, previa esterilización por sumersión en

ácido peracético al 0,2% p/v, en viales conteniendo 10 mL de buffer fosfato salino. Los viales fueron luego conservados a 37°C por 15 h.

Para el ensayo se emplearon ratas Wistar hembras clínicamente sanas y con piel intacta, con un peso aproximado de 700-1000 g, procedentes del Laboratorio de Neurofarmacología de la FCEFN (UNC). Los animales fueron alojados en jaulas de acero inoxidable en un ambiente adecuado a  $22 \pm 3^\circ \text{C}$  con fotoperiodo de 12 h. Se suministró agua y alimento *ad libitum* durante todo el ensayo. Los animales fueron identificados como Animal 1, Animal 2 y Animal 3.



Ilustración 29 - Ensayo de Irritación según ISO 10993-5. (A): Muestra de Hidrogel (B): Control negativo.

El ensayo se efectuó embebiendo un parche de algodón de 2,5 cm x 2,5 cm (Ilustración 29) con 1 mL de extracto, que se colocó sobre la piel desnuda y afeitada de los animales. Los parches fueron sujetos con gasa sellada en los extremos (a más de 1 cm del parche de algodón) con adhesivo de contacto instantáneo. Se empleó como control negativo 1 mL de buffer fosfato salino. Los parches fueron mantenidos en contacto directo con la piel por un período de 4 h. Después de dicho periodo, los parches se retiraron y se realizaron observaciones a 1, 24, 48 y 72 h posteriores. Se determinó el grado de irritación de acuerdo con el sistema de clasificación de la escala de Draize basado en la aparición de edema y eritema observados en cada sitio de aplicación. Se clasificó cada hidrogel de acuerdo con el Índice de Irritación Primaria y la tabla de clasificación presente en la norma.

## CAPÍTULO 3 - RESULTADOS -

### 1 - FORMULACIÓN DE HIDROGEL BASE

Para el análisis cualitativo, se evaluaron diferentes propiedades organolépticas de los hidrogeles formados (Tabla 7 y 8). A partir del mismo, se decidió descartar las soluciones de 2; 2,25; 2,5 y 2,75% p/p empleados con CaCl<sub>2</sub> 2,5 y 3 M por la falta de dureza y el interior acuoso observado.

CaCl <sub>2</sub> 2,5 M				
Alginato (% p/p)	Dureza	Transparencia	Resistencia a la Deformación	Disminución de Diámetro
2,00	1	5	1	2
2,25	1	5	1	2
2,50	2	4	1	2
2,75	2	4	2	3
3,00	3	4	2	3
3,25	3	3	3	4
3,50	4	2	3	4
3,75	4	2	4	5
4,00	4	2	5	5

*Tabla 7 - Caracterización cualitativa de hidrogeles con CaCl<sub>2</sub> 2,5M.*

CaCl <sub>2</sub> 3 M				
Alginato (% p/p)	Dureza	Transparencia	Resistencia a la Deformación	Disminución de Diámetro
2,00	1	5	1	2
2,25	2	4	1	2
2,50	2	4	2	3
2,75	2	3	2	3
3,00	3	3	2	3
3,25	4	3	3	4
3,50	4	2	4	5
3,75	5	1	5	5
4,00	5	1	5	5

*Tabla 8 - Caracterización cualitativa de hidrogeles con CaCl<sub>2</sub> 3 M*

En relación al análisis cuantitativo, se observa la variación del espesor externo en función del tiempo de las concentraciones de alginato al 3,0; 3,5 y 4% p/p, clasificadas además según la concentración de CaCl<sub>2</sub> empleado para la reacción

de polimerización (Ilustración 30) Como se observa, el espesor de la capa externa del hidrogel de las tres concentraciones de alginato analizadas es mayor en cuando la reacción se produce con  $\text{CaCl}_2$  2,5 M. Si bien el espesor externo del hidrogel formulado con alginato 3% y  $\text{CaCl}_2$  2,5 M fue el mayor obtenido, se decidió descartarlo ya que su interior permanecía acuoso, factor que no favorece para el uso previsto del producto.

En resumen, mediante el análisis cualitativo y cuantitativo se decidió eliminar como alternativa las concentraciones de alginato de 2 al 3% p/p inclusive, y  $\text{CaCl}_2$  2,5 M. Por lo tanto, en ensayos posteriores sólo emplearon soluciones de alginato al 3,5% p/p y 4,0% p/p y  $\text{CaCl}_2$  3M.

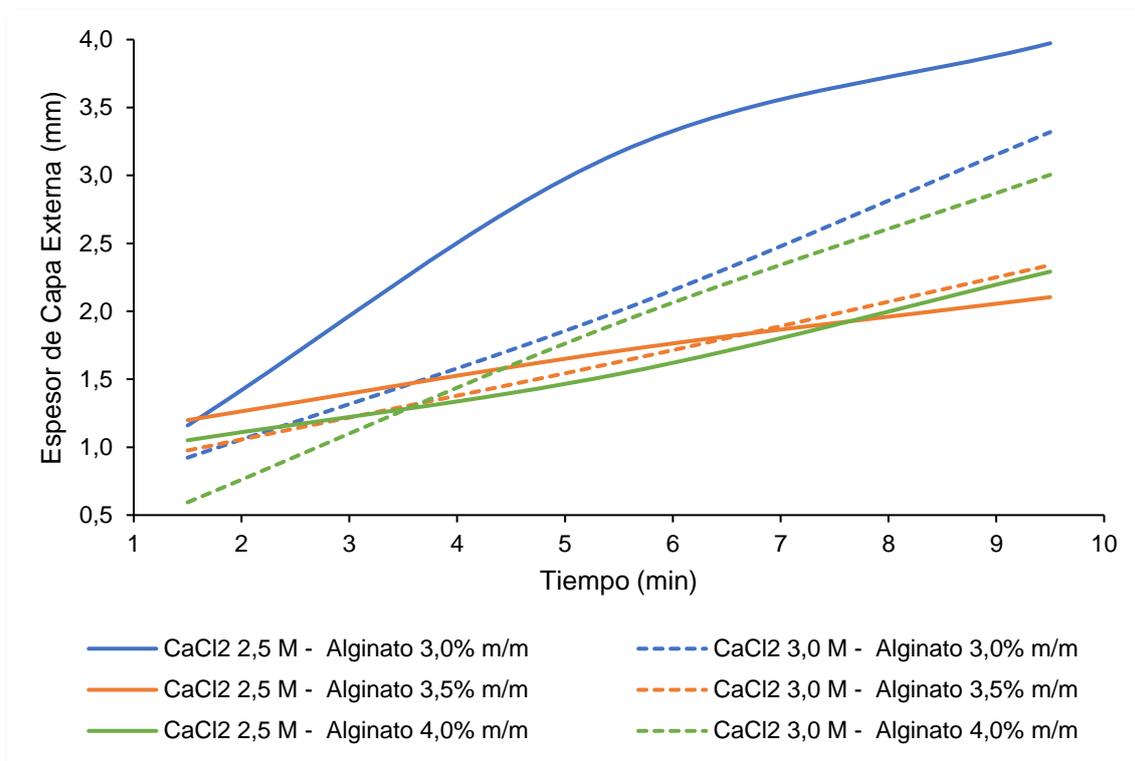


Ilustración 30 - Espesor de capa externa vs. tiempo.

## 2 - CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

A través del análisis por microscopía confocal se comprobó que el hidrogel posee una estructura polimérica de células abiertas, conformado por una red de espacios interconectados por canales (Ilustración 31) que resulta ser independiente de la concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$  empleado. Los valores obtenidos a través del análisis de las micrografías de las células se muestran en la Tabla 9.

Células	Ancho (μm)	Profundidad (μm)	Largo (μm)	Volumen Elipsoide (μm <sup>3</sup> )	Proporción (mayores/menores)
Mayores (M)	297	134	333	6939115	19,26
Menores (m)	115	31	193	360260	

Tabla 9 - Tamaño de las células. Los valores se expresan como medias.

