



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Valeria Fernanda Esteban Galvis**

**FILMS DESOXIDANTES PARA A REXENERACIÓN DE  
FERIDAS. ESTUDOS *IN VITRO***

Traballo Fin de Grao

*Xuño 2024*

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIACIONES .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
1.1 Curación y regeneración de heridas.....	8
1.2 Heridas crónicas .....	10
1.3 Apósitos basados en biopolímeros .....	11
1.4 Biopolímeros .....	12
1.5 Reguladores del estrés oxidativo: complejos de manganeso .....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Materiales .....	17
3.2 Preparación de los films .....	17
3.3 Caracterización de los films.....	19
3.4 Evaluación en cultivos celulares <i>in vitro</i> de queratinocitos humanos HaCaT .....	24
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
4.1 Preparación de los films .....	31
4.2 Grosor.....	32
4.3 Contenido de humedad.....	33
4.4 Propiedades mecánicas.....	33
4.5 Permeabilidad al vapor de agua.....	34
4.6 Índice de hinchamiento.....	35
4.7 Perfil de liberación <i>in vitro</i> de MnL .....	37
4.8 Adsorción de proteínas y ángulo de contacto .....	39
4.9 Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> . Ensayo de captación del rojo neutro.....	40
4.10 Evaluación de la viabilidad mitocondrial <i>in vitro</i> . Ensayo XTT .....	42
4.11 Evaluación de la proliferación celular en ambiente extracelular oxidativo .....	44
4.12 Evaluación de la migración celular. Ensayo <i>scratch</i> .....	47
4.13 Evaluación de la morfología celular. Tinción Giemsa.....	48
4.14 Evaluación de la actividad antioxidante frente al ROS intracelular .....	48
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>AC</b>	Ángulo de contacto
<b>BPs</b>	Biopolímeros
<b>BS</b>	Fuerza de rotura ( <i>Burst Strenght</i> )
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulosa sódica
<b>DB</b>	Distancia de rotura ( <i>Distance to Burst</i> )
<b>DCF</b>	2',7'-diclorofluoresceína
<b>DCFH-DA</b>	3',6'-diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
<b>DMEM</b>	Medio Eagle (Modificación de Dulbecco); ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNCB</b>	2,4-dinitroclorobenceno
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>ECH</b>	Epiclorohidrina
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>IH</b>	Índice de hinchamiento
<b>MnL</b>	Complejos de manganeso
<b>NaAlg</b>	Alginato de sodio
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
<b>PMS</b>	Metosulfato de fenazina ( <i>Phenazine Methosulfate</i> )

<b>RI</b>	Reticulación iónica
<b>ROS</b>	Especies de oxígeno reactivas ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RQ</b>	Reticulación química
<b>SDS</b>	Lauril sulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SWF</b>	Fluido de herida simulado ( <i>Simulated wound fluid</i> )
<b>t-BHP</b>	Hidroperóxido de <i>tert</i> -butilo
<b>XTT</b>	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida
<b>WVP</b>	Permeabilidad al vapor de agua ( <i>Water Vapor Permeability</i> )
<b>WVTR</b>	Índice de transmisión del vapor de agua ( <i>Water Vapor Transmission Rate</i> )

**Título:** Films antioxidantes para la regeneración de heridas. Estudios *in vitro*.

## Resumen

Las heridas crónicas exudativas se presentan como un problema recurrente en el área de atención primaria del sistema de salud, reducen la calidad de vida del paciente y son difíciles de tratar dada su naturaleza crónica. Su sintomatología está asociada a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a las infecciones recurrentes que promueven un estado inflamatorio continuo. El uso de apósitos superabsorbentes acoplado a la terapia antibiótica es el tipo de tratamiento más frecuente para estas lesiones.

En este trabajo se estudió la capacidad antioxidante, así como las propiedades fisicoquímicas y mecánicas, de films secos compuestos de alginato de sodio y carboximetilcelulosa sódica suplementados con un complejo metálico de manganeso. Se analizó el efecto que el tipo de reticulación (química o iónica) de los polímeros tuvo sobre estas propiedades. Además, se evaluó su biocompatibilidad y actividad antioxidante frente al ROS celular en cultivos *in vitro* de queratinocitos humanos (HaCaT).

Los resultados de caracterización demostraron una relación directa entre el tipo de reticulación usada y las propiedades evaluadas para cada film, siendo la combinación de ambos métodos de reticulación la que dio lugar a films con las mejores cualidades de hinchamiento, flexibilidad, resistencia y liberación controlada del complejo. A su vez, los ensayos *in vitro* indicaron una total biocompatibilidad de los films, así como un claro efecto antioxidante contra el estrés oxidativo. Además, se observó un efecto positivo en la migración celular.

Aunque los films sintetizados no son más que prototipos de apósitos superabsorbentes, es necesario continuar investigando las posibles aplicaciones que los biopolímeros y los complejos biomiméticos puedan tener en el tratamiento de las heridas crónicas exudativas.

**Palabras clave:** Heridas crónicas exudativas, biopolímeros, complejos metálicos biomiméticos, manganeso, especies reactivas de oxígeno (ROS), apósitos superabsorbentes, carboximetilcelulosa sódica (CMC), alginato de sodio (NaAlg), estudios *in vitro*.

**Título:** Films desoxidantes para a rexeneración de feridas. Estudos *in vitro*.

## Resumo

As feridas crónicas exudativas preséntanse como un problema recorrente na área de atención primaria do sistema de saúde, reducen a calidade de vida do paciente e o seu tratamento é difícil dada a súa natureza crónica. Os seus síntomas están asociados á produción de especies reactivas de osíxeno (ROS) e ás infeccións recorrentes que promoven un estado inflamatorio continuo. O uso de apósitos superabsorbentes xunto coa terapia antibiótica é o tratamento máis común usado nestas feridas.

Neste traballo estudouse a capacidade desoxidante, así como as propiedades fisicoquímicas e mecánicas, de películas secas compostas por alxinato de sodio e carboximetilcelulosa sódica complementados cun complexo metálico de manganeso. Analizouse o efecto que o tipo de reticulación (química ou iónica) dos polímeros tivo nestas propiedades. Ademais, avaliouse a súa biocompatibilidade e actividade desoxidante contra o ROS celular en cultivos *in vitro* de queratinocitos humanos (HaCaT).

Os resultados da caracterización demostraron unha relación directa entre o tipo de reticulación usada e as propiedades avaliadas para cada película, sendo a combinación de ambos métodos de reticulación a que deu orixe a películas coas mellores cualidades de inchamiento, flexibilidade, resistencia e liberación controlada do complexo. Ó mesmo tempo, os ensayos *in vitro* indicaron unha total biocompatibilidade das películas, así como un claro efecto desoxidante contra o estrés oxidativo. Por outra banda, observouse un efecto positivo na migración celular.

Aínda que as películas sintetizadas non son máis que prototipos de apósitos superabsorbentes, é preciso seguir investigando as posibles aplicacións que poden ter os biopolímeros e os complexos biomiméticos no tratamento das feridas crónicas exudativas.

**Palabras chave:** Feridas crónicas exudativas, biopolímeros, complexos metálicos biomiméticos, manganeso, especies reactivas de osíxeno (ROS), apósitos superabsorbentes, carboximetilcelulosa sódica (CMC), alxinato de sodio (NaAlg), estudos *in vitro*.

**Title:** Antioxidants films for wound healing. *in vitro* studies.

## Abstract

Exudative chronic wounds are a recurring problem regarding primary care in the health system, these injuries hinder the patient's quality of life and are hard to treat successfully due to their chronic nature. Their clinical presentation is associated with an increment in the production of reactive oxygen species (ROS) and recurring infections that, together, promote a continuous inflammatory state in the affected tissue. The use of superabsorbent dressings coupled with extensive antibiotic therapy is the most frequent treatment course for these types of wounds.

In this work, the antioxidant activity, as well as the mechanical and physicochemical properties, of dry films composed by a blend of sodium alginate and sodium carboxymethyl cellulose containing a manganese metallic complex were investigated. The aim was to determine whether the crosslinking method (chemical or ionic) used to obtain the films influenced the aforementioned properties. Moreover, the biocompatibility and the antioxidant effect against cellular ROS was evaluated using *in vitro* cultures of human keratinocytes (HaCaT).

Results showed a direct correlation between the crosslinking method used to obtain the films and the properties evaluated for each film synthesized, being the use of both chemical and ionic crosslinking the technique that resulted in films with the most desirable characteristics regarding swelling degree, flexibility, strength and controlled release of the manganese complex. At the same time, *in vitro* assays showed complete biocompatibility between the films and the cell culture, as well as an evident antioxidant effect against oxidative stress. A positive effect on cellular migration was also reported.

Although the films obtained in this work are nothing more than prototypes of superabsorbent wound dressings, it is necessary to continue doing research on the possible applications that biopolymers and biomimetic metallic complexes can have on the treatment of exudative chronic wounds.

**Keywords:** Chronic exudative wounds, biopolymers, biomimetic metal complexes, manganese, reactive oxygen species (ROS), superabsorbent dressings, carboxymethylcellulose sodium (CMC), sodium alginate (NaAlg), *in vitro* studies.

# 1. INTRODUCCIÓN

Una herida puede definirse como una ruptura en la continuidad de un tejido u órgano que afecta su funcionamiento y estructura. Las heridas crónicas exudativas surgen de un desarrollo incompleto del proceso de regeneración y curación del tejido, que además se ve agravado por la existencia de patologías subyacentes.<sup>1</sup> Estas lesiones pueden durar años y suponen una reducción en la calidad de vida del paciente, usualmente se encuentran en puntos de presión constante que, una vez generada la herida, impiden la movilidad normal. Además, requieren de curas continuas que pueden llegar a ser en extremo dolorosas e implican una pérdida en la autonomía del paciente.<sup>2</sup>

En la actualidad, los apósitos usados para el tratamiento de las heridas crónicas exudativas han evolucionado para tener características ideales que manejen la sintomatología típica de estas lesiones. El uso de films secos superabsorbentes que además sean bioactivos y con capacidad antioxidante, ya sea por sí mismos o mediante la liberación de sustancias activas en el lecho de la herida es cada vez más frecuente.<sup>3</sup>

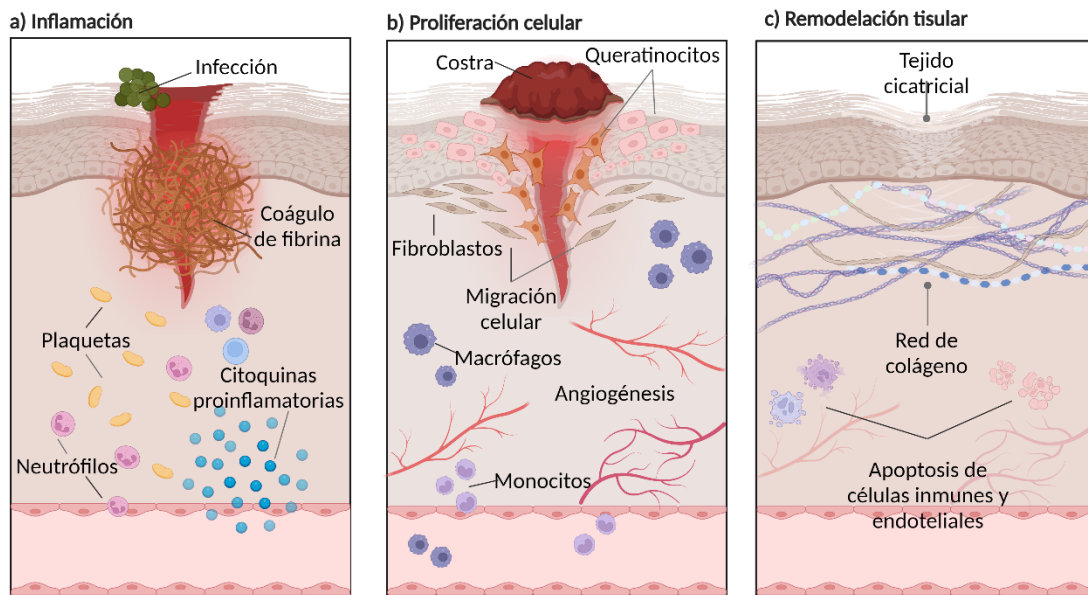
El trabajo de investigación de otros autores en el campo de la tecnología farmacéutica para el desarrollo de materiales que cumplan con estos requerimientos ha dado lugar a la obtención de diversos prototipos de apósitos como films antioxidantes suplementados con nanopartículas de cerio,<sup>4</sup> hidrogeles con capacidad antibiótica suplementados con fibrinógeno y nisina,<sup>5</sup> films antiinflamatorios con povidona yodada añadida,<sup>6</sup> hidrogeles con liberación controlada de fármacos,<sup>7</sup> entre otros.

Aunque se han hecho grandes avances en el desarrollo de materiales biocompatibles y con características ideales para ser aplicados en el tratamiento de las heridas crónicas exudativas, hasta el momento no se ha encontrado una solución definitiva para este tipo de lesiones. Por consiguiente, es necesario continuar estudiando las propiedades antioxidantes, proliferativas y antiinflamatorias de estos apósitos. Todo con el fin de mejorar el panorama actual de tratamiento y cuidado de este tipo de lesiones que se presentan como un problema recurrente en el área de atención primaria del sistema de salud.<sup>8</sup>

## 1.1 Curación y regeneración de heridas

La regeneración de heridas es uno de los procesos biológicos más complejos y dinámicos que ocurren en un ser vivo. Una vez generada una ruptura en la barrera epidérmica se desencadena una respuesta coordinada e inmediata de diversas rutas de señalización inter e intracelulares que buscan restaurar la integridad y homeostasis tisular.<sup>9,10</sup>

La curación de una herida se da a lo largo de tres etapas que, aunque son consecutivas y se superponen temporalmente, son claramente diferenciables por los marcadores bioquímicos y procesos biológicos que las caracterizan. Estas etapas son: inflamación, proliferación celular y remodelación tisular (Figura 1.1).<sup>11,12</sup>



**Figura 1.1** Representación esquemática del proceso de curación y regeneración de una herida. Las tres etapas del proceso son a) inflamación, b) proliferación celular y c) remodelación y maduración tisular. Adaptado de Gutner et al.<sup>9</sup> Creado con BioRender.com

La inflamación es inmediata tras la generación de una herida y está asociada a la activación de la cascada de coagulación, la liberación de intermediarios metabólicos proinflamatorios y un aumento en la actividad del sistema inmune. Esto evita la pérdida de fluidos (y sangre) y previene la infección.

Una vez controlada la homeostasis se da la etapa de proliferación celular, la cual lleva a la generación de nuevo tejido y se caracteriza por la migración de los queratinocitos hacia la dermis lesionada (desde el borde hacia el interior de la herida). Además, en esta etapa también ocurre la angiogénesis, proceso de formación de nuevos capilares y vasos sanguíneos para reanudar la irrigación sanguínea a la zona afectada.