Se puede observar que, si bien las células mayores presentan un volumen 20 veces superior al de las menores, se encuentran en menor cantidad (del orden de 1 mayor cada 15 menores). Estas células podrían actuar como reservorio de fluidos, promoviendo la lenta liberación de las sustancias activas (SdP). Por otra parte, las células menores, al encontrarse encadenadas, facilitarían la comunicación de los espacios mayores, actuando como canales que controlarían el flujo de sustancias disueltas, promoviendo la liberación al exterior. De esta forma se puede comprobar que la matriz de hidrogel podría facilitar el desplazamiento de fluidos desde y hacia el interior de la misma, permitiendo incrementar dicho intercambio al sumar un sistema de corriente de líquidos a la propia e intrínseca de la matriz sólida del gel.

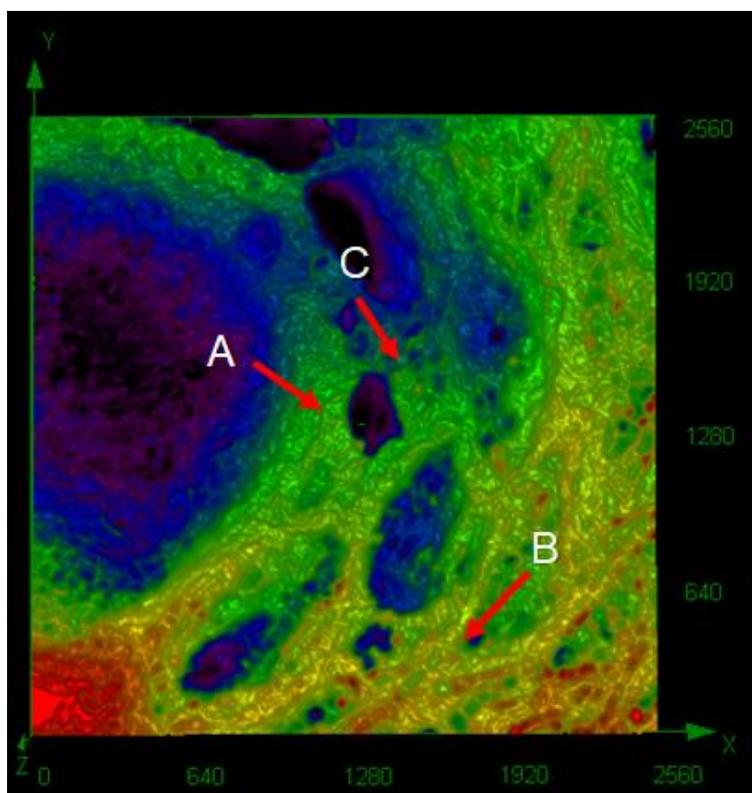


Ilustración 31 - Imagen del hidrogel de alginato base al 4% p/p. (A), célula mayor, (B) célula menor; (C) poro cortado transversalmente que comunica dos células.

### 3 - ANÁLISIS QUÍMICO

#### 3.1 - Ensayo de Difusión

Los resultados del ensayo de difusión se muestran en la Ilustración 32. La concentración de azul de metileno fue medida a 651 nm, contrastando los resultados a 609 nm. Los datos se muestran como la relación porcentual de azul de metileno que migró desde el hidrogel a la solución en el tiempo. Se puede observar que, a mayor tiempo, menor es la diferencia existente entre las dos concentraciones de alginato ensayadas. Se observó que no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones de alginato, por lo que resulta indistinto emplear una u otra concentración en la fórmula base. Esto otorga cierta independencia en la selección de la solución de alginato, por lo que dicha selección se realizó en función de las características físicas, decidiéndose trabajar el resto del proyecto con alginato de sodio al 4% p/p y  $\text{CaCl}_2$  3 M.

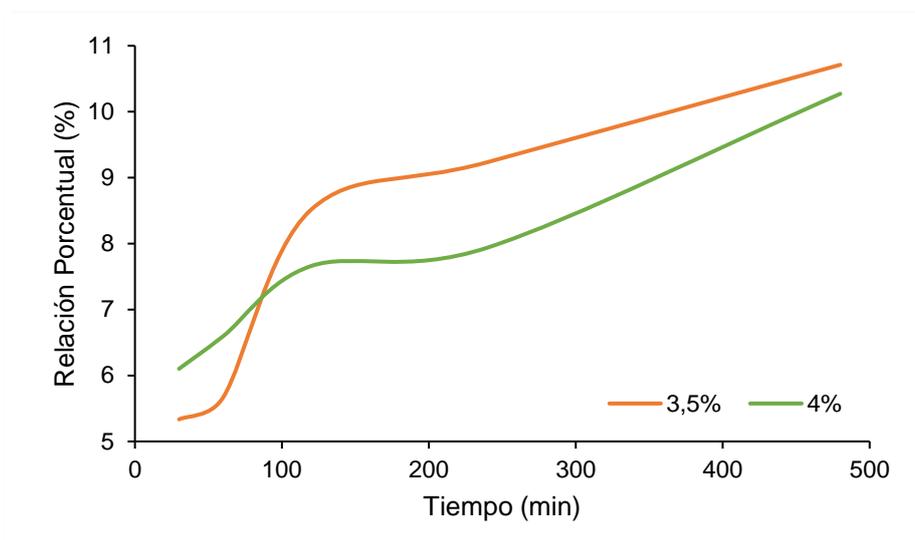


Ilustración 32 - Relación porcentual en función del tiempo analizado.

#### 3.2 - Ensayo de Capacidad Antiséptica

##### 3.2.1 - Concentración Inhibitoria Mínima

La tabla 10 muestra los resultados de la CIM. Se puede observar que los tubos con solución fisiológica se necesita una mayor concentración de sulfadiazina para inhibir la replicación bacteriana, respecto del caldo. Esto puede deberse a que en caldo la SdP difundió por 1 h antes de colocar el inóculo, por lo que la difusión de esta superó al crecimiento bacteriano. En conclusión, se decidió trabajar con una concentración de sulfadiazina de plata al 5% p/p.

Medio	Inóculo (células mL <sup>-1</sup> )	Sulfadiazina de Plata (% p/p)						
		0	0,01	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0
Caldo	1500	+	+	+	-	-	-	-
	3750	+	+	+	+	-	-	-
	7500	+	+	+	+	-	-	-
Solución Fisiológica	1500	+	+	+	+	-	-	-
	3750	+	+	+	+	+	-	-
	7500	+	+	+	+	+	-	-

Tabla 10 - Resultados de la CIM. Signo (+) indica la presencia de bacterias, signo (-) su ausencia.

### 3.2.2 - Ensayo de Difusión

El ensayo de difusión de SdP no arrojó resultados concluyentes ya que no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de titulante empleado en los distintos tratamientos. Las variaciones pueden deberse a reacciones inespecíficas del titulante con otros agentes en solución, tales como iones Ca<sup>2+</sup>, alginato e impurezas, así como con el catión Fe<sup>3+</sup> empleado como indicador. Mas aún, la posibilidad de que en las muestras hubiere una concentración de iones Ag<sup>+</sup> inferiores a los cuantificables, dada por la baja solubilidad de la SdP (0,13 mg mL<sup>-1</sup> a pH 5,5), puede haber sido un factor determinante. No obstante, se comprobó que el límite de cuantificación de la técnica (dado por la media  $\pm$  3 desvíos estándares del volumen de una muestra blanco) resultó ser notablemente superior a la solubilidad del compuesto (71,4 mg mL<sup>-1</sup>). De esta forma, si bien no se hallaron diferencias entre los tratamientos, no puede descartarse la posibilidad de variaciones de concentración entre los distintos hidrogeles.

Si bien existe la posibilidad de cuantificar la SdP en solución por otras técnicas tales como HPLC (Ministerio de Salud de la Nación, 2003) o ICP-MS, el presente ensayo tenía como objetivo confirmar hipótesis surgidas de los resultados obtenidos en el ensayo de CIM, tales como determinar si la inhibición se genera por difusión de la SdP al medio o por contacto directo de los microorganismos con el disco. En todo caso, los resultados obtenidos hasta el momento resultan satisfactorios, por lo que el hecho de no haber observado diferencias significativas entre los distintos tratamientos no representa un obstáculo mayor para la continuidad del proyecto.