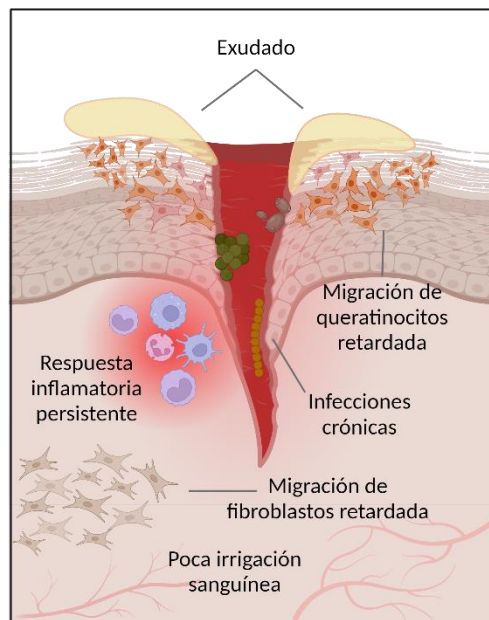
Finalmente, sucede la etapa de remodelación o maduración tisular. Inicia a partir de la segunda semana desde el momento de generación de la herida y puede llegar a durar hasta dos años. En esta etapa se eliminan por apoptosis las células mediadoras del sistema inmune y las células endoteliales de los vasos sanguíneos formados en el proceso de angiogénesis, dejando atrás una red de colágeno y proteínas características de la matriz extracelular. Es en esta etapa donde el colágeno tipo III depositado inicialmente en la herida será remodelado a colágeno tipo I (propio de la piel), aumentando la fuerza del tejido reparado.<sup>9</sup>

Este proceso de regeneración tisular puede verse afectado por diversos factores como la deshidratación de la herida, una deficiente irrigación del tejido (poca oxigenación), el desarrollo de infecciones y la presencia de condiciones patológicas previas como la diabetes mellitus, el cáncer o la obesidad. Un fallo en el desarrollo de alguna de estas fases puede alargar en el tiempo el proceso de curación, elevando el riesgo de la evolución de una herida normal a una herida de tipo crónica.<sup>6</sup>

## 1.2 Heridas crónicas

Las heridas crónicas son aquellas que fallan en completar de manera correcta y en el tiempo esperado el proceso normal de curación y regeneración del tejido afectado. Son lesiones que frecuentemente se estancan en la etapa inflamatoria del proceso de regeneración. Cualquier herida en la piel tiene el potencial de hacerse crónica, por esto se suelen clasificar según su causa subyacente. Dentro de las más comunes se encuentran la presión localizada, insuficiencia vascular y diabetes mellitus.<sup>13</sup>

Aunque su etiología pueda variar, las heridas crónicas comparten características moleculares comunes como la producción excesiva de radicales libres de oxígeno (ROS) y citoquinas proinflamatorias, así como el desarrollo de infecciones persistentes que facilitan la necrosis del tejido adyacente y estimulan un flujo constante de células inmunes al área afectada (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Representación esquemática de los procesos inflamatorios y moleculares característicos de las heridas crónicas. Adaptado de Noraham et al.<sup>14</sup> Creado con BioRender.com

Habitualmente, la inflamación prolongada, la formación de biofilms microbianos resistentes a tratamiento y la producción excesiva de exudado asociada al proceso inflamatorio anormal derivan en la sensibilización y maceración (reblandecimiento) del tejido. Esto resulta en un proceso de regeneración incompleto y cíclico, donde la inflamación excesiva provoca daño tisular y el daño tisular provoca inflamación, acentuando la condición crónica de la lesión en cuestión.<sup>6</sup>

A bajas concentraciones, la producción de radicales libres de oxígeno en neutrófilos y macrófagos provee un mecanismo de defensa contra las infecciones, siendo esencial en el proceso de curación de heridas. Sin embargo, el ambiente de hipoxia, favorecido por una vascularización deficiente característico de este tipo de lesiones desencadena una producción excesiva de estas especies reactivas en el entorno tisular.

La producción de radicales libres de oxígeno en altas concentraciones no solamente daña estructuras celulares mediante el estrés oxidativo, también estimula la liberación de intermediarios bioquímicos promotores de la degradación de la matriz extracelular (ECM). Esta degradación constante del tejido afectado dificulta la evolución favorable del curso de regeneración de la herida, impidiendo su maduración y prolongando la permanencia de la lesión en la etapa inflamatoria.<sup>15</sup>

Más allá de ser un proceso biológico incompleto y deficiente, las heridas crónicas representan uno de los retos más complejos cuando se habla de tratamiento y cuidado de lesiones en el entorno clínico. La comprensión de las condiciones bioquímicas que existen en el microambiente celular de las heridas crónicas debería facilitar el desarrollo de nuevos materiales y productos sanitarios, que simplifiquen el tratamiento y mejoren la evolución del proceso de curación.<sup>12,16</sup>

### 1.3 Apósitos basados en biopolímeros

El apósito ideal para el tratamiento de una herida crónica debería facilitar la eliminación de exudado acumulado en el lecho de la lesión sin llegar a causar deshidratación, manteniendo una humedad relativa beneficiosa para el entorno tisular. Debe permitir el intercambio gaseoso y actuar como barrera física a microorganismos y contaminantes externos, evitando la infección.

Cabe recalcar, que los materiales usados en el desarrollo de estos productos sanitarios deben ser biocompatibles, de bajo costo y fáciles de aplicar, además de poseer características fisicoquímicas que permitan su uso prolongado, disminuyendo la cantidad de curas requeridas en un periodo de tiempo, evitando el traumatismo que la retirada constante del apósito conlleva.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la elección de materiales para el desarrollo del apósito más adecuado a usar en una herida crónica es la capacidad de liberación controlada de fármacos o sustancias activas en el lecho de la herida. Esto es de interés cuando se quiere suplementar el proceso de curación con principios activos que promuevan la diferenciación celular, disminuyan la producción de ROS o que actúen como tratamiento antibiótico.<sup>16</sup>

Los biopolímeros (BPs) son particularmente interesantes por su biocompatibilidad y similitud con la matriz extracelular, especialmente los de tipo polisacárido. Además, su cualidad biodegradable y fácil obtención a partir de fuentes naturales y renovables los hace materiales atractivos en la industria farmacéutica para el desarrollo de apósitos novedosos en el tratamiento de heridas con requerimientos específicos como lo son las heridas crónicas.<sup>17</sup>

Diversos tipos de BPs con distintas características estructurales y fisicoquímicas pueden ser tratados y convertidos en biomateriales de tipo films, hidrogeles, espumas, membranas y estructuras tridimensionales con aplicaciones directas en los tratamientos de heridas crónicas.

Los apósitos de tipo films membranosos pueden ser preparados mediante distintas técnicas como el *solvent-casting* o la liofilización. El uso de biopolímeros aislados o su mezcla con otros BPs puede dar lugar a dispersiones poliméricas densas, fibrosas y porosas con propiedades mecánicas de gran interés en la industria. En general, las propiedades de estos apósitos vendrán

definidas por su composición polimérica y las técnicas utilizadas en su proceso de síntesis.<sup>18</sup>

## 1.4 Biopolímeros

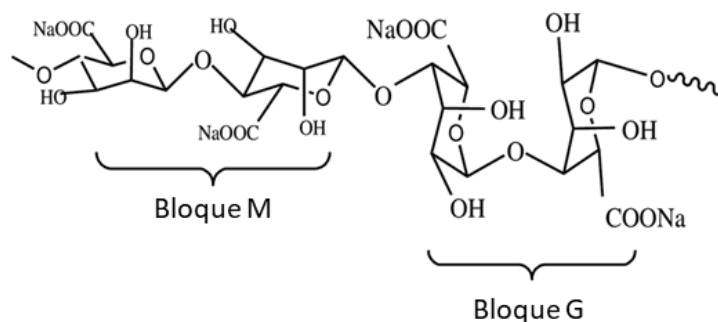
### 1.4.1 Alginato de sodio

El alginato de sodio (NaAlg), término usado para referirse al ácido algínico y sus sales, es un polisacárido lineal aniónico compuesto por repeticiones de dos monosacáridos estructurales, los ácidos D-manurónico (M) y L-gulurónico (G), unidos por enlaces 1,4-glucosídicos (Figura 1.3). Este polisacárido se sintetiza naturalmente en las paredes celulares del alga marina parda y en algunas especies bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas* y *Azotobacter*.



**Figura 1.3** Estructura molecular del alginato de sodio.

Los residuos polisacáridicos se organizan en bloques estructurales homopoliméricos M (dos monómeros MM unidos) o G (dos monómeros GG unidos) y heteropoliméricos GM o MG (monómeros G y M asociados al azar) (Figura 1.4). La disposición y proporción de estos bloques estructurales varía dependiendo de la fuente natural de obtención del biopolímero.<sup>19</sup>

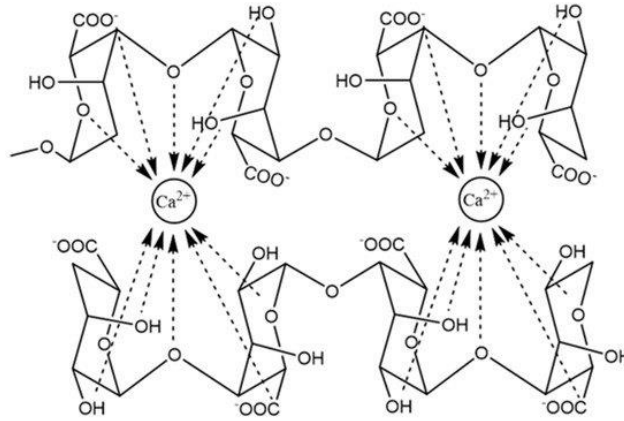


**Figura 1.4** Bloques poliméricos GG, MM y MG que componen la estructura del alginato de sodio.

Los patrones de ordenación y la proporción de estos bloques estructurales en la composición del alginato de sodio determinarán las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del polímero, como su viscosidad, solubilidad y rigidez. Estas propiedades serán las que definan las aplicaciones del NaAlg en la industria.

Una de las características más interesantes del alginato de sodio es su capacidad de formar geles iónicos de alta viscosidad en presencia de cationes polivalentes, este proceso se denomina reticulación iónica (RI). La RI resulta de un intercambio iónico entre el catión monovalente del alginato (en el caso del NaAlg sería Na<sup>+</sup>) y el catión polivalente de la solución reticulante. El ion más usado en la reticulación del alginato de sodio es el Ca<sup>+2</sup>.

El mecanismo de reticulación iónica del NaAlg es explicado por el modelo de la “caja de huevo” (Figura 1.5). En este modelo los bloques homopoliméricos G forman zonas de unión de alto orden,<sup>20</sup> donde dos o más cadenas de polímero se unen mediante interacciones dipolo-dipolo al agente reticulante ( $\text{Ca}^{+2}$ ) a través de los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo y los enlaces glucosídicos de las cadenas adyacentes.<sup>21</sup>



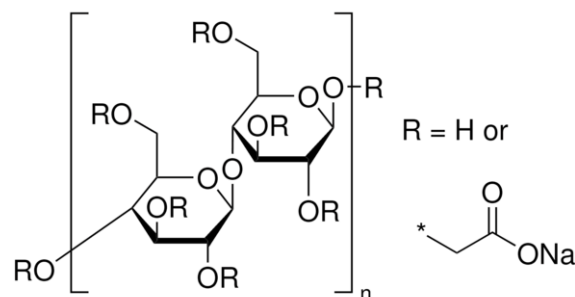
**Figura 1.5** Zonas de unión de alto orden en el modelo de la “caja de huevo”.

El amplio espectro de aplicaciones biomédicas del alginato de sodio es resultado de sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas. Además, el carácter no tóxico del NaAlg, así como su alta biocompatibilidad y su baja adhesión al lecho de la lesión hacen de este polímero un candidato ideal para el desarrollo de apósitos altamente absorbentes destinados al tratamiento de heridas crónicas exudativas.<sup>19</sup>

Un ejemplo de este tipo de apósitos son los films secos. Su aplicación sobre el lecho de la herida exudante genera una rehidratación de la matriz polimérica, dando lugar a la constitución de un ambiente húmedo que promueve la regeneración del tejido.<sup>10</sup>

#### 1.4.2 Carboximetilcelulosa sódica

La carboximetilcelulosa sódica (CMC) es un polisacárido aniónico lineal derivado de la celulosa, cuyo monómero estructural es la anhidroglucosa. El enlace de unión de las unidades monoméricas es de tipo  $\beta$ -1,4-glucosídico (Figura 1.6). La principal diferencia entre la CMC y la celulosa es la presencia de grupos carboximetil que reemplazan los átomos de hidrógeno en los grupos hidroxilo presentes en la estructura de la celulosa.<sup>22</sup>



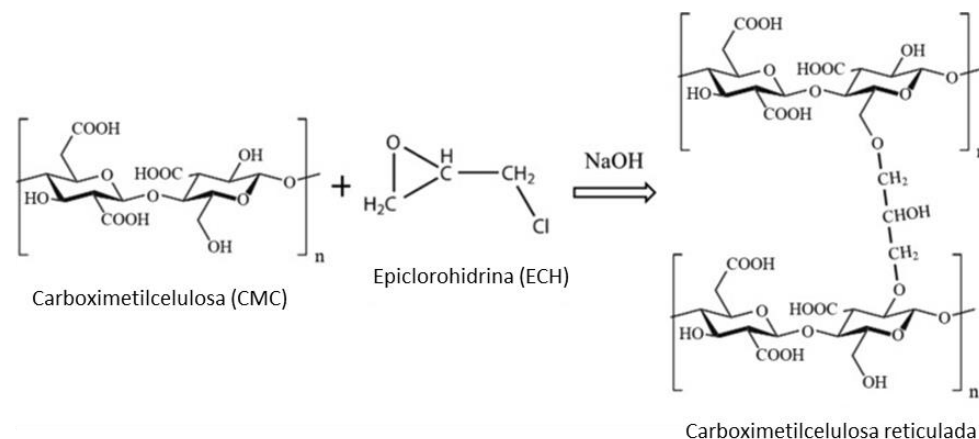
**Figura 1.6** Estructura de la carboximetilcelulosa sódica.

La presencia de tres grupos hidroxilo distintos en cada anhidroglucosa que componen la CMC hacen posibles varios tipos de modificaciones químicas sobre el polímero, como la esterificación, eterificación, oxidación y reticulación.<sup>23</sup>

Aunque existen distintas técnicas de reticulación de la carboximetilcelulosa, una de las más interesantes para el desarrollo de apósitos sanitarios es la reticulación química (RQ). El tratamiento de la CMC con agentes reticulantes como la epíclorohidrina (ECH), el ácido cítrico o el glutaraldehído permite obtener hidrogeles con propiedades mecánicas y de biocompatibilidad indicadas para su uso en el tratamiento de heridas crónicas exudativas.

La epíclorohidrina es particularmente interesante como agente reticulante de la CMC por la formación de uniones a partir de su cadena relativamente corta. Esto aporta al polímero un alto índice de absorción de líquido y estabilidad estructural evitando la degradación química del hidrogel a causa de la hidrólisis.<sup>24</sup>

La reacción de reticulación química de la CMC con epíclorohidrina es catalizada por bases (NaOH), donde ocurre una reacción de eterificación entre los grupos hidroxilo de la ECH y la cadena polisacáridica de la CMC (Figura 1.7). En medio básico, se activan los grupos hidroxilo de la molécula de CMC y se convierten en grupos alcóxido (-O<sup>-</sup>) mucho más reactivos que actúan como centro de reacción del agente de eterificación (ECH).<sup>24,25</sup>



**Figura 1.7** Representación esquemática de la reticulación química de la carboximetilcelulosa sódica con epíclorohidrina en medio básico.