### 3.3 - Ensayo de Capacidad Deshidratante

Los resultados del ensayo de capacidad deshidratante del hidrogel respecto a la UPD se muestran en las Ilustraciones 33 y 34. En primera instancia se analizó la variación temporal de masa en el tiempo para cada concentración de MgCO<sub>3</sub>. En la Ilustración 33 se observa que hasta los 270 min existe un comportamiento lineal en las diferentes concentraciones de MgCO<sub>3</sub> luego del cual sigue una meseta, compatible con la saturación del gel. Mas allá de este

efecto, se puede notar que el hidrogel suplementado con 5% p/p de  $\text{MgCO}_3$  presentó la mayor diferencia de masa lo que sugiere una mayor capacidad de absorción. Esto puede deberse a que los cristales de la sal tienden a agruparse en conglomerados de mayor tamaño en presencia de agua, formando una capa que impide la difusión hacia su interior. Por lo tanto, en los hidrogeles con mayor contenido de  $\text{MgCO}_3$  los cristales se encuentran más cerca pudiendo aglomerarse más fácilmente, reduciendo su capacidad higroscópica (Liptrot, 1978). Se puede observar además que el hidrogel suplementado con 5% p/p de  $\text{MgCO}_3$  presenta el mejor coeficiente de regresión, por lo que fue posible calcular una ecuación de regresión que permita estimar la vida útil del hidrogel respecto de capacidad higroscópica.

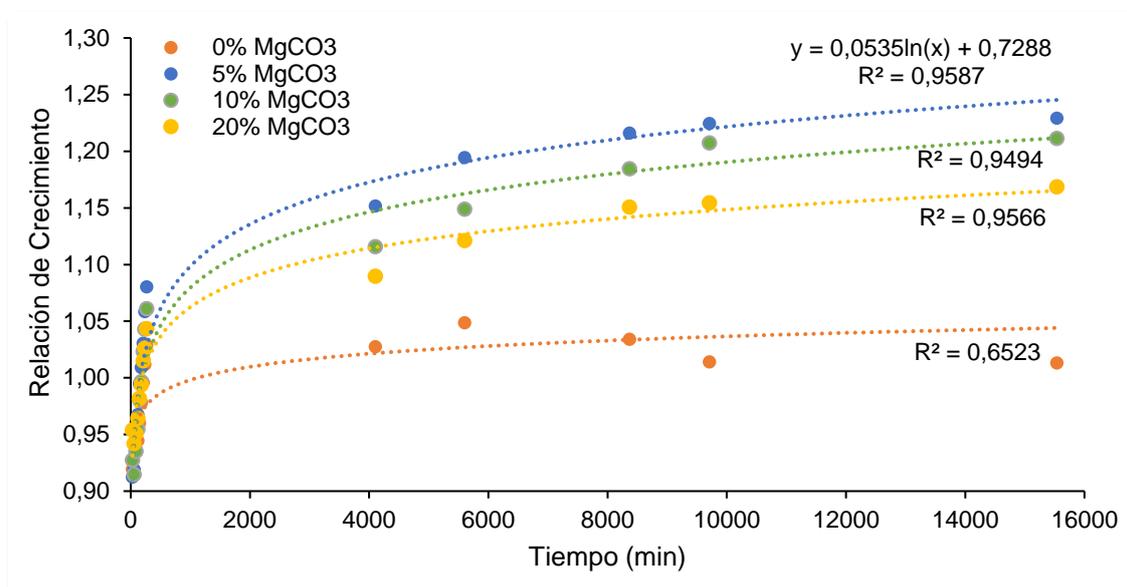


Ilustración 33 - Relación de crecimiento en función del tiempo.

Al realizar el análisis de la varianza se obtuvieron los datos mostrados en la Ilustración 34, encontrándose diferencias significativas entre los distintos hidrogeles suplementados respecto del no suplementado. Se puede constatar además que, a partir de los 270 min, el hidrogel con 5% de  $\text{MgCO}_3$  presenta la mayor capacidad higroscópica, significativamente mayor al resto. Sin embargo, esta diferencia deja de observarse a partir de los 6 días aproximadamente, momento a partir del cual el hidrogel con 10% de  $\text{MgCO}_3$  no muestra diferencias significativas respecto del primero. Esto puede implicar la saturación de ambos hidrogeles o bien que el de mayor concentración aún conserva capacidad higroscópica. No obstante, observando ambos gráficos se puede concluir que el primer efecto es el que prima.

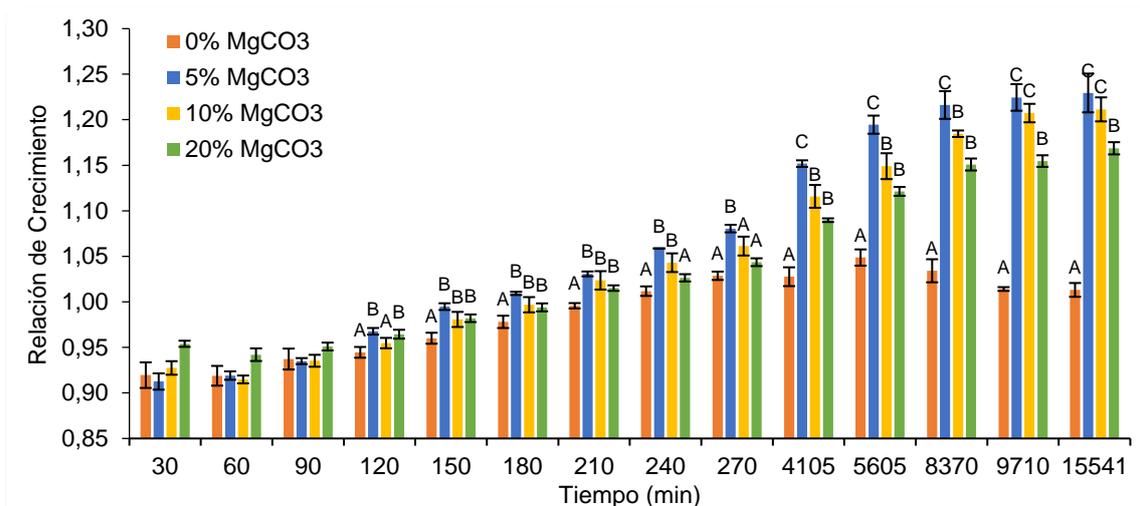


Ilustración 34 - Relación de crecimiento de cada concentración de carbonato de magnesio en función del tiempo analizado. Los valores en cada columna seguidos por una letra distinta son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a la velocidad de incorporación de agua (velocidad de crecimiento, expresada como  $\text{mg min}^{-1}$ ) se observa que, si bien el hidrogel con mayor concentración de  $\text{MgCO}_3$  presenta la mayor velocidad de crecimiento, la fase inicial presenta una elevada velocidad de absorción de agua en todos los casos, que va decayendo a medida que pasa el tiempo (Ilustración 35). Este resultado permite corroborar la hipótesis de que el efecto de saturación es el responsable de que no se observen diferencias significativas en la capacidad higroscópica después de un tiempo determinado.

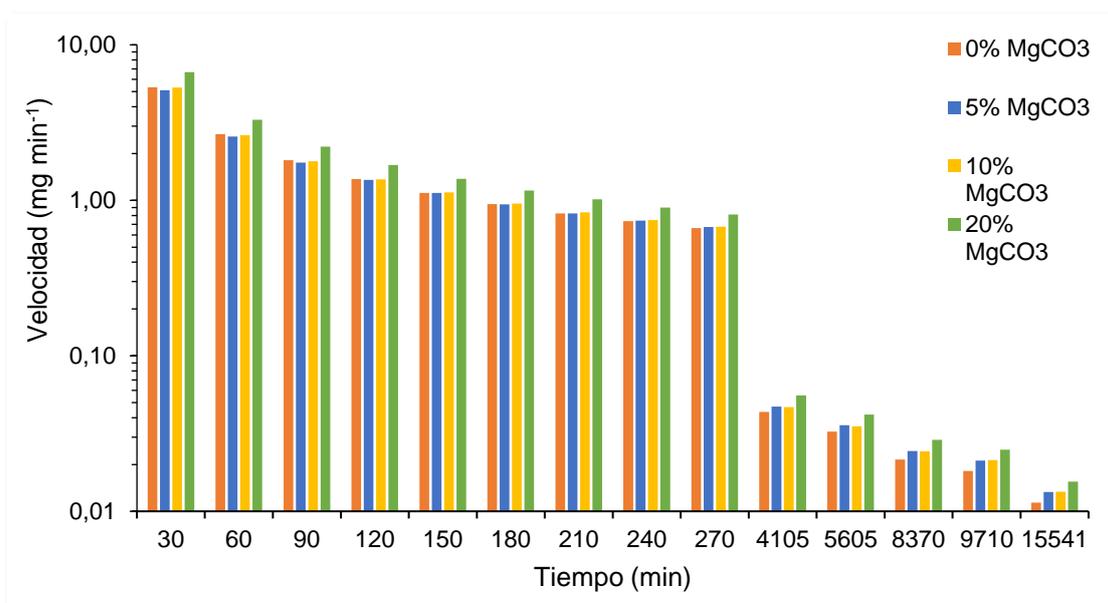


Ilustración 35 - Velocidad de crecimiento en función del tiempo.

#### 4 - ENSAYO REOLÓGICO

A través del ensayo reológico se obtuvieron los valores de  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan(\delta)$  de cada muestra de hidrogel base con SdP y suplementada con  $MgCO_3$  al 5, 10 y 20% p/p. Se obtuvieron valores de media que fueron graficados en función de la frecuencia angular ( $\omega$ ) con un rango de 0,5 Hz hasta 50 Hz. Las muestras analizadas presentaron un predominio de  $G'$  sobre  $G''$  ( $G' > G''$ ) en el rango de frecuencia estudiado. Esto revela un comportamiento del sistema más similar a un sólido viscoelástico, donde las deformaciones son esencialmente elásticas y recuperables (Rao, 1999). En la ilustración 36 se observa la ausencia de un punto de cruce entre los módulos  $G'$  y  $G''$ , comportamiento característico de un gel débil (Espinosa et al., 2014).

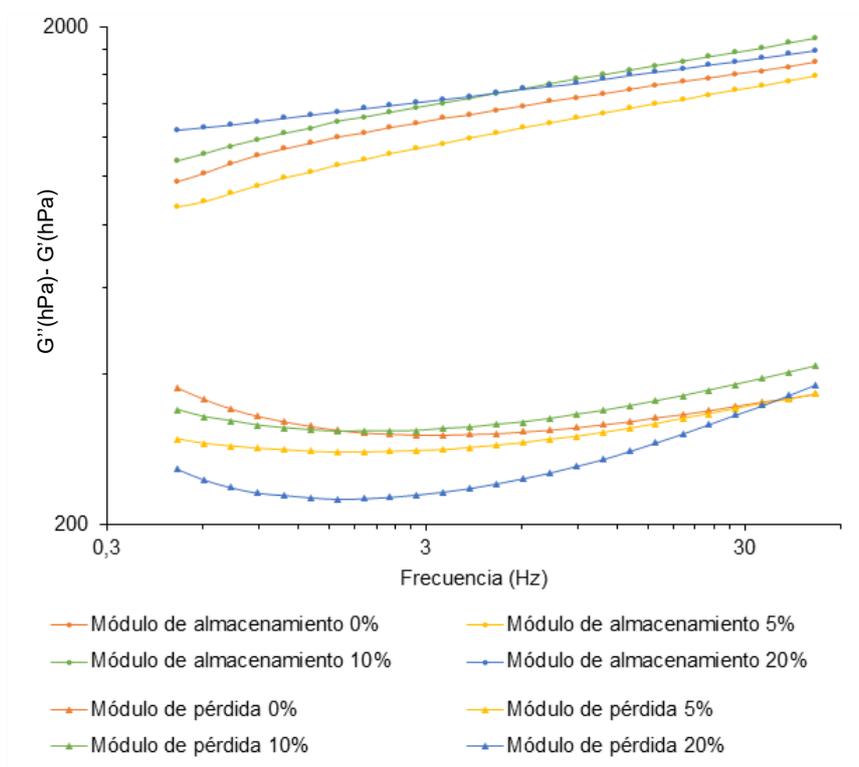


Ilustración 36 - Gráfica de los diferentes  $G'$  y  $G''$  de los alginatos con sulfadiazina argéntica con diferentes concentraciones de carbonato de magnesio.

Teniendo en cuenta que el hidrogel ensayado presenta características de geles débiles y de geles fuertes, se considera incorrecto encuadrarlo dentro de una sola clasificación, por lo que concluimos que no es ni débil ni fuerte. Por otra parte, el estudio del módulo de almacenamiento demostró que el mismo no varía considerablemente con el agregado del carbonato de magnesio a lo largo de todo el rango de frecuencia. Los valores de  $G'$  fueron levemente dependientes de la frecuencia en las muestras (Ilustración 37), es decir, no hubo incrementos significativos con una frecuencia más alta, lo que sugiere que el gel puede considerarse un gel tendiendo a ser fuerte, con comportamiento viscoelástico poco dependiente de la frecuencia.

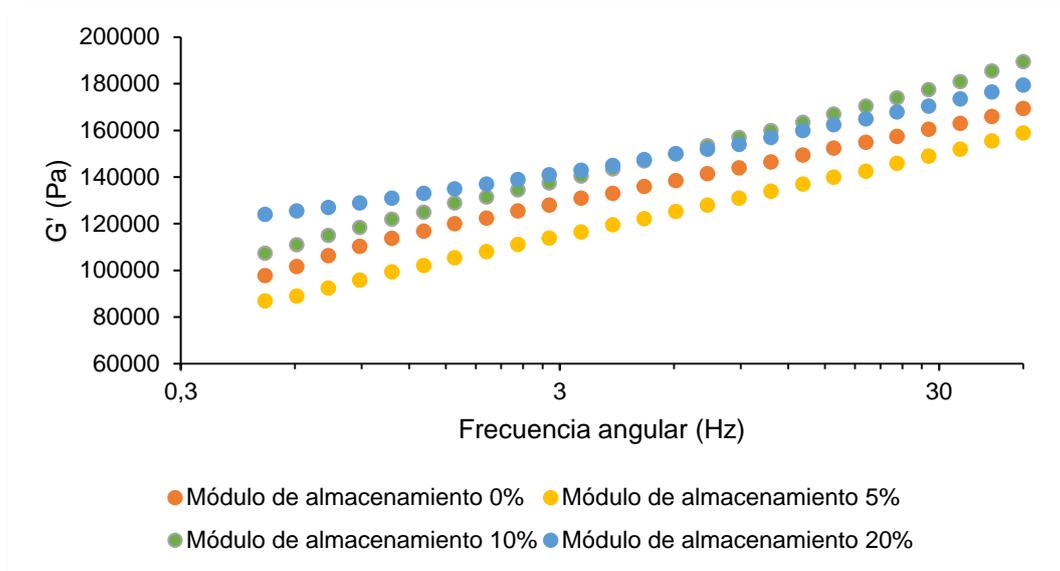


Ilustración 37 - Módulo de almacenamiento vs. frecuencia angular.

Respecto a los valores obtenidos y graficados del módulo de pérdida ( $G''$ ), tampoco hubo incrementos significativos en los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) con una frecuencia más alta, lo que indica que el comportamiento viscoelástico fue poco dependiente de la frecuencia (Ilustración 38). Por otro lado, como la pendiente con la cual disminuye  $G''$  es suficientemente pequeña, es posible considerar que esta zona se aproxima a un comportamiento viscoelástico.