Se han explorado diversas aplicaciones de la CMC en la industria farmacéutica como material para la producción de apósitos para el tratamiento de heridas. Este biopolímero es capaz de producir films flexibles y con una alta capacidad de absorción de exudado, además, no presentan toxicidad, son biodegradables y la fuente de obtención de su material prima es abundante en la naturaleza.<sup>26</sup>

En la actualidad, la producción de apósitos sanitarios a partir de la mezcla de biopolímeros ha dado excelentes resultados en la mejora de las propiedades intrínsecas de los BPs mezclados. También se ha observado que la suplementación de estos apósitos con nanopartículas metálicas con el fin de actuar como agente antimicrobiano o contrarrestar la producción de radicales libres de oxígeno, que promueven el estrés oxidativo del microambiente celular de la lesión, han mejorado la respuesta al tratamiento de las heridas crónicas exudativas.<sup>18</sup>

## 1.5 Reguladores del estrés oxidativo: complejos de manganeso

Las especies reactivas de oxígeno son metabolitos reducidos formados en sistemas biológicos como resultado del metabolismo celular normal. El anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) son algunos de los radicales que componen estas especies reactivas (ROS).<sup>27</sup>

La producción de ROS en una célula juega un papel fundamental como intermediador de procesos metabólicos, actúa como activador de respuestas adaptativas y de protección y es uno de los mecanismos de defensa contra agentes infecciosos por parte de las células inmunes. Además, participa en la regulación de procesos importantes en la curación de heridas como la liberación de citoquinas, la proliferación celular y la angiogénesis.<sup>15</sup>

Sin embargo, una producción excesiva de ROS deriva en el desarrollo de estrés oxidativo en el interior celular, este fenómeno surge cuando hay una pérdida de equilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de la célula para eliminar estas especies reactivas. La presencia de ROS afecta las principales macromoléculas celulares, dañando membranas lipídicas, proteínas e incluso teniendo efecto mutagénico sobre el ADN.<sup>28</sup>

Los niveles de ROS celulares son regulados por enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), entre otras. Además de la actividad reductora enzimática intrínseca de la célula, también hay una regulación de los niveles de ROS por parte de otros compuestos antioxidantes no enzimáticos como el  $\alpha$ -tocoferol, el ácido ascórbico y algunos carotenos derivados de la vitamina A.<sup>29</sup>

Desde los 90s se ha estudiado el desarrollo de modelos sintéticos que simulen la actividad antioxidante de las enzimas celulares encargadas de la regulación de ROS, enfocándose en el uso de compuestos metálicos con actividad antioxidante.<sup>30</sup>

Uno de los modelos más estudiados para este fin son los complejos de manganeso *salen* (MnL), estos son compuestos de coordinación donde el centro metálico ( $Mn^{2+}$ ) está unido a 2 ligandos quelantes base de Schiff. El término *salen* hace referencia a los reactivos usados para sintetizar el ligando, salicilaldehído (sal) y etilendiamina (en).

Una de las propiedades más interesantes de estos complejos es que son permeables a la membrana celular, mejorando su biodisponibilidad en comparativa con enzimas antioxidantes exógenas, además, exhiben actividad catalasa y peroxidodismutasa. Esto ha llevado a que sean sintetizados como antioxidantes catalíticos, donde una molécula cataliza la reducción de más de una molécula de ROS.<sup>27</sup>

Finalmente, se han demostrado los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios de este tipo de compuestos biomiméticos contra el estrés oxidativo mediante la evaluación de su capacidad antioxidante en modelos celulares humanos, dando resultados prometedores para la aplicación de estos complejos en la industria farmacéutica.<sup>31</sup>

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es el desarrollo y caracterización de films secos de alginato de sodio y carboximetilcelulosa sódica, conteniendo un complejo de manganeso como principio activo antioxidante para su posible aplicación en el tratamiento de las heridas crónicas exudativas.

Los objetivos parciales de este trabajo son: 1) la obtención de un prototipo del sistema de liberación de complejo de manganeso, 2) la caracterización de las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del film; 3) la evaluación de su biocompatibilidad en cultivo de queratinocitos humanos y 4) la evaluación de la capacidad antioxidante de estos sistemas en cultivo *in vitro*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

Los siguientes materiales fueron adquiridos y usados para la preparación de los films: Alginato de Sodio (NaAlg) (W201502, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), carboximetilcelulosa sódica 1550-4500 (CMC) (Mg94225, Guinama, España), glicerol (G-7757, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), cloruro de calcio anhidro ( $\text{CaCl}_2$ ) (141221, Panreac Química SLU, España), hidróxido de sodio (NaOH) (141686, Panreac Química SLU, España), epiclorohidrina (ECH) (E1055, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Los complejos de manganeso empleados en este trabajo fueron cedidos por el grupo de investigación del profesor M. Maneiro. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

#### 3.2 Preparación de los films

Se prepararon 3 tipos de films blancos (sin MnL) con la misma concentración de polímeros y plastificante, 3% (m/v) alginato de sodio/2% (m/v) CMC/3% (m/v) glicerol, pero variando las concentraciones de reticulante iónico ( $\text{CaCl}_2$ ) y químico (epiclorohidrina).

Así, para la composición del film 1 (F1) se utilizó una disolución 0,05% (m/v)  $\text{CaCl}_2$  como reticulante iónico del alginato de sodio y se empleó una relación 3:4 entre la cantidad (gramos) de CMC y ECH, que se incorporó a la disolución a modo de reticulante químico. En el film 2 (F2), se mantuvo la relación 3:4 gramos CMC/gramos ECH, pero se incrementó la concentración de reticulante iónico, utilizando una disolución 0,1%  $\text{CaCl}_2$  en la dispersión de NaAlg. Por último, el film 3 (F3) se preparó empleando únicamente una reticulación química, estableciendo una relación 3:4 entre la cantidad total de polímero (CMC + NaAlg) y la cantidad de ECH añadida.

Para la preparación de films con MnL, únicamente se añadió la cantidad necesaria de complejo durante la preparación de cada film, obteniendo una concentración final de 0,1% (m/v) MnL en la dispersión.

A continuación, se detalla el proceso de preparación de cada uno de los films, tanto films blancos como films 0,1% MnL. En la Tabla 3.1 y Tabla 3.2 se detallan las concentraciones de polímeros, glicerol y agentes reticulantes usados en la preparación de cada film.

Muestra	Alginato	Carboximetilcelulosa	$\text{CaCl}_2$	Epiclorohidrina	Glicerol
Film 1 (Blanco)	3%	2%	0,05%	2,7%	3%
Film 2 (Blanco)	3%	2%	0,1%	2,7%	3%
Film 3 (Blanco)	3%	2%	0%	6,7%	3%

**Tabla 3.1** Concentraciones de alginato de sodio, carboximetilcelulosa sódica,  $\text{CaCl}_2$ , epiclorohidrina y glicerol usadas para la preparación de los films blancos. Todas las concentraciones se dan en % m/v.

Muestra	Alginato	Carboximetilcelulosa	CaCl <sub>2</sub>	Epiclorohidrina	Glicerol	MnL
Film 1 (0,1% MnL)	3%	2%	0,05%	2,7%	3%	0,1%
Film 2 (0,1% MnL)	3%	2%	0,1%	2,7%	3%	0,1%
Film 3 (0,1% MnL)	3%	2%	0%	6,7%	3%	0,1%

**Tabla 3.2** Concentraciones de alginato de sodio, carboximetilcelulosa sódica, CaCl<sub>2</sub>, epiclorohidrina y glicerol usadas para la preparación de los films 0,1% MnL. Todas las concentraciones se dan en % m/v.

### 3.2.1 Film 1 (Blanco)

El film 1 se preparó a partir de dos disoluciones iniciales de volúmenes iguales. Primero, se procedió a preparar la dispersión de CMC en una disolución 6% (m/v) NaOH, agitando a mano con una varilla de vidrio hasta conseguir una dispersión homogénea del polímero, obteniendo una concentración final de 4% CMC (m/v) (1). En otro vaso, se dispersó el NaAlg en una disolución 0,05% (m/v) CaCl<sub>2</sub> obteniendo una concentración final de 6% (m/v) de NaAlg, a la cual se añadió glicerol para conseguir una concentración final de 6% (m/v) glicerol (2). De la misma manera que la disolución (1), se agitó a mano con una varilla de vidrio hasta conseguir una dispersión homogénea del alginato de sodio. Se cubrió cada vaso con Parafilm® y se mantuvo en nevera a 4°C durante 12 horas, para garantizar la completa hidratación de las cadenas de los polímeros y evitar la aparición de grumos durante el proceso de preparación.

Una vez atemperadas ambas disoluciones a 25°C (temperatura ambiente), se mezcló en un tercer vaso la disolución de CMC (1) y la disolución de NaAlg/glicerol (2), agitando a mano con una varilla de vidrio. La concentración final de esta dispersión será de 3% (m/v) NaAlg /2% (m/v) CMC/3% (m/v) glicerol. Tras obtener una mezcla homogénea se incorporó a la dispersión la cantidad de epiclorohidrina calculada, gota a gota y con agitación continua a mano con una varilla de vidrio durante 20-30 minutos, hasta conseguir un gel viscoso completamente homogéneo. Se llevó el vaso de precipitados a una estufa de vacío (Estufa de vacío 1490, VWR, Estados Unidos) a 200 mbar durante 12 horas, con el fin de eliminar las burbujas generadas en el proceso de mezcla de las dispersiones. Se cubrió el vaso con Parafilm® y se llevó a un baño de agua a 50°C durante 4-5 horas. Pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Como último paso, se pesaron 8 gramos de dispersión en placas de Petri (23,75 cm<sup>2</sup>), y se mantuvieron a 30°C en estufa (Estufa de secado UE 400, Memmert, Alemania) con silica gel durante ≈3 días. El film seco se despegó cuidadosamente de la placa y se almacenó en un contenedor cerrado a temperatura ambiente.

### 3.2.2 Film 1 (0,1% MnL)

El proceso de preparación de este film fue exactamente el mismo que se describe en el apartado anterior [Film 1 (Blanco)], a excepción de la elaboración de la dispersión (1). Además de añadir el NaAlg y el glicerol a la disolución 0,05% (m/v) CaCl<sub>2</sub>, se añadió también MnL en la cantidad necesaria para obtener una concentración de 0,2% (m/v) MnL. Una vez mezclada con la dispersión (2) la concentración final será de 0,1% (m/v) MnL.

### 3.2.3 *Film 2 (Blanco)*

El proceso de preparación siguió los mismos pasos que el Film 1 (Blanco), el único cambio estuvo en la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de la dispersión (1). En este caso, se disolvieron el NaAlg y el glicerol en una disolución 0,1% (m/v)  $\text{CaCl}_2$ .

### 3.2.4 *Film 2 (0,1% MnL)*

Para la preparación de este film se procedió de la misma manera que con el Film 2 (Blanco), pero variando la composición de la dispersión (1). Además de añadir el NaAlg y el glicerol a la disolución 0,1% (m/v)  $\text{CaCl}_2$ , se añadió también MnL en la cantidad necesaria para obtener una concentración de 0,2% (m/v) MnL. Una vez mezclada con la dispersión (2) la concentración final será de 0,1% (m/v) MnL.

### 3.2.5 *Film 3 (Blanco)*

Se dispersaron el alginato de sodio, la CMC y el glicerol en una disolución 0,6% (m/v) NaOH, agitando a mano con una varilla de vidrio hasta conseguir una dispersión homogénea de los polímeros, obteniendo una concentración final de 3% (m/v) NaAlg/2% (m/v) CMC/3% (m/v) glicerol. Se cubrió el vaso con Parafilm® y se reservó en la nevera a 4°C durante 12 horas, para garantizar la completa hidratación de los polímeros y evitar la aparición de grumos en pasos posteriores.

Una vez atemperada la dispersión a 25°C (temperatura ambiente), se añadió a la dispersión la cantidad de epiclorohidrina calculada (relación 3:4 entre cantidad total de polímero/gramos ECH), gota a gota y con agitación continua a mano con una varilla de vidrio durante 20-30 minutos hasta conseguir un gel viscoso completamente homogéneo. Se llevó el vaso a una estufa de vacío a 200 mbar durante 12 horas. Una vez cubierto el vaso con Parafilm®, se llevó a un baño de agua a 50°C durante 4-5 horas. Pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Como último paso, se pesaron 8 gramos de dispersión en placas de Petri (23,75 cm<sup>2</sup>), se extendió cuidadosamente la dispersión sobre la placa y se llevó a secar en estufa con sílica gel a 30°C durante ≈3 días. El film seco se despegó cuidadosamente de la placa y se almacenó en un contenedor cerrado a temperatura ambiente.

### 3.2.6 *Film 3 (0,1% MnL)*

Para la preparación de este film se procedió de la misma manera que el Film 3 (Blanco), pero añadiendo a la dispersión la cantidad necesaria de MnL para obtener una concentración final de 0,1% (m/v) MnL.

## 3.3 Caracterización de los films

### 3.3.1 *Grosor*

El grosor de los films ( $\mu\text{m}$ ) fue evaluado con un medidor de espesor ET115S (Etari GmbH, Stuttgart, Alemania), tomando medidas en 3 puntos distintos de cada muestra ( $n=3$ ). Los resultados se expresaron como el valor del grosor medio calculado para cada film.

### 3.3.2 Contenido de humedad

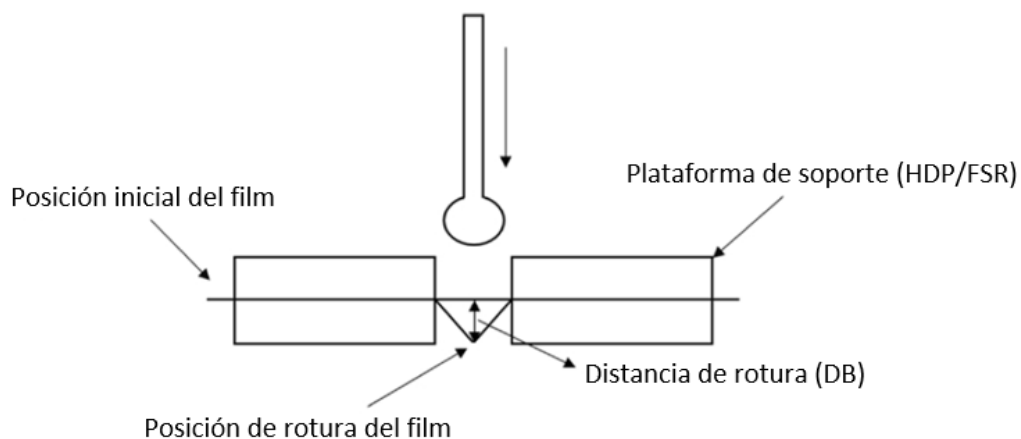
Se tomaron 3 muestras de entre 0,2 y 0,7 gramos de cada film, previamente acondicionados durante 1 semana en un desecador a 30°C con una solución saturada de bromuro de sodio para obtener una humedad en equilibrio de 57,7%. Se tomó la medida de peso inicial de cada muestra y se almacenaron en una estufa con silica gel a 100°C durante 24 horas. Una vez finalizado el tiempo de desecación, se tomó la medida de peso final en la misma balanza analítica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El cálculo de contenido de humedad total en porcentaje se realizó según la ecuación (3.1):

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{P_o - P_f}{P_o} * 100 \quad (3.1)$$

Donde  $P_o$  es el peso inicial y  $P_f$  es el peso final de cada muestra.

### 3.3.3 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las muestras se evaluaron en un texturómetro (TA-XTplus, Stable Micro Systems, UK). El test de punción determina la fuerza necesaria que debe ejercer una sonda cilíndrica sobre la muestra, en el punto de rotura, para mantener una velocidad constante, y la distancia recorrida por la sonda desde el momento en que entra en contacto con la muestra hasta el punto de rotura. Esta medida permite obtener los parámetros de fuerza de rotura (BS) (gramos) y distancia de rotura (DB) (mm) de cada film.<sup>32</sup> En la Figura 3.1 se presenta un esquema de este proceso.