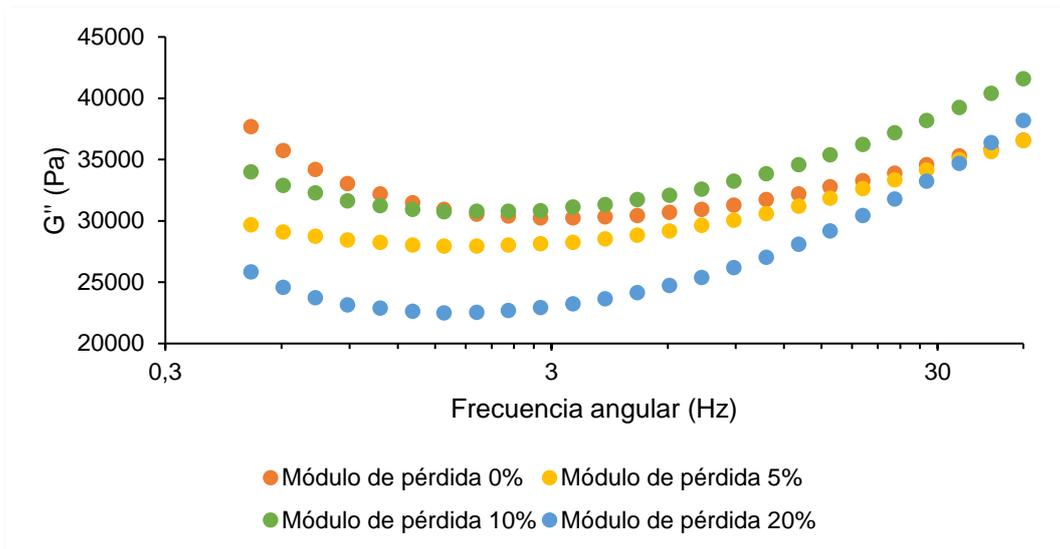


Ilustración 38 - Módulo de pérdida vs. frecuencia angular

Otra manera de describir el comportamiento de un material es visualizando los valores de la tangente del ángulo de desfasaje. Al observar la gráfica

(Ilustración 39) se puede notar que los resultados de las mediciones en los distintos hidrogeles se encuentran en valores intermedios entre cero y uno, por lo que se puede concluir que el comportamiento de los geles es viscoelástico, siendo el hidrogel con concentración de carbonato de magnesio al 20% p/p el que más se acerca al valor de cero (que puede estar relacionado con una respuesta más elástica) y diferenciándose significativamente de los demás hidrogeles (Tabla 10).

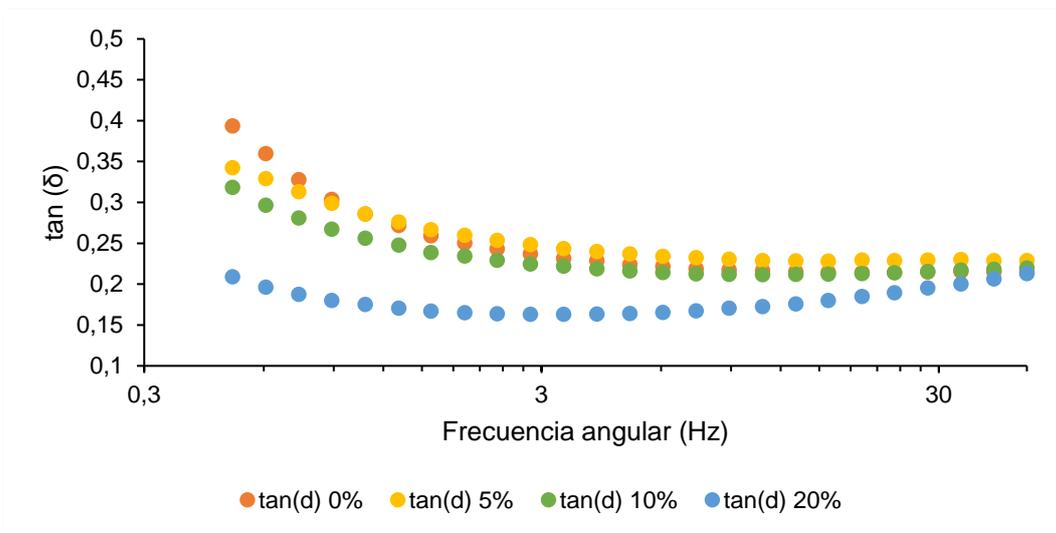


Ilustración 39 - Tangente del ángulo de desfase vs. frecuencia angular.

Para visualizar los cambios producidos en el gel de alginato con SdP al adicionar carbonato de magnesio, se evaluaron los mismos comparando las medias de las variables  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan(\delta)$  en los diferentes niveles de concentración mediante análisis de varianza con LSD Fisher como test *a posteriori*. Se observa que no hay cambios significativos en los valores al adicionar carbonato de magnesio, lo que representa un aspecto positivo, ya que el comportamiento reológico del hidrogel no se ve afectado por la suplementación de la sal, de modo que no interfiere en las propiedades físicas deseadas para el producto.

MgCO <sub>3</sub> (% p/p)	G' (HPa)		G'' (HPa)		tan(δ)	
	$\bar{X} \pm s$	A	$\bar{X} \pm s$	A	$\bar{X} \pm s$	A
0	1137 ± 272	A	322 ± 52	A	0,29 ± 0,02	B
5	993 ± 349	A	282 ± 91	A	0,29 ± 0,01	B
10	1220 ± 176	A	312 ± 0,71	A	0,26 ± 0,001	B
20	1320 ± 113	A	229 ± 13	A	0,18 ± 0,004	A
p-valor	0,6023		0,4029		0,0019	

Tabla 11 - ANOVA de las mediciones reológicas a 1 Hz. Los valores en cada columna seguidos por una letra diferente son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 5 - ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD

### 5.1 - Citotoxicidad

Los resultados del ensayo de citotoxicidad realizados sobre la formulación final del hidrogel fueron analizados y graficados empeando el software *GraphPad Prism 8.0.0*. En la ilustración 40 se puede comprobar que la citotoxicidad de la formulación final es de 51,32%, por debajo del valor preestablecido como límite según la norma ISO 10993. Sin embargo, según los resultados obtenido, el hidrogel de alginato con sulfadiazina y carbonato de magnesio es potencialmente citotóxico. Esto puede deberse a la presencia de partículas conteniendo catión  $Ag^+$ , cuya toxicidad intrínseca depende del tamaño, forma, superficie, carga, solubilidad y estado de aglomeración de las mismas. Más aún, algunas investigaciones *in vitro* demuestran que dichas partículas son tóxicas para las células de mamífero, y su exposición conlleva efectos inflamatorios, oxidativos y genotóxicos (Ávalos et al., 2013).

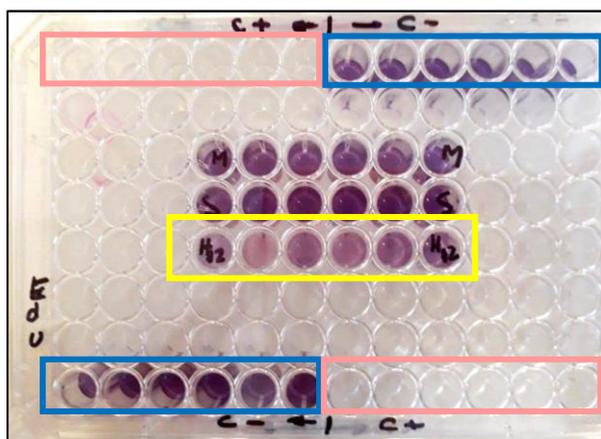


Ilustración 40 - Resultados de Ensayo MTT. En la parte superior e inferior figuran los controles positivos (en azul) y negativos (en rosado). En la parte central (en amarillo), la inscripción  $H_{12}$  muestra el extracto de hidrogel a las 12 h.

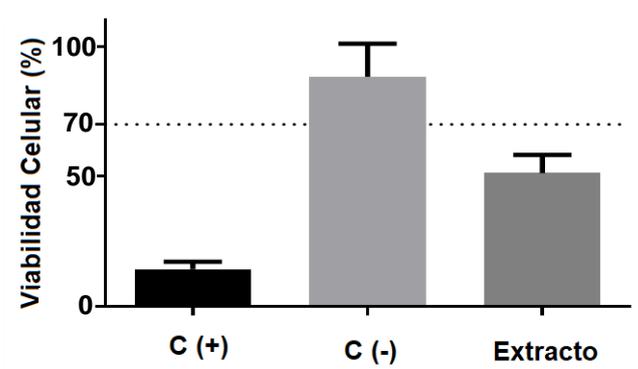


Ilustración 41 - Resultados del ensayo de citotoxicidad. Los valores se muestra como media  $\pm$  desvío estándar. La categoría "Extracto" refiere al extracto obtenido de la incubación por 12 h del hidrogel de formulación final.

## 5.2 - Irritación

Tras el período de exposición de 4 horas no se observaron cambios significativos (edemas ni eritemas) en la piel de los animales, con excepción del Animal 2 en el cual se observó una muy leve irritación (Tabla 12; Ilustración 42), la cual desapareció transcurridas 48 h.

Caso	Sumatoria de Eritema y Edema			Cálculo
	24 h	48 h	72 h	
Animal 1	0	0	0	0
Animal 2	1	0	0	1
Animal 3	0	0	0	0
Total				1

Tabla 12 - Puntuación de los signos de irritación registrados.

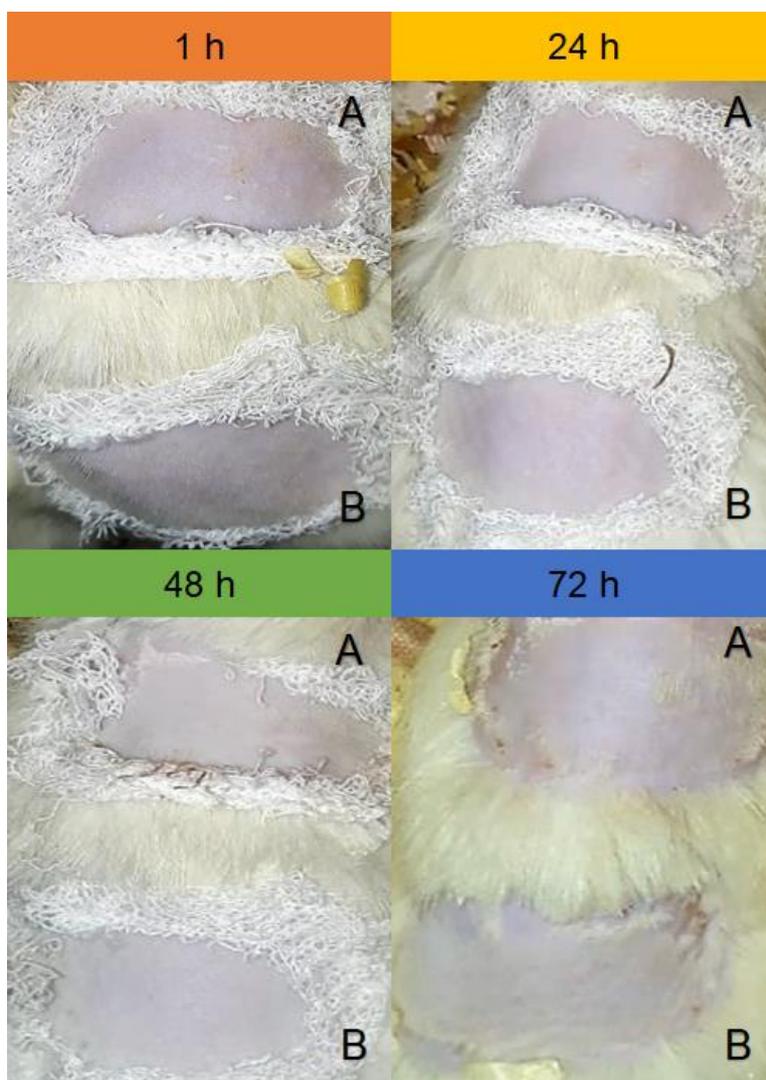


Ilustración 42 - Ensayo de Irritación en las diferentes horas. (A): Muestra del Hidrogel. (B): Control Negativo (PBS).

El cálculo del Índice de Irritación Primario (IIP) se efectuó teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de las 24 h tal como se plantea en la norma ISO correspondiente. Se obtuvo un IPP de 0,11 lo que permitió clasificar al producto final (Alginato 4% p/p suplementado con SdP 5% p/p y MgCO<sub>3</sub> 5% p/p) como una sustancia que no presenta potencial irritante.

## 6 - ANÁLISIS DE COSTOS

Para el análisis económico se tuvo en cuenta tres grupos de costos: insumos, servicios y mano de obra (Tabla 13). El primer ítem contempla los gastos de materiales generales, tales como materia prima y embalaje. Los servicios contemplan los costos de análisis de caracterización del material realizados por única vez, como por ejemplo los ensayos reológicos, de biocompatibilidad o microbiológicos, así como el diseño de embalajes. Por última, la mano de obra contempla la remuneración del profesional encargado del diseño y desarrollo del producto.

Debe aclararse que se consideraron solo aquellos gastos inherentes al desarrollo de este proyecto, sin contemplar otros gastos como servicio de electricidad, agua, alquileres, equipos y herramientas o líneas de producción, controles de calidad exigidos por el organismo regulador, logística, etc.

Cantidad / Unidad	Categoría	Concepto	Valor Unitario (\$)	Valor Total (\$)
8 gramos	Insumos	Alginato de Sodio	1	8
17 gramos	Insumos	CaCl <sub>2</sub>	0,66	11
10 gramos	Insumos	SdP	90	900
10 gramos	Insumos	MgCO <sub>3</sub>	0,15	1,15
1 unidad	Insumos	Embalaje	75	75
1 prestación	Insumos	Diseño de embalaje	7284	7284
4 horas	Servicios	Reometría	20	80
1 ensayo	Servicios	Citotoxicidad	6000	6000
1 ensayo	Servicios	Sensibilización	25000	25000
1 ensayo	Servicios	Irritación	11950	11950
1 ensayo	Servicios	CIM	700	700
480 horas	Mano de Obra	Hora I+D	162,5	78000
<b>Total</b>				<b>130009</b>

Tabla 13 - Análisis de costos inherentes al proyecto.

Respecto al último inciso, los cálculos se efectuaron estipulando a un Ingeniero Biomédico como el profesional encargado de desarrollo y elaboración del producto. Así, el Colegio de Ingenieros Especialistas de Córdoba establece, para un ingeniero recién recibido y sin experiencia, un sueldo mínimo de

\$26000<sup>23</sup> por mes de trabajo en investigación y desarrollo (I+D), por lo que considerando una semana laboral de 40 horas, se determina que el precio por hora de trabajo es de \$162,5.

Como se puede constatar, el valor de inversión inicial para la realización de un producto como el desarrollado en este proyecto integrador es de \$130009. Si bien los costos de I+D son elevados, los mismos se suelen distribuir en el producto final o bien se amortizan a largo plazo.

Por último, se prevé una presentación final del producto en pomada de 200 g constituida por una solución de alginato de sodio al 4% p/p, suplementada con SdP y MgCO<sub>3</sub> al 5% p/p. El producto vendría acompañado con 10 apósitos de 10 cm x 10 cm humedecidos con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 3 M cada uno. Bajo esta presentación, se estima el costo unitario del producto en \$920,15 (Tabla 14). Sin embargo, debe notarse que este cálculo no contempla a la escalabilidad, siendo esta un factor atenuante esencial.

<b>Producto Final (x 200g, sin embalaje)</b>	
Alginato de sodio 4% p/p	\$ 8,00
Sulfadiazina de Plata 5% p/p	\$ 900,00
Carbonato de magnesio 5% p/p	\$ 1,15
10 apósitos con 5 mL de Cloruro de calcio 3 M	\$ 11,00
<b>Total</b>	<b>\$920,15</b>

*Tabla 14 - Detalle de composición y costo de producto final.*

---

<sup>23</sup> <http://www.ciec.com.ar/sitio/aranceles.php>

## CONCLUSIONES

Como resultado del proyecto integrador se obtuvo un hidrogel a base de alginato capaz de absorber el exudado de una úlcera diabética gracias a la adición de carbonato de magnesio, y con capacidad antiséptica debido a la adición de sulfadiazina de plata. De esta manera no sólo se cumple con el objetivo principal planteado, sino que además se obtiene un producto apto para ser empleado como soporte en UPD, permitiendo una efectiva y mejor curación del cuadro clínico.