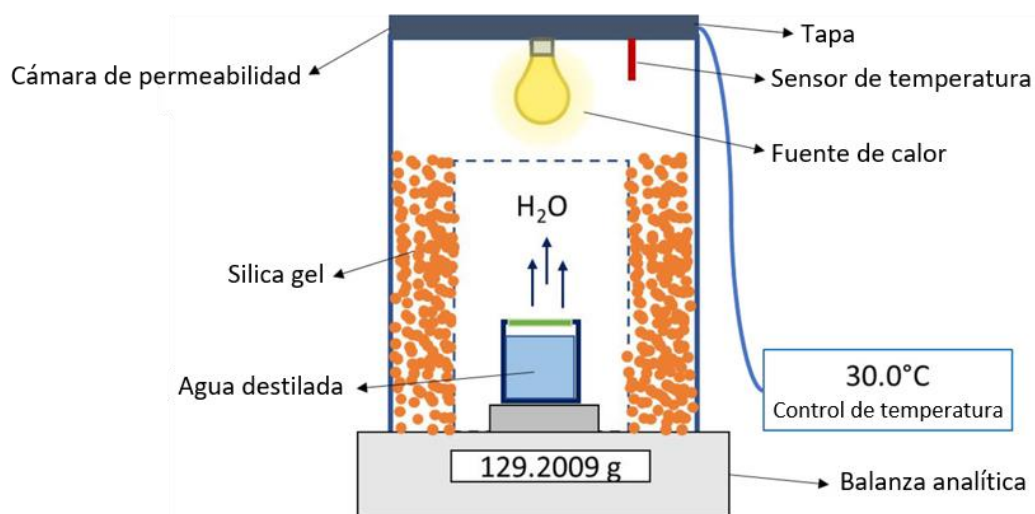
**Figura 3.1** Representación esquemática del proceso del test de punción. Adaptado de Cazón et al..<sup>32</sup>

Todos los films evaluados se acondicionaron durante 1 semana, previa a la toma de medidas, en un desecador a 30°C y una humedad en equilibrio de 57,7%. Se tomó una muestra de  $\approx 6 \text{ cm}^2$  de cada film y se aseguró en la plataforma de soporte del texturómetro. Se estableció una velocidad de 0,5 mm/seg, una distancia total de recorrido de 30 mm y una fuerza detonante de 0,010 N. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 3.3.4 Permeabilidad al vapor de agua

La determinación de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) cuantifica la cantidad de agua que atraviesa la matriz del film por unidad de grosor, tiempo y diferencia de presión entre el exterior de la cámara de permeabilidad y el interior del recipiente ( $\text{g/s}\cdot\text{m}\cdot\text{Pa}$ ). Para este estudio se utilizó una cámara de permeabilidad preparada para tal efecto en el laboratorio de P. Cazón (Figura 3.2).<sup>33</sup>

Para la realización de este ensayo se acondicionaron los films de la misma forma que se describió anteriormente (apartado 3.3.2).



**Figura 3.2** Representación esquemática de la cámara de permeabilidad usada para llevar a cabo el ensayo. Adaptado de Cazón et al..<sup>33</sup>

Primero, se llevó a cabo el acondicionamiento de la cámara de permeabilidad. Para esto se llenó el recipiente con 100 ml de agua destilada, se cerró herméticamente para evitar su evaporación y se posicionó en el centro de la balanza analítica sin que este toque en ningún momento las paredes de la cámara de permeabilidad. Se establecieron 30°C de temperatura y después de cerrar la cámara, se mantuvo cerrado durante 3 horas permitiendo que el sistema llegara al equilibrio, esto es, que haya un 100% de humedad dentro del recipiente cerrado y un 0% de humedad en el interior de la cámara por efecto de la silicagel.

Una vez se acondicionó el sistema se procedió a evaluar la primera muestra. Se tomó una muestra circular entera de film y se cortó al tamaño de la apertura del soporte del (área apertura =  $5 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ ). Seguidamente, se aseguró la muestra en el interior del soporte con un seguro de goma y se cerró el recipiente completamente cuidando de dejar una distancia de  $\approx 50 \text{ mm}$  entre la superficie del agua y el borde superior del recipiente para evitar el contacto del líquido con la muestra. Durante este tipo de ensayos, es importante evitar pinchar, arrugar o romper el film, ya que esto cambiaría el equilibrio del sistema permitiendo la evaporación de líquido sin atravesar la muestra. Una vez tarada la balanza y posicionado el recipiente dentro de la cámara y sin que este llegue a tocar las paredes, se cerró la cámara y se comenzaron a tomar las medidas de la variación de peso en el recipiente durante 6 horas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

En este caso, las medidas fueron tomadas y registradas automáticamente en un documento de Excel a través de un software específico. Para el análisis de datos se usaron los valores de peso obtenidos a partir de las 3 horas desde el inicio del ensayo en intervalos de 10 minutos.

El dato de resistencia al vapor de agua del film se determinó analizando por regresión lineal la pendiente de la recta obtenida tras representar gráficamente la variación del peso del recipiente ( $\Delta w$ ) frente a la variación del tiempo ( $\Delta t$ ). El índice de transmisión de vapor de agua (WVTR), la permeancia al vapor de agua y la permeabilidad al vapor de agua (WVP) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones (3.2), (3.3) y (3.4) respectivamente:

$$WVTR \left( \frac{g}{s * m^2} \right) = \frac{\Delta w}{\Delta t * A} \quad (3.2)$$

$$permeancia \left( \frac{g}{s * m^2 * Pa} \right) = \frac{WVTR}{\Delta P} \quad (3.3)$$

$$WVP \left( \frac{g}{s * m * Pa} \right) = permeancia * grosor \ film \quad (3.4)$$

Donde  $\Delta w/\Delta t$  (g/s) es el flujo medido como variación del peso del recipiente  $\Delta w$  por unidad de tiempo frente a la variación del tiempo  $\Delta t$ ,  $A$  ( $m^2$ ) es el área total de film expuesto (determinada a partir del área de la apertura del soporte  $1 * 10^{-3} m^2$ ) y  $\Delta P$  (Pa) es la diferencia presión de vapor de agua (4245 Pa a  $30^\circ C$ )<sup>34</sup> asumiendo un 100% de saturación dentro del recipiente y un 0% fuera del recipiente dentro de la cámara con silica gel.

### 3.3.5 Índice de hinchamiento

Este ensayo se llevó a cabo para determinar el porcentaje máximo de absorción de líquido de cada film preparado, mantenido en un recipiente cerrado a temperatura ambiente. Se tomó una muestra de entre 0,1 y 0,5 gramos y se suspendió en un volumen en exceso (10 ml) de líquido de inmersión. El perfil de hinchamiento de cada film se evaluó usando como medio de hinchamiento tampón fosfato salino (PBS) (pH=7,4) y fluido de herida simulado (SWF) (2% BSA, 0,02 M  $CaCl_2$ , 0,4 M NaCl, 0,08 M tampón Tris)<sup>5</sup> (pH=7,5). Se tomaron medidas de peso en una balanza analítica cada 10 minutos durante un total de 180 minutos. La medida se realizó extrayendo cada film del líquido de inmersión y eliminando el líquido en exceso con papel de filtro. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El cálculo del índice de hinchamiento en porcentaje se realizó según la ecuación (3.5):

$$\text{Índice de hinchamiento (\%)} = \frac{P_t - P_0}{P_0} * 100 \quad (3.5)$$

Donde  $P_t$  es el peso del film a tiempo  $t$  y  $P_0$  es el peso inicial del film.

### 3.3.6 Evaluación del perfil de liberación de MnL

Se evaluó el perfil de liberación de MnL de los films 0,1% MnL preparados, mantenidos a temperatura ambiente en un recipiente cerrado. Se pesó una muestra de  $\approx 1,0$  gramos de cada film y se suspendió en 1,0 ml de solución de liberación. Se incubaron las muestras a  $37^\circ C$  con

agitación constante a 100 rpm durante la duración total del ensayo (agitador-incubador Heidolph 1000, Alemania). Se tomaron muestras de 250  $\mu\text{l}$  a intervalos preestablecidos de tiempo, reponiendo el mismo volumen de medio de liberación. Se determinó la concentración de MnL en las muestras midiendo su absorbancia ( $\lambda_{\text{abs}}=500\text{ nm}$ ) en un espectrofotómetro Evolution 60s UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU) de acuerdo con la recta de calibrado calculada para el complejo ( $\text{Abs}=696 \cdot [\text{MnL}]+0.152$ ). Se evaluó la liberación usando como medio de liberación tampón fosfato salino (pH=7,4) y fluido de herida simulado (2% BSA, 0,02 M  $\text{CaCl}_2$ , 0,4 M NaCl, 0,08 M tampón Tris)<sup>5</sup> (pH=7,5). Todos los experimentos se realizaron por triplicado

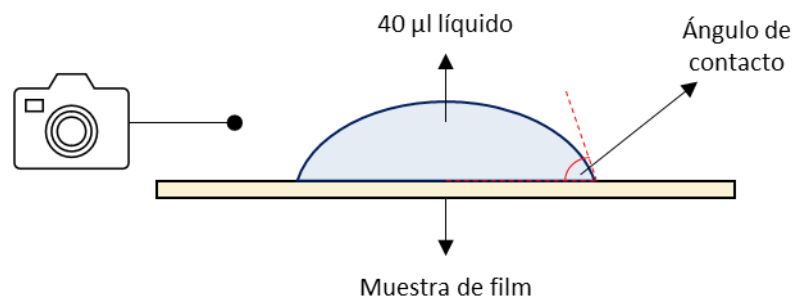
### 3.3.7 Adsorción de proteínas

La concentración de proteínas en las muestras se determinó utilizando el kit comercial de evaluación de proteínas BCA (Millipore, Estados Unidos). Se tomaron muestras de film de  $\approx 1,0\text{ cm}^2$  y se incubaron en 1,0 ml de una disolución 0,2% (m/v) BSA durante 1 hora a 37°C con agitación continua a 100 rpm (agitador-incubador Heidolph 1000, Alemania). Una vez finalizado el tiempo de incubación se retiró cada muestra de la disolución y se lavó con 1,0 ml de agua destilada, recogiendo el agua de lavado en un tubo. Se evaluaron como muestras el líquido remanente de la incubación y la solución de lavado. Se determinó la concentración proteica de acuerdo al protocolo establecido en el kit comercial para un ensayo a microescala en una placa de 96 pocillos, midiendo la absorbancia ( $\lambda_{\text{abs}}=570\text{ nm}$ ) de la placa e interpolando en la curva de calibrado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 3.3.8 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se determinó por el método de la gota sésil. Este método se basa en la medición del ángulo generado en la intersección de las interfases líquido/sólido y líquido/gas, donde el líquido es agua destilada, el sólido es el film evaluado y el gas es el aire atmosférico. Esto con el fin de determinar las propiedades de humectabilidad de la muestra, así como el carácter hidrofílico/hidrofóbico de la superficie del film.

Se tomo una muestra de cada film y se depositaron 40  $\mu\text{l}$  de agua destilada con una micropipeta, pasado 1 segundo se tomó una fotografía de la gota con una cámara digital (108 MP, Xiaomi, China). El análisis de imagen se realizó con el software *ImageJ*. En la Figura 3.3 se representa un esquema de este proceso. Todos los experimentos ser realizaron por triplicado.



**Figura 3.3** Representación esquemática de la determinación del ángulo de contacto.

### 3.4 Evaluación en cultivos celulares *in vitro* de queratinocitos humanos HaCaT

Para la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad, proliferación celular y actividad antioxidante de los films y los complejos MnL se adquirió la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT (CLS, Cell Lines Service, GmbH, Alemania). Los queratinocitos fueron cultivados en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma –Aldrich Chemie, GmbH, Alemania) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de solución antibiótica (10.000 U/penicilina; 10 mg estreptomycin, Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Alemania). Las condiciones de cultivo fueron 37°C de temperatura, 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 95%

#### 3.4.1 Obtención de los extractos de los films

La obtención de los extractos de films se realizó siguiendo el protocolo establecido en la norma ISO 10993-12 (2022). Clasificando los films como un producto de tipo membrana según la Tabla 3.3, todos los procesos de extracción se realizaron bajo los mismo métodos y condiciones.

Se estableció una proporción de 0,1 gramos de film/1,0 ml de solución de extracción, incubando las muestras a 37°C durante 24 horas. Como medio de extracción se utilizó tampón fosfato salino (pH=7,4) en todos los casos. Para realizar la evaluación de los extractos sobre cultivos celulares se realizaron diluciones seriadas de cada muestra en el medio de cultivo específico del ensayo a realizar.

<i>Espesor (mm)</i>	<i>Proporción de extracción (área superficial o masa/volumen)</i>	<i>Ejemplos de formas de los materiales</i>
< 0,5	6 cm <sup>2</sup> /ml	Película, lámina, pared de un tubo
0,5 a 1,0	3 cm <sup>2</sup> /ml	Pared de un tubo, placa, artículos moldeados pequeños
> 1,0	3 cm <sup>2</sup> /ml	Artículos moldeados grandes
<i>Productos sólidos de forma irregular</i>	0,2 g/ml	Polvo, gránulos, espuma, artículos moldeados no absorbentes, materiales porosos de alta densidad
<i>Productos porosos de forma irregular</i>	0,1 g/ml	Membranas, textiles

**Tabla 3.3** Áreas superficiales estándar y volúmenes del líquido extractor establecidos por la norma ISO 10993-12 para la evaluación biológica de productos sanitarios.

#### 3.4.2 Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*. Ensayo de recaptación del rojo neutro

La biocompatibilidad de los films y el MnL se determinó mediante el ensayo de captación del rojo neutro. Este ensayo permite obtener una estimación cuantitativa del número de células viables en un cultivo celular midiendo por absorbancia la cantidad de colorante captado en una densidad celular conocida. El método del ensayo se basa en la capacidad de las células viables

para captar el colorante que tiñe sus lisosomas. una vez finalizada la incubación, se libera el colorante de las células y se diluye en una solución ácida para facilitar su cuantificación por métodos espectrofotométricos.<sup>35</sup>

Para la realización del ensayo, se sembraron queratinocitos a una densidad de  $\approx 5000$  células/pocillo en placas de 96 pocillos, se incubaron durante 24 horas previas al tratamiento con las muestras para asegurar la adhesión celular. Una vez finalizado el tiempo de incubación se trató el cultivo con diluciones 1:10, 1:25 y 1:50 de cada uno de los films blancos sintetizados (diluciones realizadas a partir de extractos de cada film en PBS), así como diluciones de entre 0,0009 mM y 0,25 mM de MnL. Para la cuantificación del número de células viables, se incluyó una recta de calibrado en el rango 0 – 5000 células/pocillo. Todas las diluciones usadas como tratamiento sobre las células se realizaron en medio de cultivo. Se incubó la placa durante 24 horas una vez iniciado el tratamiento.

Finalizado el tiempo de incubación se retiraron por aspiración las muestras y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de una disolución 50  $\mu$ g/ml de rojo neutro en medio de cultivo, se incubó la placa durante 3 horas permitiendo la captación del colorante por parte de las células viables. Pasado este tiempo se retiró la solución rojo neutro/DMEM y se lavó el cultivo con 100  $\mu$ l/pocillo de PBS. Se añadieron 150  $\mu$ l/pocillo de solución fijadora (1,37 ml formaldehído 37%/100 ml PBS) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos, se retiró la solución fijadora y se lavó 2 veces con PBS. Se añadieron 150  $\mu$ l/pocillo de la solución de extracción del rojo neutro (1% (v/v) ácido acético glacial/49% (v/v) agua destilada/50% (v/v) etanol) y se cuantificó espectrofotométricamente la absorbancia a  $\lambda_{\text{abs}}=540$  nm del rojo neutro en un lector placas, agitando previamente durante 60 segundos a 980 rpm (Espectrofotómetro de placas Multiskan, Thermo Scientific, EE. UU). Los datos de viabilidad en porcentaje fueron calculados en función de la recta de calibrado incluida en el ensayo y según la ecuación (3.6):

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Células viables}}{\text{Células totales}} * 100 \quad (3.6)$$

Se usó como control positivo medio de cultivo y como control negativo una disolución 0,1% (v/v) SDS/DMEM. Se incluyeron 3 réplicas de cada muestra.