En relación a los objetivos específicos, se logró determinar las concentraciones óptimas de los reactivos mediante el análisis de propiedades estructurales para formular un hidrogel base. Además, se logró suplementarlo con un agente bacteriostático e higroscópico y evaluar su comportamiento reológico. Finalmente, fue necesario analizar las propiedades citotóxicas e irritantes del producto final según Norma de evaluación biológica para dispositivos médicos, ISO 10993, donde se comprobó el moderado potencial citotóxico y el bajo índice de irritación primaria, dando como resultado un hidrogel no irritante.

Si bien los objetivos generales y específicos planteados fueron cumplidos satisfactoriamente, se presentaron, en la realización de los ensayos, ciertas dificultades, como la falta de práctica en las técnicas aplicadas, falla en las concentraciones y tiempos utilizados, e inconvenientes en la adquisición de determinados reactivos.

Por otra parte, no sería apropiado dar por finalizada la tarea de encontrar un producto de alta calidad para la mejora de la calidad de vida de las personas, por lo que se proponen mejoras a futuro, tales como:

- Desarrollo de formas de uso, tales como apósitos, de manera que la aplicación del hidrogel de alginato con sulfadiazina de plata y carbonato de calcio junto con el gelificante no implique incomodidad al paciente, y se pueda realizar con el menor requerimiento de personal especializado posible.
- Ampliar y profundizar los estudios y ensayos realizados sobre el hidrogel, con el fin de optimizar las diferentes concentraciones y estudiar posibles agregados para aumentar la eficacia del producto.
- Profundizar la investigación sobre los efectos adversos de la plata y su aplicación en productos tópicos.
- Investigar y profundizar el aspecto de biocompatibilidad del producto, para mejorarlo y evitar posibles lesiones a los pacientes, considerando la posibilidad de realizar ensayos *in vivo*.
- Realizar ensayos clínicos en pacientes con UPD a fin de corroborar el correcto funcionamiento del producto e incorporar mejoras de ser necesario.

Por último, a nivel personal, la realización de este proyecto requirió integrar conocimientos de diferentes campos con el fin de encontrar soluciones a problemas relacionados con la prevención y promoción de salud de la población; proceso que, si bien en un principio significó un gran desafío, al final se transformó en una experiencia sumamente enriquecedora. Esperamos que el futuro los resultados de este proyecto deriven en el desarrollo de nuevos productos que brinden soluciones prácticas y permitan mejorar la calidad de vida de las personas que padecen complicaciones derivadas de la diabetes.

## BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- ALAD - Asociación latinoamericana de diabetes. Castro Martínez MG, Costa Gil J, Fuente G, García de los Ríos M, Lara A, Lopresti A. Guía práctica en el manejo de la polineuropatía diabética: Neuralad. [Internet]. 2010 [citado 19 septiembre 2018] Disponible en: [http://alad-americalatina.org/wp-content/uploads/2016/10/Polineuropatia\\_diabetica\\_2010.pdf](http://alad-americalatina.org/wp-content/uploads/2016/10/Polineuropatia_diabetica_2010.pdf)
- Arévalo J. M, Arribas J. L, Hernández M. J, Herruzo M. L. Guía de utilización de antisépticos. 1998; 1–11.
- Ávalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* [Internet]. 2013 [citado 20 septiembre 2018]; 7(2): 1–23. Disponible en: [https://doi.org/10.5209/rev\\_RCCV.2013.v7.n2.43408](https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408)
- Avendaño Romero G. C, López Malo A. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* [Internet]. 2013 [citado 15 agosto 2018]; 14(6):549–562. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0887-6185\(00\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S0887-6185(00)00049-9)
- Belalia F, Djelali N. E. Rheological properties of sodium alginate solutions. *Revue Roumaine de Chimie*. 2014; 59(2): 135–145.
- Calvagno M.S., Varela M. C. Recomendaciones sobre prevención, diagnóstico y tratamiento del pie de diabético. 2009.
- Chadwick P, Jeffcoate W, McIntosh C. How can we improve the care of the diabetic foot? *Wounds UK*. 2013; 4(4): 144-48.
- Cho NH, Whiting D, Forouhi N, Guariguata L, Hambleton I, Li R, Atlas de la diabetes de la FID. 7ª ed. 2015
- Day Jr, Underwood A. L. Quantitative analysis. Prentice-Hall.1991.
- del Castillo Tirado RA, Fernández López JA, del Castillo Tirado FJ. Guía de práctica clínica en el pie diabético. *Arch Med*. 2014; 10(1): 1–17.
- Draget K.I, Smidsrod O, Skjak-Braek G. Alginates from Algae. *Biopolymers*. [Internet]. 2005 [citado 20 de agosto 2018]; 1–30. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol6008>
- Espinosa L, Bernard B, Flores H. Caracterización reológica de geles de liberación modificada y su cuantificación en suero. 2014.
- García J. Viscoelasticidad lineal. [Internet] 2008 [consultado 10 agosto 2018]; 23–25. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10045/3624>
- González Alvarado E. Estabilidad e Intercambio de Iones Calcio en Geles de Alginato. 2009; 1–44.
- González de la Torre H, Luana Quintana Lorenzo E, Perdomo Pérez E, González de la Torre, H. C, Juan Antonio Arencibia Ponce A. Classifications of injuries on diabetic foot. A non-solved problem. *Gerokomos* [Internet]. 2012

- [consultado 10 julio 2018]; 23(4), 75–87. Disponible en: <https://doi.org/10.4321/S1134-928X2012000200006>
- Hoffman Alan S. Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation. Elsevier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013
- IWGDF- International Working Group on Diabetic Foot Bus S. A, Armstrong D. G, van Deursen R. W, Lewis J, Caravaggi C. F, Cavanagh P. R. Guidance on footwear and offloading interventions to prevent and heal foot ulcers in patients with diabetes. 2015. Disponible en: [http://www.iwgdf.org/files/2015/website\\_footwearoffloading.pdf](http://www.iwgdf.org/files/2015/website_footwearoffloading.pdf)
- Koneman EW, Allen S. *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color*. 6ª ed. Editorial Médica Panamericana; 2008.
- Latarjet M, Ruíz Liard A. *Anatomía Humana. Volumen II*. Barcelona: Editorial Médica Panamericana; 1993.
- Lencina MMS. Síntesis y caracterización de hidrogeles de alginato N-Isopropilacrilamida para Aplicaciones Biomédicas. [tesis doctoral en Internet]. [Argentina]: Universidad Nacional del Sur; [citado 6 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/3123/1/Tesis%20Lencina%2C%20M.M.S..pdf>
- Liptrot, G. F. (1978). *Química inorgánica moderna*. Compañía Editorial Continental.
- Martínez Martínez MT, Merino Sanjuán V(dir), González Álvarez M (dir); Bermejo Sanz M (dir). *Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos*. [tesis doctoral en Internet]. [Valencia]: Universidad de Valencia; [citado 2 de octubre de 2018]. Recuperado a partir de: <http://roderic.uv.es/handle/10550/57123>
- Ministerio de Salud de la Nación. *Farmacopea argentina*. 2013. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea\\_Argentina\\_2013\\_Ed.7.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf)
- Ministerio de Salud de la Nación. *Prevención y cuidados del pie en personas con diabetes*. 2017; 19. Disponible en <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001037cnt-prevencion-cuidados-pie-diabetes.pdf>
- Norma ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices. Tests for in vitro cytotoxicity. 1999
- Norma ISO 10993-10: Biological evaluation of medical devices. Tests for irritation and skin sensitization. 1999
- Norma ISO 10993-12: Biological evaluation of medical devices. Sample preparation and reference materials. 1999
- Rao MA. *Introduction. Rheology of fluid and semisolid foods principles and applications*. Gaithersburg, Aspen Publishers, Maryland. 1999: 1-24

- Rinaudo M. Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *Tip* [Internet]. 2014 [consultado 12 agosto 2018]; 17(1): 92–96. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(14\)70322-5](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70322-5)
- Rincón M, Villamo P (tutor). Cuidados de enfermería en las úlceras del pie diabético: Revisión y puesta al día. [tesis de grado en Internet]. [Valladolid]: Universidad de Valladolid; 2015 [citado 21 octubre 2018]. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/17994/1/TFG-H507.pdf>
- Robbins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional*. 8° Edición. Barcelona: Elsevier; 2010. 1131- 1146
- SAD - Sociedad Argentina de Diabetes. Antonucci R, Braver D, Giraudo S., Santillán C, Sosa A, Waitman J. Recomendaciones sobre prevención, diagnóstico y tratamiento del pie diabético. 2009
- Velázquez. *Farmacología de las enfermedades infecciosas. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos*. En: *Manual de Farmacología básica y clínica*. 18° Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2012. 347-350.