#### 3.4.3 Evaluación de la viabilidad mitocondrial in vitro. Ensayo XTT

Otro método de evaluación de la biocompatibilidad de los films y el MnL en disolución fue mediante el ensayo XTT. Este ensayo se basa en la reducción de la sal de tetrasodio XTT (amarilla) (Alfa Aesar, Alemania) a formazán (naranja) a través del transporte electrónico en la membrana plasmática de células metabólicamente activas, esta reducción requiere un intermediador que actúe como aceptor de electrones, en este caso se usa el metosulfato de fenazina (PMS).<sup>36</sup> La determinación por métodos espectroscópicos de la absorbancia del formazán permite obtener una estimación cuantitativa del número de células viables en el cultivo.

Se describe a continuación el procedimiento para la determinación de la viabilidad por este método. Para este ensayo tanto la siembra del cultivo como las disoluciones de las muestras de tratamiento se realizaron en medio DMEM sin rojo fenol con el fin de evitar la interferencia de este marcador con la medida de absorbancia del formazán. Se sembraron queratinocitos a una

densidad de  $\approx 5000$  células/pocillo en placas de 96 pocillos, se incubaron durante 24 horas previas al tratamiento con las muestras para asegurar la adhesión celular. Una vez finalizado el tiempo de incubación se trató el cultivo con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de diluciones 1:10, 1:25 y 1:50 de cada uno de los films blancos sintetizados (diluciones realizadas a partir de extractos de cada film en PBS), así como diluciones de entre 0,0009 mM y 0,25 mM de MnL en medio de cultivo. Para la cuantificación del número de células viables, se incluyó una recta de calibrado en el rango 0 – 5000 células/pocillo. Todas las diluciones usadas como tratamiento sobre las células se realizaron en medio de cultivo. Se incubó la placa durante 24 horas una vez iniciado el tratamiento.

Finalizado el tiempo de incubación se retiraron por aspiración las muestras y se añadieron 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de una disolución 1:400 de PMS/XTT 5 mg/ml en PBS, se incubó la placa en condiciones de cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% humedad relativa) y se realizaron medidas de absorbancia a las 2, 3 y 4 horas desde el momento en que se añadió el reactivo PMS/XTT al cultivo. Se cuantificó espectroscópicamente la absorbancia del formazán ( $\lambda_{\text{abs}}=450$  nm) en un lector de placas, agitando previamente durante 60 segundos a 980 rpm. Los datos de viabilidad en porcentaje fueron calculados en función de la recta de calibrado incluida en el ensayo y según la ecuación (3.6). Se usó como control positivo medio de cultivo y como control negativo una disolución 0,1% (v/v) SDS/DMEM.

Una vez finalizada la toma de medidas se retiró el reactivo, se añadieron 150  $\mu\text{l}$ /pocillo de solución fijadora y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalizado este tiempo se retiró la solución fijadora y se lavó 2 veces con PBS para eliminar los residuos de formaldehído que puedan haber quedado en los pocillos de la placa. Se incluyeron 3 réplicas de cada muestra.

#### 3.4.4 Evaluación de la proliferación celular en un ambiente extracelular oxidativo

Una vez evaluada la biocompatibilidad de los films y el MnL, se diseñó un ensayo de proliferación celular para evaluar su efecto antioxidante en un ambiente extracelular oxidativo, donde el tratamiento de las células se realizó con diluciones de extractos de film y MnL en conjunto con agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e hidropéroxido de tert-butilo (t-BHP) como agentes oxidantes. Se determinó la viabilidad celular con el ensayo XTT (Alfa Aesar, Alemania).

Este ensayo se realizó en dos ocasiones. La primera vez se evaluaron cuatro disoluciones 1  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$  de MnL con el fin de realizar un primer cribado sobre las posibles concentraciones con mayor actividad antioxidante dentro del rango estudiado inicialmente (0,0009 mM – 0,25 mM) en los ensayos de citotoxicidad. Una vez finalizado y en función de los resultados obtenidos se repitió una segunda vez, seleccionando las concentraciones de MnL en las que se observó mayor actividad antioxidante. Ambos ensayos se realizaron con la misma metodología e incluyendo tres réplicas para cada muestra evaluada.

A continuación, se describe el procedimiento para la determinación de la viabilidad por este método para el segundo ensayo realizado. Para este ensayo tanto la siembra del cultivo como las disoluciones de las muestras de tratamiento se realizaron en medio DMEM sin rojo fenol con el fin de evitar la interferencia de este marcador con la medida de absorbancia. Se sembraron

queratinocitos a una densidad de  $\approx 5000$  células/pocillo en placas de 96 pocillos, se incubaron durante 24 horas previas al tratamiento con las muestras para asegurar la adhesión celular. Una vez finalizado el tiempo se realizó una coincubación del cultivo con dos tratamientos. Primero se trató el cultivo con 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de diluciones 40  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  y 70  $\mu\text{M}$  de MnL, después se añadió 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de la disolución de agente oxidante evaluada,  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$  o t-BHP 120  $\mu\text{M}$ , de manera que las concentraciones finales de MnL y agente oxidante en cada pocillo fueron 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 35  $\mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  o t-BHP 60  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Para la cuantificación del número de células viables, se incluyó una recta de calibrado en el rango 0 – 5000 células/pocillo. Todas las diluciones usadas como tratamiento sobre las células se realizaron en medio de cultivo. Se incubó la placa durante 24 horas una vez iniciado el tratamiento.

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento se continuó el ensayo de la misma forma que el ensayo de evaluación de la viabilidad mitocondrial XTT del apartado anterior (apartado 3.4.3). Se usó como control positivo de viabilidad medio de cultivo, como control positivo de oxidación disoluciones  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  y t-BHP 60  $\mu\text{M}$  y como control positivo de actividad antioxidante disoluciones ácido ascórbico (AA) 200  $\mu\text{M}$  y  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -t) 200  $\mu\text{M}$ .

Además, se incluyeron dos controles positivos de efecto antioxidante en entorno extracelular oxidativo donde se coincubaron los agentes oxidantes y antioxidantes de la siguiente manera, 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$  más 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de ácido ascórbico 400  $\mu\text{M}$  (concentraciones finales en pocillo:  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  y ácido ascórbico 200  $\mu\text{M}$ ) y 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de t-BHP 120  $\mu\text{M}$  más 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de  $\alpha$ -tocoferol 400  $\mu\text{M}$  (concentraciones finales en pocillo: t-BHP 60  $\mu\text{M}$  y  $\alpha$ -tocoferol 200  $\mu\text{M}$ ).

Los datos de viabilidad en porcentaje fueron calculados en función de la recta de calibrado incluida en el ensayo y según la ecuación (3.6). Todas las etapas de incubación se realizaron en condiciones de cultivo (37°C, 5%  $\text{CO}_2$  y 95% humedad relativa). Se incluyeron 3 réplicas de cada muestra.

#### 3.4.5 Evaluación de migración celular. Ensayo scratch

Con este ensayo se evaluó la migración celular *in vitro*. Este método está basado en la observación de la migración celular en una monocapa confluyente tras la generación de una herida artificial denominada *scratch*, las células en el borde de la “herida” se moverán hacia el interior cerrando el espacio creado hasta establecer contacto con las células del lado contrario.<sup>37</sup>

A continuación, se describe el procedimiento para evaluar la migración celular *in vitro* por este método. Se sembraron queratinocitos a una densidad de  $\approx 250000$  células/pocillo en placas de 6 pocillos, se incubaron durante 24 horas previas al tratamiento con las muestras para asegurar la adhesión celular. Una vez finalizado el tiempo de incubación se trató el cultivo con 1 ml/pocillo de disoluciones de MnL 20, 25, 30 y 35  $\mu\text{M}$ , con un el filo de un bisturí se trazó una cruz (+) por la superficie inferior de cada pocillo a modo de marca guía y con una punta de micropipeta de 200  $\mu\text{l}$  se generó la “herida” sobre la monocapa trazando una línea vertical siguiendo la guía realizada con el bisturí. Se observó cada pocillo por microscopía óptica de campo oscuro (Leica DM IL LED, Alemania) y se tomaron fotos de la “herida” generada sobre la monocapa a intervalos

de tiempo determinados (Flexacam c5 12MP, Alemania). Como control positivo de migración normal se usó medio de cultivo, como control positivo de actividad antioxidante se usó una disolución de acetilcisteína 200  $\mu\text{M}$ . El dato sobre el efecto de las muestras en la migración celular del cultivo se calculó representando gráficamente la disminución del área aproximada de la “herida” a cada tiempo evaluado según la ecuación (3.7):

$$\text{Índice de cierre(\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100 \quad (3.7)$$

Donde  $A_0$  es el área inicial y  $A_t$  es el área medida a tiempo  $t$ .

Una vez finalizado el ensayo se eliminaron las muestras por aspiración y se fijaron las células aplicando una tinción Giemsa sobre el cultivo como se explica en el apartado siguiente.

#### 3.4.6 Evaluación de la morfología celular. Tinción Giemsa

El efecto del complejo de manganeso sobre la morfología celular de los queratinocitos se evaluó aplicando una tinción Giemsa al cultivo tras una incubación durante 24 horas de las células con distintas concentraciones de MnL. El colorante Giemsa es una mezcla de los compuestos azul de metileno y eosina que tiñen el núcleo y la cromatina de un tono azul y el citoplasma celular de un tono morado, esta distinción en la coloración de las estructuras celulares facilita la observación de la morfología celular.<sup>38</sup>

A continuación, se describe el procedimiento para evaluar la morfología celular por este método. Se sembraron queratinocitos a una densidad de  $\approx 250000$  células/pocillo en placas de 6 pocillos, se incubaron durante 24 horas previas al tratamiento con las muestras para asegurar la adhesión celular. Una vez finalizado el tiempo de incubación se trató el cultivo con 1 ml/pocillo de disoluciones de MnL 20, 25, 30 y 35  $\mu\text{M}$ . Se incubó la placa durante 24 horas una vez iniciado el tratamiento.

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento se eliminaron las muestras por aspiración y se lavó la placa con (1) 2 ml/pocillo de PBS, (2) con 1ml/pocillo de una disolución 1:1 de fijador (1:3 de ácido acético/metanol) en PBS y (3) se incubó la placa con 1 ml/pocillo de fijador durante 10 minutos.

Una vez pasado este tiempo se eliminó el fijador, se lavó la placa con 1ml/pocillo de metanol helado y se dejó secar completamente. Finalmente, se incubó la placa con 1 ml/pocillo de solución Giemsa durante 30 minutos, se lavó la placa con agua destilada y se dejó secar al aire.

Para determinar los posibles cambios en la morfología celular de los pocillos incubados con muestras de MnL se observó cada pocillo por microscopía óptica de campo oscuro (Leica DM IL LED, Alemania) y se tomaron fotos de las zonas de interés (Flexacam c5 12MP, Alemania), el análisis de imagen se realizó con el software *ImageJ*.

### 3.4.7 Evaluación de la actividad antioxidante frente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se evaluó la actividad antioxidante de los films cargados con 0,1% MnL y disoluciones de MnL a distintas concentraciones mediante un ensayo basado en la detección por métodos fluorimétricos de la 2,7-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente sintetizado a partir de la oxidación del 3,6-diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Calbiochem, Estados Unidos) no fluorescente.<sup>39</sup>

La membrana plasmática de las células viables es permeable a la DCFH-DA, una vez en el citoplasma esta es transformada en su intermediario no fluorescente DCFH por acción de las esterasas intracelulares, este intermediario es oxidado a su forma fluorescente DCF por acción del ROS intracelular. La DCF se caracteriza por emitir fluorescencia ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=498/522$  nm) donde su intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ROS generada.<sup>40</sup>

A continuación, se describe el procedimiento para la determinación de la viabilidad por este método. Para este ensayo tanto la siembra del cultivo como las disoluciones de las muestras de tratamiento se realizaron en medio DMEM sin rojo fenol con el fin de evitar la interferencia de este marcador con la medida de absorbancia. Se sembraron queratinocitos a una densidad de  $\approx 5000$  células/pocillo en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente, se incubaron durante 24 horas previas al tratamiento con las muestras para asegurar la adhesión celular.

Una vez finalizado el tiempo de adhesión se incubó el cultivo con 100  $\mu$ l/pocillo de una disolución 15  $\mu$ M de DCFH-DA durante 45 minutos, esto con el fin de permitir la acumulación del reactivo no fluorescente en el interior celular. Se eliminó el reactivo por aspiración y se lavó el cultivo 2 veces con PBS para eliminar los residuos de reactivo que pudieran quedar acumulados en las paredes de los pocillos de la placa e interferir con las medidas de fluorescencia.

El tratamiento de las células se realizó por coincubación del cultivo con las muestras de MnL y el agente oxidante simultáneamente, de manera similar al ensayo de proliferación celular en ambiente extracelular oxidativo (apartado 3.4.4). Primero se trató el cultivo con 50  $\mu$ l/pocillo de diluciones 40, 50, 60 y 70  $\mu$ M de MnL, después se añadió 50  $\mu$ l/pocillo de la disolución de agente oxidante evaluada, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu$ M o 2,4-clorodinitrobenzoceno (DNCB) 120  $\mu$ M, de manera que las concentraciones finales de MnL y agente oxidante en cada pocillo fueron 20, 25, 30 y 25  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M o DNCB 60  $\mu$ M, respectivamente.

También, se evaluó la actividad antioxidante de los films cargados con 0,1% MnL. Se añadió 50  $\mu$ l/pocillo de diluciones 1:5, 1:12,5 y 1:25 de cada film evaluado, después se añadió 50  $\mu$ l/pocillo de la disolución de agente oxidante, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu$ M o DNCB 120  $\mu$ M, de manera que las concentraciones finales de film 0,1% MnL y agente oxidante en cada pocillo fueron de 1:10, 1:25 y 1:50 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M o DNCB 60  $\mu$ M, respectivamente. Se incubó la placa durante 24 horas una vez iniciado el tratamiento.

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento se retiraron las muestras por aspiración y se añadió 100  $\mu$ l/pocillo de medio de cultivo fresco. Finalmente, se determinó la intensidad de fluorescencia del DCF utilizando un fluorímetro de placas ( $\lambda_{ex} / \lambda_{em}=495/529$  nm; Fluostar

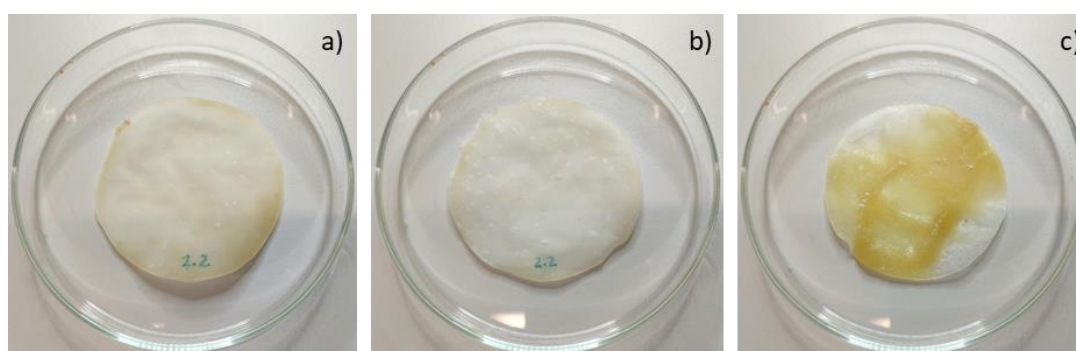
Optima, BMG labtech, Ortenberg, Alemania). Como control de producción basal de ROS se usó medio de cultivo, como control positivo de producción de ROS se usó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM y DNCB 60 μM, como control positivo de actividad antioxidante contra ROS se coincubaron los agentes oxidantes y antioxidantes de la siguiente manera: 50 μl/pocillo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM más 50 μl/pocillo de ácido ascórbico 400 μM (concentraciones finales en pocillo: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM y ácido ascórbico 200 μM) y 50 μl/pocillo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM más 50 μl/pocillo de acetilcisteína 400 μM (concentraciones finales en pocillo: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM y acetilcisteína 200 μM).

La actividad antioxidante se determinó en términos de intensidad de fluorescencia para cada muestra evaluada en función de la señal obtenida tanto en el control positivo de producción de ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM) como en el control de producción basal de ROS (medio de cultivo). Todas las etapas de incubación se realizaron en condiciones de cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% humedad relativa). Se incluyeron 3 réplicas de cada muestra.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Preparación de los films

La obtención de los films se realizó mediante la técnica de *solvent-casting*, método que se basa en la solubilización de un polímero y un plastificante en un solvente volátil. La extensión de la dispersión formada sobre una placa y su posterior secado (eliminación del solvente) facilita la intercalación de las fibras de polímero y plastificante, obteniendo films con propiedades fisicoquímicas de gran interés como una alta flexibilidad, poco grosor y relativa impermeabilidad.<sup>41</sup>



**Figura 4.1** Imágenes obtenidas de los films a) Film 1 (Blanco), b) Film 2 (Blanco) y c) Film 3 (Blanco).

En la Figura 4.1 se puede observar una muestra de cada film obtenido. La apariencia de los films fue evaluada por observación visual. Se observó una diferencia macroscópica entre la coloración y la textura del film 3 (Blanco) y los films 1 (Blanco) y 2 (Blanco). Esta misma coloración amarilla se observó en todas las dispersiones poliméricas durante el proceso de baño a 50°C que se realizó en la preparación de cada una de las muestras (apartado 3.2), sin embargo, la coloración solo permaneció en el film 3.

La variación en la coloración y la textura observada se puede relacionar con el proceso de reticulación, la concentración y el tipo de reticulante utilizado en cada caso, y el agente plastificante usado (3% (m/v) glicerol). Los films 1 y 2 tienen en común el uso de una disolución de  $\text{CaCl}_2$  como disolvente y reticulante del alginato de sodio, mientras que el film 3 únicamente atraviesa una reticulación química con epiclorohidrina.

Aadil *et al.* observaron una coloración amarilla/marrón en films de alginato/lignina reticulados químicamente con epiclorohidrina, esta coloración fue observada únicamente en films con agente plastificante (glicerol) añadido.<sup>42</sup> La coloración observada en los films sintetizados en este proyecto puede ser producto de un intermediario de la reacción química entre la epiclorohidrina y el glicerol en la dispersión, que se volatiliza y desaparece durante el proceso de secado. Teniendo en cuenta que la concentración de epiclorohidrina en el film 3 es 2,5 veces mayor que en los films 1 y 2, podría explicarse por qué en el film 3 esta coloración se mantiene aún después de seco.

Merakchi *et al.* sintetizaron partículas esféricas de alginato de sodio reticulado con  $\text{CaCl}_2$  (reticulación iónica) y epiclorohidrina (reticulación química), no utilizó ningún tipo de agente

plastificante, el resultado fueron partículas con una coloración ligeramente amarilla en seco que desaparece una vez se hinchan.<sup>43</sup> Esto podría indicarnos que el alginato de sodio también aporta a la aparición de esta coloración en los films.

## 4.2 Grosor

El grosor de los films se determinó principalmente para su uso en los cálculos relacionados al estudio de la permeabilidad al vapor de agua. Sin embargo, los datos obtenidos también aportaron información relevante sobre el efecto del proceso de reticulación en cada film.

El análisis de la varianza (ANOVA) confirmó que existen diferencias significativas en el efecto de la concentración y tipo de reticulante sobre el grosor de los films ( $p < 0,05$ ). Las diferencias no solo se observaron entre los 3 films evaluados, también se observó una alta variabilidad entre las distintas medidas tomadas dentro de una misma muestra, llegando a tener un error relativo superior al 10% en relación al grosor promedio de cada film. El test de *Student* confirmó que la mayor variabilidad entre las muestras se encuentra en el film 3 ( $p < 0,05$ ). Los resultados se resumen en la Tabla 4.1 y se expresan en media  $\pm$  desviación estándar.

El efecto de la reticulación en la heterogeneidad del grosor observado de cada film podría ser explicado por una reticulación irregular de los polímeros. Teniendo en cuenta que el film 1 y 2 primero atraviesan un proceso de reticulación iónica (RI), puede que al momento de añadir la epiclorohidrina para dar lugar a la reticulación química (RQ) haya una distribución heterogénea de los enlaces iónicos entre el  $\text{Ca}^{+2}$  y el alginato de sodio dentro de la dispersión polimérica, además de una distribución desordenada de las cadenas de los biopolímeros tanto de la CMC como del NaAlg. Esto da como resultado zonas de mayor reticulación que en el momento de secado dan lugar a áreas de un grosor promedio mayor en el film obtenido.

En el caso del film 3 solo se utiliza epiclorohidrina (ECH) como agente reticulante. La naturaleza covalente de los enlaces formados por la ECH, mucho más fuertes que los enlaces iónicos formados por el  $\text{Ca}^{+2}$ , hacen que esta dispersión sea mucho más viscosa llegándose a formar un hidrogel que adopta la forma del vaso donde se da la reacción de reticulación. Esto dificulta su extensión en la placa de Petri para la formación del film seco y da como resultado un film irregular con algunas zonas mucho más gruesas que otras.

Muestra	Grosor $\pm$ DS (mm)	Contenido de humedad $\pm$ DS (%)	Fuerza de rotura $\pm$ DS (kg) <sup>+</sup>	Distancia de rotura $\pm$ DS (mm) <sup>+</sup>	Permeabilidad $\pm$ DS (g/m <sup>2</sup> *s*Pa)
Film 1 (Blanco)	0,31 $\pm$ 0,03	30,49 $\pm$ 0,96	0,83 $\pm$ 0,16	5,52 $\pm$ 1,02	2,72E-10 $\pm$ 5,37E-11
Film 2 (Blanco)	0,33 $\pm$ 0,05	28,12 $\pm$ 0,775	0,91 $\pm$ 0,22	5,55 $\pm$ 0,86	1,92E-10 $\pm$ 3,40E-11
Film 3 (Blanco)	0,96 $\pm$ 0,09*	28,39 $\pm$ 0,56	0,44 $\pm$ 0,37*	6,44 $\pm$ 1,02*	4,74E-10 $\pm$ 2,30E-11*

**Tabla 4.1** Resultados experimentales de las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los films obtenidos en el trabajo. Se expresan los resultados en media  $\pm$  desviación estándar de todos los experimentos realizados por triplicado ( $n=3$ ). Se evaluaron las muestras entre sí con el test-t de Student \* ( $p < 0.05$ ) + ( $n=6$ ).

### 4.3 Contenido de humedad

Los resultados del análisis para determinar el contenido de agua en los films 1 (Blanco), 2 (Blanco) y 3 (Blanco) se resumen en la Tabla 4.1 y se expresan en media  $\pm$  desviación estándar. El análisis de la varianza (ANOVA) confirmó que existen diferencias significativas en el efecto de la concentración y tipo de reticulante sobre el contenido de humedad de los films ( $p < 0,05$ ).

Las ligeras diferencias observadas entre los contenidos de humedad de los films, principalmente entre el film 1 y los films 2 y 3 pueden ser explicadas por la naturaleza hidrofílica del agente plastificante utilizado en su síntesis (glicerol), así como el carácter hidrofílico de los grupos hidroxilo libres presentes en los biopolímeros (NaAlg y CMC).

Aunque la concentración de NaAlg y CMC es igual en todos los casos, la concentración de agente reticulante iónico ( $\text{CaCl}_2$ ) usado en la síntesis del film 1 es la mitad de la usada en el film 2, esto da a entender que el grado de reticulación es menor, es decir, hay menos grupos hidroxilo formando enlaces iónicos con el  $\text{Ca}^{+2}$ . Esto explicaría el incremento en el contenido de humedad del film 1 donde hay más grupos hidroxilo disponibles para unirse a moléculas de agua. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Costa *et al.*, quienes demostraron la relación existente entre la concentración de reticulante ( $\text{CaCl}_2$ ) y el contenido de humedad de films de alginato de sodio, donde se comprobó una disminución en el contenido de humedad con el incremento en la concentración de agente reticulante.<sup>44</sup>

### 4.4 Propiedades mecánicas

La fuerza de rotura (BS) y la distancia de rotura (DB) son los parámetros que representan las propiedades mecánicas de los films. Los resultados del análisis para los films 1 (Blanco), 2 (Blanco) y 3 (Blanco) se resumen en la Tabla 4.1 y se expresan en media  $\pm$  desviación estándar. El análisis de la varianza (ANOVA) confirmó que existen diferencias significativas en el efecto de la concentración y tipo de reticulante sobre la fuerza y distancia de rotura en los films ( $p < 0,05$ ).

La fuerza de rotura incrementó notoriamente con la concentración de  $\text{CaCl}_2$  usada para la reticulación iónica de los films, pasando de  $0,83 \pm 0,16$  kg a  $0,91 \pm 0,22$  kg entre el film 1 y 2 respectivamente. Esto se debe al desarrollo de una estructura polimérica más rígida a mayores concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ . Los resultados coinciden con los obtenidos por Benavides *et al.*, quienes demostraron el incremento de la fuerza de rotura en films de NaAlg a concentraciones crecientes del agente reticulante ( $\text{CaCO}_3$ ), también observaron una disminución en el índice de elasticidad con el aumento de la concentración de  $\text{CaCO}_3$ .<sup>45</sup>

Los resultados obtenidos en la determinación de la distancia de rotura de los films evaluados no se corresponden con los hallados en la bibliografía, es posible que la diferencia en las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  entre el film 1 y 2 no fuese suficiente para verse reflejada en la DB.

En el caso del film 3, los valores de BS y DB determinados varían mucho en comparación con los films 1 y 2, tanto la disminución en la BS como el aumento de la DB pueden ser explicados por el método de reticulación empleado. En la reticulación química se da una interacción desorganizada entre las cadenas de polímero y la epiclorohidrina, que rompe con la

conformación ordenada que tienden a adaptar tanto el NaAlg como la CMC, esto da lugar a la formación de regiones amorfas de menor resistencia, pero que confieren mayor capacidad de elongación al film en el momento de la rotura.

Shi *et al.* determinaron que la reticulación de celulosa con epíclorohidrina para la síntesis de membranas resultó en una disminución de la estructura cristalina del polímero y un aumento en las regiones amorfas, lo cual tuvo un efecto en las propiedades mecánicas disminuyendo la resistencia y aumentando la elasticidad de las membranas.<sup>46</sup> Esto coincide con nuestros resultados experimentales obtenidos sobre los films sintetizados.

#### 4.5 Permeabilidad al vapor de agua

Los resultados del análisis para determinar la permeabilidad de los films 1 (Blanco), 2 (Blanco) y 3 (Blanco) se resumen en la Tabla 4.1 y se expresan en media  $\pm$  desviación estándar. El análisis de la varianza (ANOVA) confirmó que existen diferencias significativas en el efecto de la concentración y tipo de reticulante sobre la permeabilidad de los films ( $p < 0,05$ ).

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) es un parámetro importante en los films destinados al tratamiento de las heridas crónicas exudativas, si la WVP es demasiado alta se dará una deshidratación de la lesión, lo que dificulta la curación de la herida. Por otro lado, si la WVP es muy baja se dará una oclusión de la zona, lo que evitará el drenaje del exudado y creará un ambiente que facilite las infecciones.<sup>47</sup>

De las 3 muestras evaluadas el film con menor WVP fue el film 2 (Blanco) con una permeabilidad de  $1,92E-10 \pm 3,40E-11$  g/m\*s\*Pa. Este dato puede ser explicado por el alto nivel de reticulación que experimenta este film, el incremento en la rigidez de la estructura polimérica a causa de la concentración de reticulante iónico (0,1% CaCl<sub>2</sub>) usada, así como la segunda reticulación con epíclorohidrina (reticulación química) no solo disminuyen la cantidad de grupos hidroxilo disponibles en la estructura del polímero para atraer moléculas de agua, también reducen el espacio disponible entre las cadenas de los polímeros por el que las moléculas de agua pueden difundir.

En comparativa con el film 1 (Blanco) que se trata con la mitad de la concentración de reticulante iónico (0,05% CaCl<sub>2</sub>) que el film 2, la permeabilidad al vapor de agua es mayor, siendo de  $2,72E-10 \pm 5,37E-11$  g/m\*s\*Pa. De manera similar al caso anterior, el film 1 tiene una mayor cantidad de grupos hidroxilo disponibles que atraen más fácilmente las moléculas de agua hacia el interior del entramado polimérico, además, su grado de reticulación menor genera una estructura donde las cadenas de NaAlg y CMC se encuentran más separadas, facilitando el movimiento de moléculas de agua a través del film.

Por otro lado, la permeabilidad del film 3 ( $4,74E-10 \pm 2,30E-11$  g/m\*s\*Pa) es  $\approx 1,7$  y  $\approx 2,5$  veces la obtenida con el film 1 y 2 respectivamente. Esto es consistente con el tipo de reticulación que se usa en su síntesis (únicamente reticulación química), donde la epíclorohidrina da lugar a una estructura polimérica desordenada con una mayor separación entre las cadenas del NaAlg y la CMC debido a su tamaño, mucho mayor en comparativa con los iones de Ca<sup>+2</sup> que actúan como agente reticulante en los films 1 y 2. Esta separación entre las cadenas de los biopolímeros

facilita la difusión de las moléculas de agua a través del film.

Según la bibliografía, Giz *et al.* demostraron una disminución en la permeabilidad al vapor de agua en relación a la concentración creciente de reticulante iónico ( $\text{Ca}^{+2}$ ) en films de alginato de sodio<sup>47</sup>. Esto se corresponde con nuestros resultados experimentales.