## ANEXOS

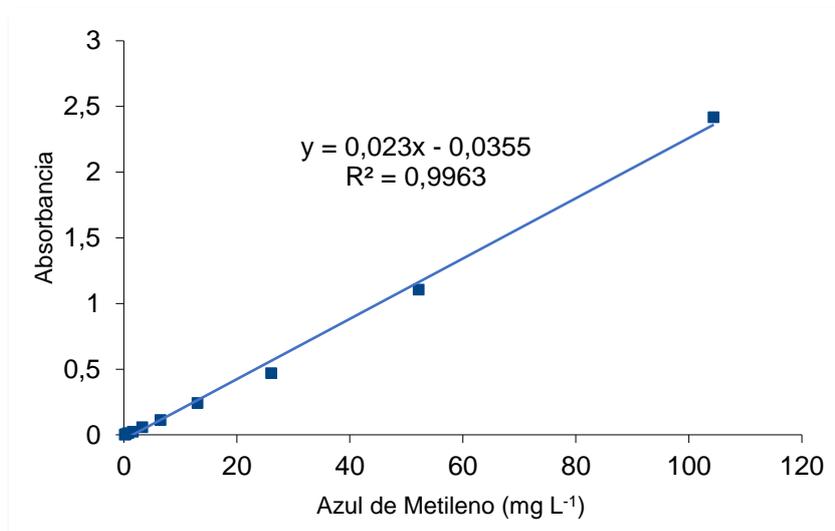
### ANEXO 1 - TIPOS DE APÓSITOS DISPONIBLES PARA HERIDAS

Tipo	Acciones	Indicaciones / Uso	Precauciones / Contraindicaciones
Alginatos/CMC	Absorber fluidos. Fomentar el desbridamiento autolítico. Control humedad. Adaptabilidad al lecho de la herida.	Heridas con exudado de moderado a alto. Presentaciones para cavidades. Presentación combinada con plata para actividad antimicrobiana.	No utilizar en heridas secas/ necróticas. Utilizar con cuidado en tejido friable (puede causar hemorragia). No presionar las heridas cavitadas
Espumas	Absorción de líquido. Control de la humedad. Adaptación al lecho de la herida.	Heridas con exudado de moderado a alto. Presentaciones para cavidades en forma de tiras o cinta Versiones de baja adherencia para pacientes con piel frágil.	No utilizar en heridas secas / necróticas o en aquellas con exudado mínimo.
Miel	Rehidratar la herida. Fomentar el desbridamiento autolítico. Antimicrobiano.	Heridas descamadas con exudado moderado. Heridas colonizadas de forma crítica o signos clínicos de infección.	Puede causar dolor tirante (efecto osmótico). Sensibilidad conocida.
Hidrocoloides	Absorber líquido. Fomentar el desbridamiento autolítico.	Heridas limpias, exudado de bajo a moderado. Presentación combinada con plata para actividad antimicrobiana.	No utilizar en heridas secas / necróticas o con exudado elevado. Puede fomentar la sobregranulación. Puede causar maceración.
Hidrogel	Rehidratar la herida. Control de la humedad. Fomentar el desbridamiento autolítico.	Heridas secas, exudado de bajo a moderado. Presentación combinada con plata para actividad antimicrobiana.	No utilizar en heridas con exudado elevado o cuando se sospecha infección anaeróbica. Puede causar maceración.
Yodo	Acción antimicrobiana.	Heridas colonizadas de forma crítica o signos clínicos de infección. Heridas con exudado de leve a elevado.	No utilizar en tejido seco necrótico. Sensibilidad conocida. Se recomienda el uso a corto plazo.
Silicona contacto de baja adherencia	Proteger el crecimiento de tejido. Atraumática para la piel perilesional. Adaptable al contorno del cuerpo.	Heridas con exudado de leve a elevado. Utilizar como capa de contacto en heridas superficiales con exudación leve.	Puede secarse si se deja colocado demasiado tiempo. Sensibilidad conocida.

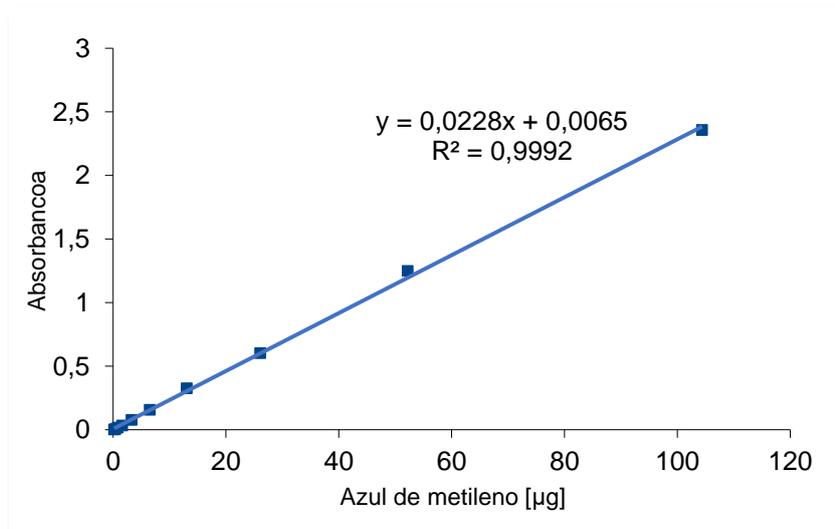
PHMB	Acción antimicrobiana.	Heridas con exudado de leve a elevado. Heridas colonizadas de forma crítica o signos clínicos de infección. Puede requerir un apósito secundario.	No utilizar en heridas secas / necróticas. Sensibilidad conocida.
Control del olor (carbón activado)	Absorción del olor.	Heridas malolientes (por el exceso de exudación). Puede requerir antimicrobianos.	No utilizar en heridas secas.
Moduladores de proteasas.	Control activo y pasivo de los niveles de proteasa en la herida.	Heridas limpias que no progresan.	No usar en heridas secas o en aquellas con escaras similares al cuero.
Plata	Acción antimicrobiana.	Heridas críticas colonizadas o con signos de infección. Heridas con exudado de leve a elevado. Presentación combinada para una mejor absorción.	Sensibilidad conocida. Interrumpir tras dos semanas si no hay mejoría y volver a evaluar.
Película de poliuretano	Control de la humedad. Barrera bacteriana transpirable transparente (permite ver la herida)	Apósito primario sobre heridas superficiales con exudación leve. Apósito secundario sobre alginato o hidrogel para la rehidratación del lecho de la herida.	No utilizar en pacientes con piel frágil / perilesional comprometida No utilizar en heridas con exudación de moderada a elevada.

## ANEXO 2 - CURVAS DE CALIBRACIÓN DE AZUL DE METILENO

609 nm



651 nm



**ANEXO 3 - ESCALA DE MCFARLAND**

Nº	BaCl <sub>2</sub> 0,048 M (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,36 M (mL)	Volumen Final (mL)	Células mL <sup>-1</sup>
0,5	0,05	9,95	10	1,5 x 10 <sup>8</sup>
1	0,1	9,9	10	3 x 10 <sup>8</sup>
2	0,2	9,8	10	6 x 10 <sup>8</sup>
3	0,3	9,7	10	9 x 10 <sup>8</sup>
4	0,4	9,6	10	12 x 10 <sup>8</sup>
5	0,5	9,5	10	15 x 10 <sup>8</sup>
6	0,6	9,4	10	18 x 10 <sup>8</sup>
7	0,7	9,3	10	21 x 10 <sup>8</sup>
8	0,8	9,2	10	24 x 10 <sup>8</sup>
9	0,9	9,1	10	27 x 10 <sup>8</sup>
10	1	9	10	30 x 10 <sup>8</sup>