En relación a la influencia de la reticulación con epiclorohidrina en la permeabilidad al vapor de agua no se encontraron datos de otros autores, sin embargo, nuestras conclusiones se asocian adecuadamente a la bibliografía utilizada para explicar los resultados experimentales de las propiedades mecánicas de los films (apartado 4.4)

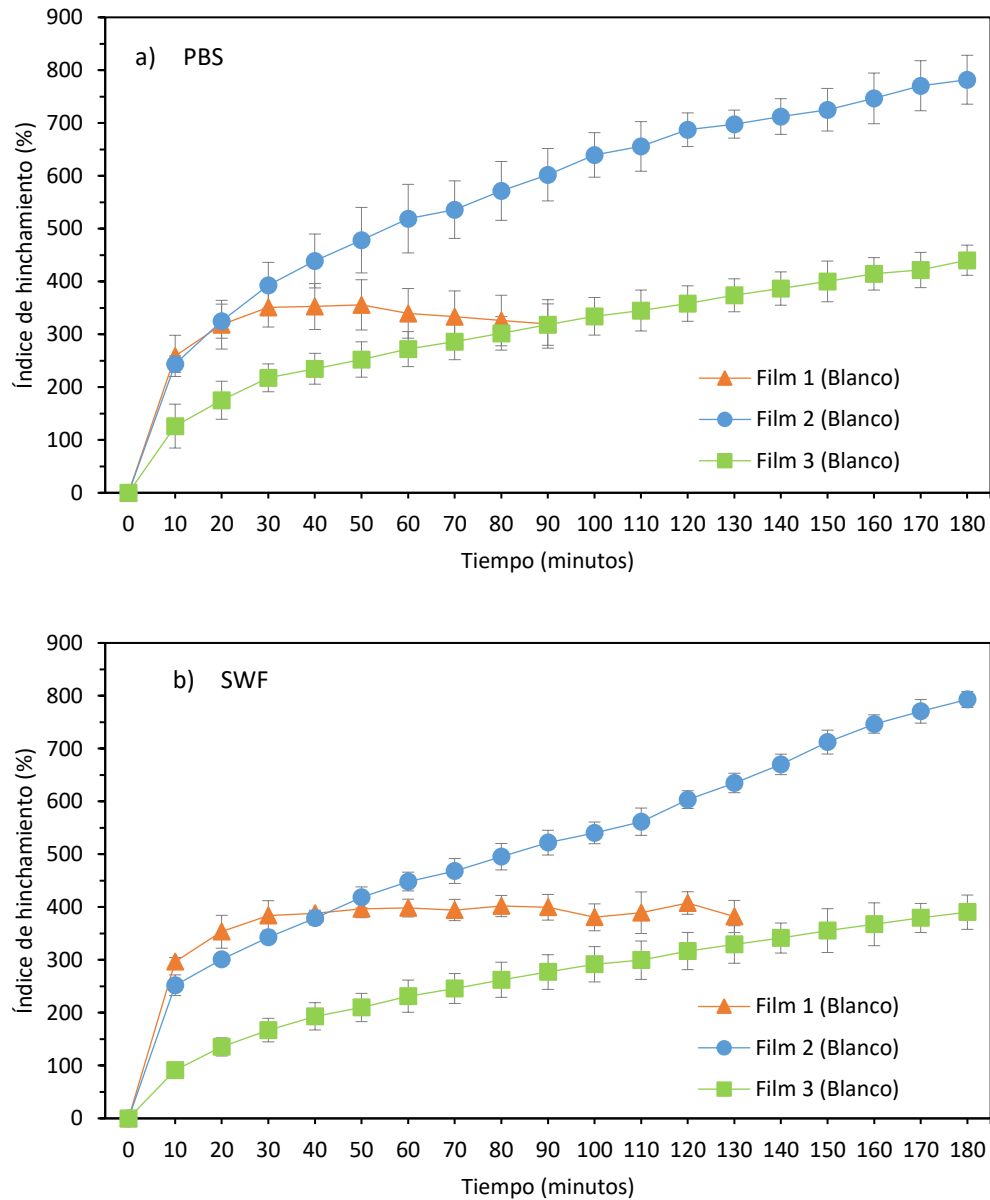
#### 4.6 Índice de hinchamiento

El índice de hinchamiento (IH) (%) de los films 1 (Blanco), 2 (Blanco) y 3 (Blanco) fue evaluado tanto en tampón fosfato salino (PBS) (pH=7,4), como en fluido de herida simulado (SWF) (2% BSA, 0,02 M  $\text{CaCl}_2$ , 0,4 M NaCl, 0,08 M tampón Tris)<sup>5</sup> (pH=7,5). Los resultados se representan en la Figura 4.2 y se dan como media  $\pm$  desviación estándar.

De los 3 films estudiados, el film 1 (Blanco) tuvo los peores resultados en cuanto a su capacidad de absorción de líquido, tanto en PBS como en SWF se dio una disolución completa del film a los 90 y 130 minutos respectivamente, lo que impidió la continuación de las medidas. Esta desintegración del film podría explicarse por su menor grado de reticulación en comparativa con los films 2 y 3, lo que podría facilitar la disolución de las cadenas de alginato y carboximetilcelulosa una vez se satura de líquido la matriz polimérica.

Como hinchamiento inicial a tiempo 10 minutos, el film incremento entre 2,5 y 3 veces su tamaño, llegando a un hinchamiento máximo de 350% (PBS) y 384% (SWF). Aunque el perfil de hinchamiento del film pueda parecer ideal, mostrando una mayor absorción de líquido inicial en comparativa con el film 2 y 3, su desintegración total lo descarta completamente como posible prototipo de apósito superabsorbente para el tratamiento de heridas crónicas exudativas.

En relación a los films 2 (Blanco) y 3 (Blanco), estos demostraron los mejores perfiles de hinchamiento tanto en PBS como en SWF, ambas muestras perduraron en el tiempo durante el desarrollo del ensayo sin mostrar signos de descomposición estructural. Esto indicaría un grado de reticulación deseable en el que la matriz polimérica permite la retención de líquido manteniendo la tensión entre las fibras de NaAlg y CMC. Sin embargo, hay una clara diferencia en la capacidad de hinchamiento entre las dos muestras, siendo el IH del film 2  $\approx$ 1,85 veces mayor que el IH del film 3.

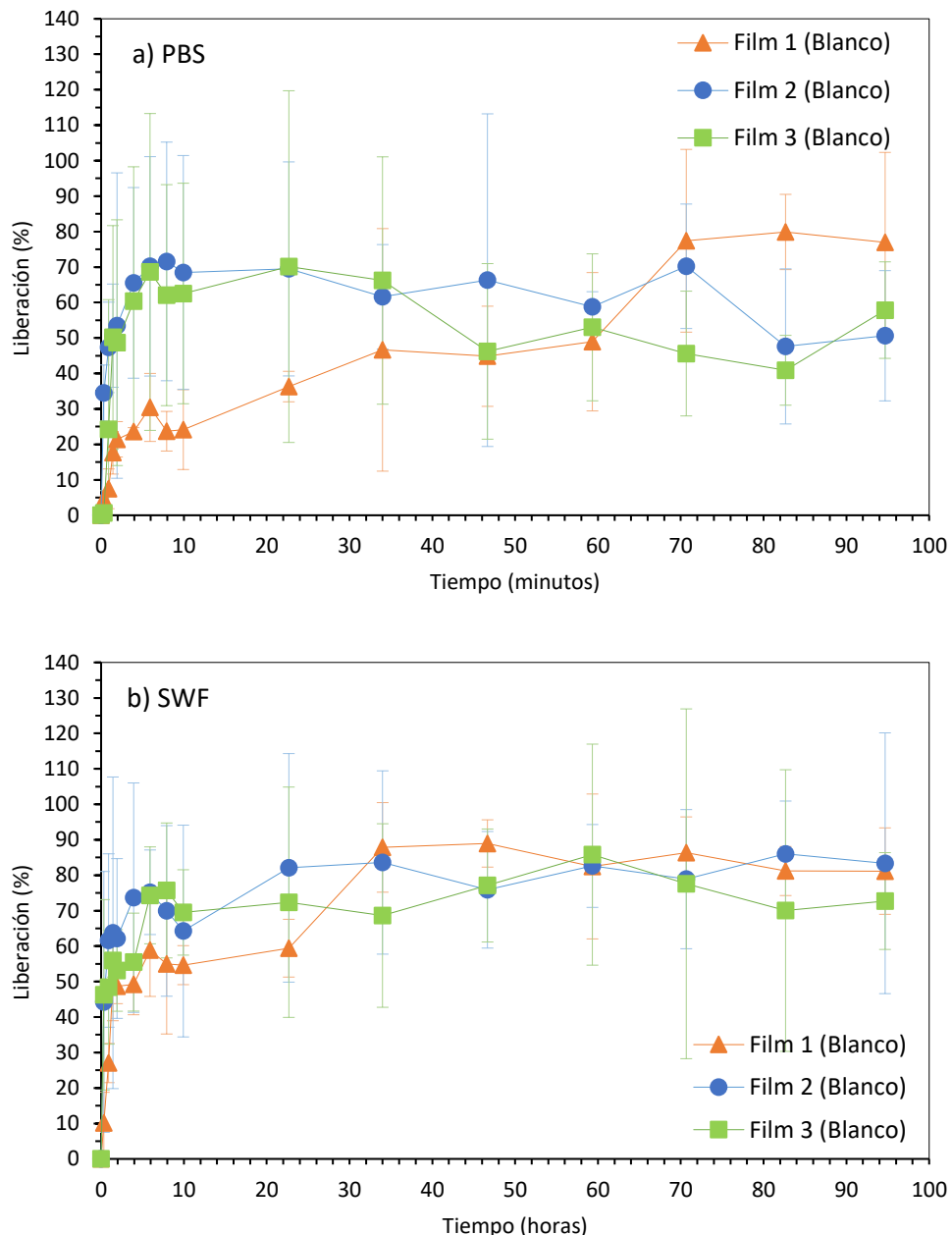


**Figura 4.2** Representación del índice de hinchamiento (%) en función del tiempo (minutos) de los films 1 (Blanco), 2 (Blanco) y 3 (Blanco) en a) tampón fosfato salino (pH=7,4) y b) fluido de herida simulado<sup>5</sup> (pH=7,5). Se expresan los resultados en media  $\pm$  desviación estándar de todas las medidas realizadas por triplicado ( $n=3$ ).

Aunque los resultados obtenidos podrían determinar al film 2 (Blanco) como la muestra más indicada para su uso como apósito para el tratamiento de heridas exudativas, es necesario realizar más ensayos experimentales que permitan establecer el índice de hinchamiento en equilibrio y el tiempo de desintegración de los films 2 y 3.

#### 4.7 Perfil de liberación *in vitro* de MnL

Los resultados de liberación de los complejos de Mn obtenidos a partir de los films (Figura 4.3) fueron extremadamente irregulares. Esto podría indicar que el método utilizado para el estudio de la liberación no fue el más adecuado (apartado 3.3.6). Por ejemplo, es posible que los errores experimentales del ensayo puedan ser explicados por la tendencia del film 1 para desintegrarse en medio líquido, observada en los resultados del índice de hinchamiento (apartado 4.6), y el poco volumen tanto de líquido de liberación usado, como volumen de muestra tomada en cada medida.



**Figura 4.3** Representación de la liberación (%) de MnL en función del tiempo (minutos) de los films 1 (0,1% MnL), 2 (0,1% MnL) y 3 (0,1% MnL) en a) tampón fosfato salino (pH=7,4) y b) fluido de herida simulado<sup>5</sup> (pH=7,5). Se expresan los resultados en media  $\pm$  desviación estándar de todas las medidas realizadas por triplicado ( $n=3$ ).

A pesar de la elevada desviación encontrada en los resultados experimentales, se evaluó el perfil de liberación de los films ajustándolos al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. Este modelo cinético es el más utilizado para definir el mecanismo de liberación de moléculas a partir de matrices poliméricas. Tiene en cuenta tanto la porosidad, como la capacidad de hinchamiento y la separación que ocurre entre las cadenas de los polímeros una vez se encuentran en disolución.<sup>48,49</sup> El modelo Korsmeyer-Peppas viene definido por la ecuación (4.1):

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K * t^n \quad (4.1)$$

Donde  $Q_t/Q_\infty$  es el porcentaje de molécula liberada a tiempo  $t$ ,  $K$  es la constante de difusión de la matriz de liberación y  $n$  es el exponente difusional, el valor de  $n$  es el que caracteriza el mecanismo de transporte que prima en el perfil de liberación de la molécula.<sup>50</sup>

Los resultados del ajuste, así como los valores del parámetro  $n$  de los films evaluados tanto en tampón fosfato salino como en fluido de herida simulado se resumen en la Tabla 4.2.

Muestra	Tampón fosfato salino		Fluido de herida simulado	
	$r^2$	$n$	$r^2$	$n$
Film 1 (0,1% MnL)	0,969	0,319	0,906	0,210
Film 2 (0,1% MnL)	0,997	0,244	-	-
Film 3 (0,1% MnL)	0,957	1,072	0,995	0,078

**Tabla 4.2** Resultados del ajuste por mínimos cuadrados de los resultados experimentales de liberación de MnL al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. Se incluye el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) y el valor del parámetro  $n$ .

Lo primero que se puede observar en los resultados del ajuste son los coeficientes de correlación relativamente bajos, esto es así por los valores de error experimental del ensayo. A pesar de esto, los datos obtenidos para el parámetro  $n$  nos permite tener una idea de los mecanismos de transporte que actúan sobre la liberación del complejo de manganeso desde la matriz polimérica de los films.

Los valores obtenidos para el parámetro  $n$  sugieren que el mecanismo predominante en la liberación del MnL es la difusión del complejo desde las capas más superficiales del film una vez entra en contacto con el medio acuoso, al finalizar este proceso el ritmo de liberación disminuye y predomina la difusión del MnL desde capas más interiores del film. Este mecanismo vendrá definido por el tamaño de poro, el grado de reticulación y la capacidad de hinchamiento de la matriz polimérica.<sup>50</sup>

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Maver *et al.*, quienes evaluaron el perfil de liberación *in vitro* de diclofenaco y lidocaína a partir de un film de NaAlg y CMC con el uso de una celda de difusión de Franz, sus resultados se ajustaron al modelo cinético Korsmeyer-Peppas, el cual determinó que el mecanismo de liberación fue una combinación de procesos de

difusión y procesos de erosión controlada de la matriz polimérica.<sup>50</sup>

Además, observando los resultados (Figura 4.3) se podría relacionar el perfil de liberación de los films con su índice de hinchamiento (apartado 4.6), en ambos casos el film 2 tiene el mayor índice de hinchamiento y la mayor liberación de MnL en comparativa con los films 1 y 3.

Para finalizar, atendiendo a los métodos y resultados que utilizan otros autores para llevar a cabo esta determinación, se hace evidente la necesidad no solo de repetir este ensayo, sino de mejorar la metodología empleada en este experimento con el fin de obtener resultados que aporten información fiable acerca del perfil de liberación de los films sintetizados.

#### 4.8 Adsorción de proteínas y ángulo de contacto

La adsorción de proteínas en mg BSA/cm<sup>2</sup> film y el ángulo de contacto (AC) (°) de los films 1 (Blanco), 2 (Blanco) y 3 (Blanco) se resumen en la Tabla 4.3, los resultados se representan como media  $\pm$  desviación estándar.

Muestra	Adsorción de proteínas $\pm$ DS (mg/cm <sup>2</sup> )	Ángulo de contacto $\pm$ DS (°)
Film 1 (Blanco)	0,46 $\pm$ 0,21	63,64 $\pm$ 4,16
Film 2 (Blanco)	0,61 $\pm$ 0,13	49,30 $\pm$ 3,87
Film 3 (Blanco)	0,41 $\pm$ 0,16	51,06 $\pm$ 9,21

**Tabla 4.3** Resultados experimentales de la absorción de proteína y el ángulo de contacto evaluado en agua destilada de los films obtenidos en el trabajo. Se expresan los resultados en media  $\pm$  desviación estándar de todos los experimentos realizados por triplicado (n=3).

El ángulo de contacto entre un líquido y una superficie permite determinar la humectabilidad de la superficie y da una idea de las propiedades hidrofílicas del material que se evalúa. Lee *et al.* demostró una relación existente entre el ángulo de contacto del agua, la adsorción proteica y la proliferación celular de fibroblastos de ratón en una membrana de polietileno, donde un AC de  $\approx 45^\circ$ - $62^\circ$  permitió un mayor nivel de adhesión y proliferación celular.<sup>51</sup> Así mismo, Machida-Sano *et al.* determinó la relación entre el tipo de reticulación iónica, la adhesión y proliferación celular de fibroblastos humanos y la adsorción de proteínas sobre una membrana de alginato de sodio.<sup>52</sup>

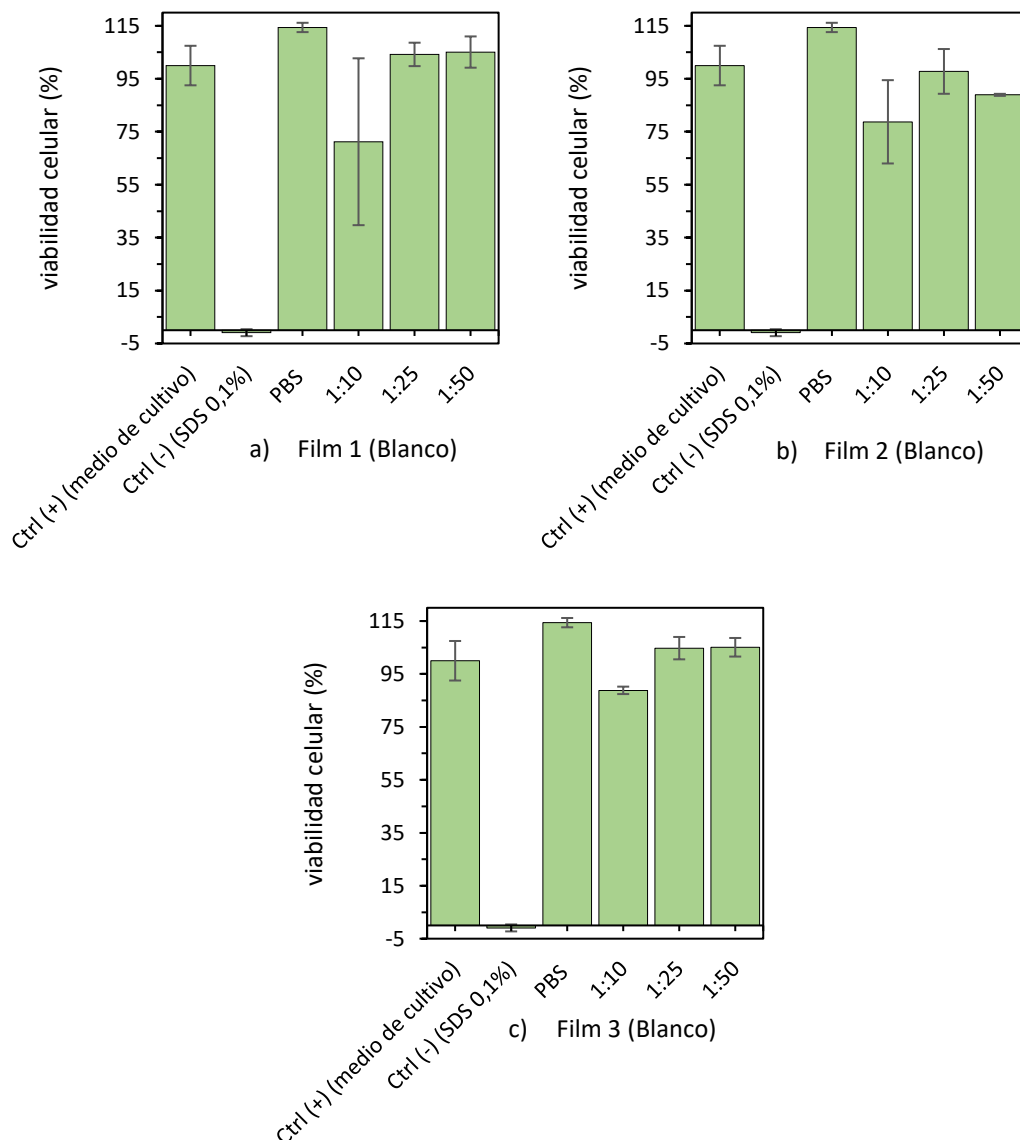
En este caso, las características de los films no permitieron evaluar la adsorción de proteínas según los métodos utilizados por los autores anteriormente mencionados, por esto se optó por evaluar la adsorción de proteínas según la metodología descrita en la sección de materiales y métodos de este trabajo (apartado 3.3.7). No se encontraron diferencias significativas en los resultados experimentales de adsorción de proteína o el ángulo de contacto de los films.

Aun así, se podrían relacionar las ligeras diferencias entre la cantidad de proteína adsorbida por cada muestra con los resultados obtenidos en la determinación del índice de hinchamiento (apartado 4.6) donde el film 2 tiene el mayor índice de hinchamiento y la mayor adsorción de proteínas en mg BSA/cm<sup>2</sup>. Además, los resultados obtenidos de ángulo de contacto entran en el

rango valores determinados por Lee *et al.* como positivos a la hora de promover la proliferación y adhesión celular de fibroblastos de ratón, lo que podría indicarnos que todos los films evaluados poseen esta cualidad.

#### 4.9 Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*. Ensayo de captación del rojo neutro

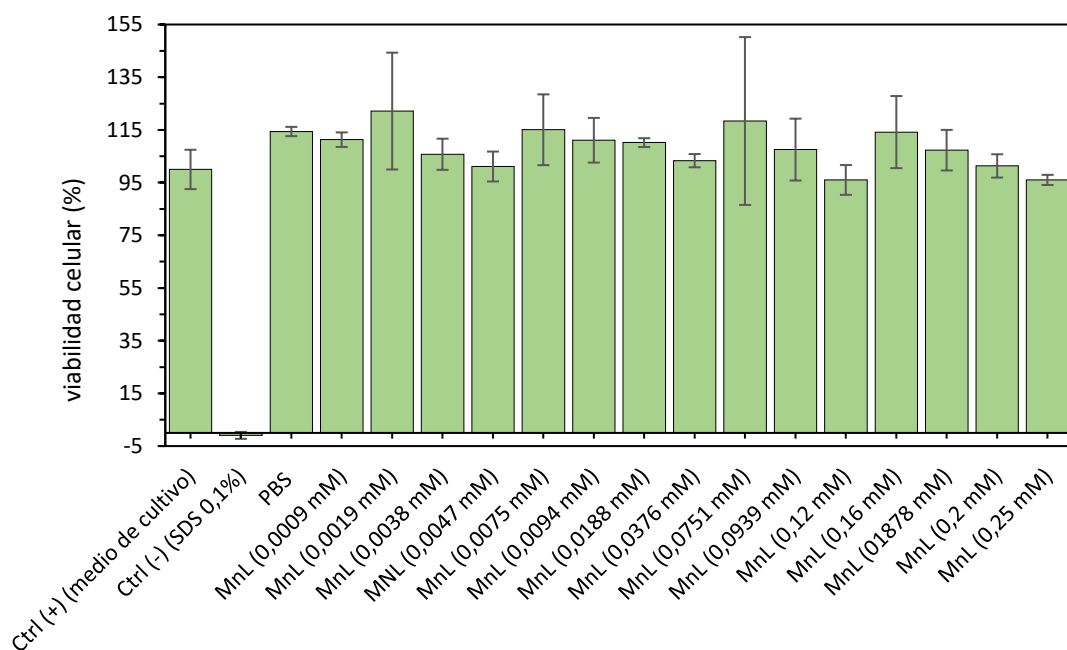
Con el fin de evaluar la biocompatibilidad de los componentes de los films obtenidos, así como del complejo de manganeso a distintas concentraciones, se realizó un ensayo de citotoxicidad basado en la captación del colorante rojo neutro por parte de las células viables sobre un cultivo de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT).



**Figura 4.4** Porcentaje de viabilidad de los queratinocitos determinado por el ensayo de captación del rojo neutro incubados 24 horas con disoluciones 1:10, 1:25 y 1:50 de los films a) 1 (Blanco), b) 2 (Blanco) y c) 3 (Blanco). Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad de las células incubadas con las muestras en comparativa con las células no tratadas. Los resultados tras 24 horas de incubación con distintas diluciones de los films 1 (Blanco), 2 (Blanco) y 3 (Blanco) (Figura 4.4) dieron resultados de viabilidad altos (>80%), excepto en el caso de las diluciones 1:10 de los films 1 y 2 con un 71% y 78% de viabilidad celular respectivamente. Esta disminución en los porcentajes de viabilidad no es suficiente para determinar un efecto citotóxico por parte de los films, por lo que se concluye que su composición es biocompatible.

En otros estudios se dan resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Por ejemplo, Sharma *et al.* evaluó la citotoxicidad de films de alginato de sodio, pectina y carboximetilcelulosa sobre células HaCaT mediante el ensayo MTT sin encontrar efectos significativos de los films sobre la viabilidad celular.<sup>53</sup>



**Figura 4.5** Porcentaje de viabilidad de los queratinocitos determinado por el ensayo de captación del rojo neutro incubados 24 horas con disoluciones 0,0009 mM – 0,25 mM de MnL en medio de cultivo. Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

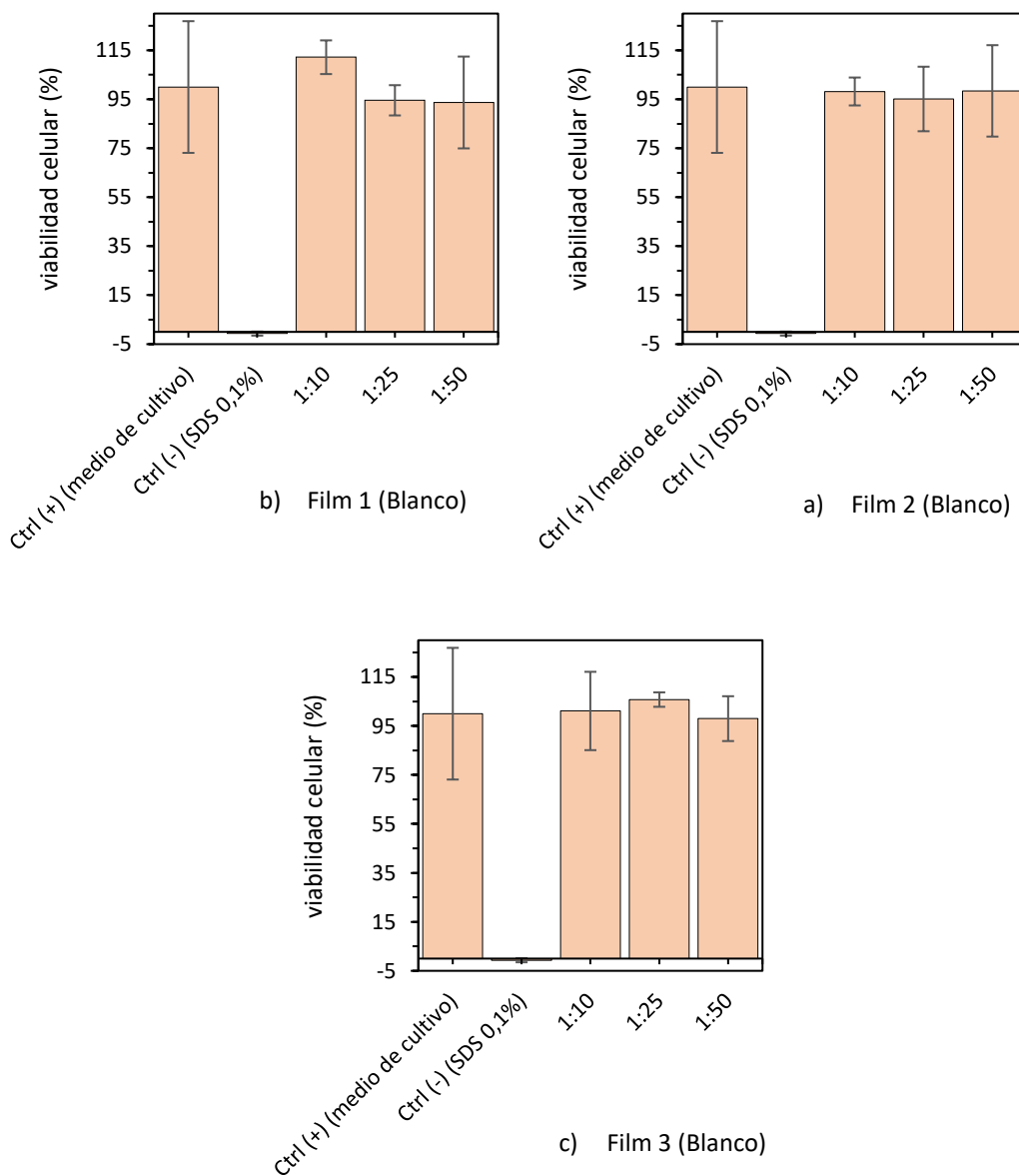
En relación a la citotoxicidad del complejo de manganeso, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad de las células incubadas con las muestras de MnL en comparativa con las células no tratadas. Los resultados tras 24 horas de incubación con distintas concentraciones del complejo en medio de cultivo (0,0009 mM – 0,25 mM) (Figura 4.5) dieron resultados de viabilidad altos (>96%), por lo que se concluye que no poseen una actividad citotóxica, al menos en ese rango de concentraciones y en los tiempos de exposición estudiados.

En la bibliografía no se encontraron datos que respaldaran estos resultados, principalmente por la falta de coincidencia en las concentraciones de complejo de manganeso evaluado, la línea celular utilizada y el método empleado para determinar la biocompatibilidad.

#### 4.10 Evaluación de la viabilidad mitocondrial *in vitro*. Ensayo XTT

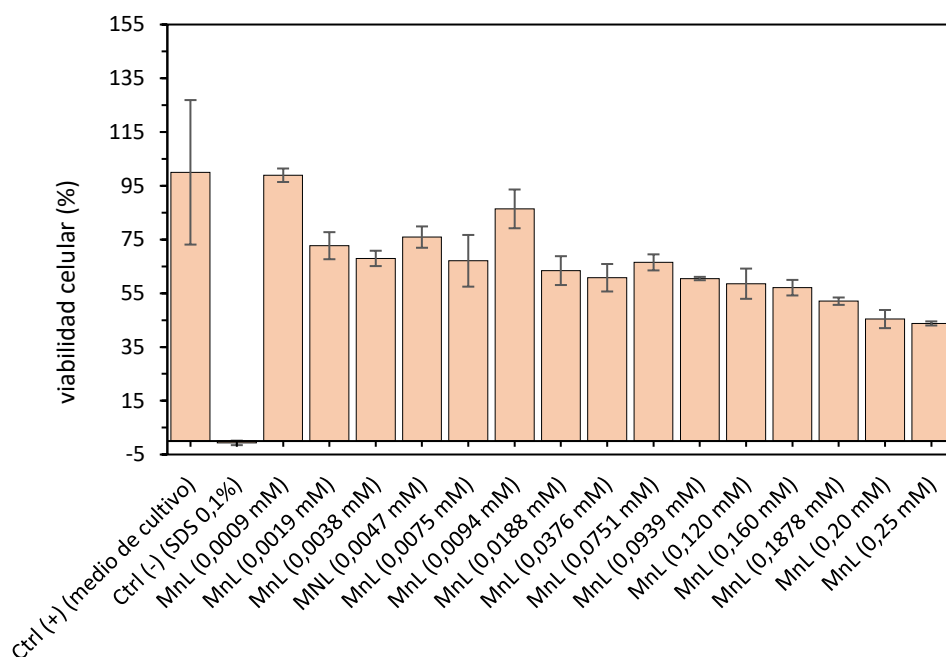
Con el fin de contrastar los resultados obtenidos y profundizar en el efecto citotóxico de los films sintetizados, así como del complejo de manganeso, se decidió realizar un segundo ensayo de viabilidad celular enfocado en la evaluación de la viabilidad mitocondrial y complementario del anterior.

El ensayo XTT se basa en la reducción de la sal de tetrasodio XTT a formazán por parte de las células metabólicamente activas.<sup>36</sup> A diferencia del ensayo de captación del rojo neutro, el cual evalúa la viabilidad en función de la integridad de la membrana plasmática, el ensayo XTT permite discriminar el efecto sobre el metabolismo celular de las muestras evaluadas que, aunque conserven su integridad de membrana, no son metabólicamente viables.



**Figura 4.6** Porcentaje de viabilidad de los queratinocitos determinado por el ensayo de XTT incubados 24 horas con disoluciones 1:10, 1:25 y 1:50 de los films a) 1 (Blanco), b) 2(Blanco) y c) 3 (Blanco). Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Los resultados de este ensayo (Figura 4.6) fueron similares a los obtenidos en la evaluación de la citotoxicidad por el método de recaptación del rojo neutro. No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad de las células incubadas con las muestras en comparativa con las células no tratadas. Los resultados tras 24 horas de incubación dieron resultados de viabilidad altos (>95%). No se observó un efecto citotóxico sobre el metabolismo mitocondrial por parte de los films, por lo que se concluye que su composición es biocompatible.



**Figura 4.7** Porcentaje de viabilidad de los queratinocitos determinado por el ensayo XTT incubados 24 horas con disoluciones 0,0009 mM – 0,25 mM de MnL en medio de cultivo. Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

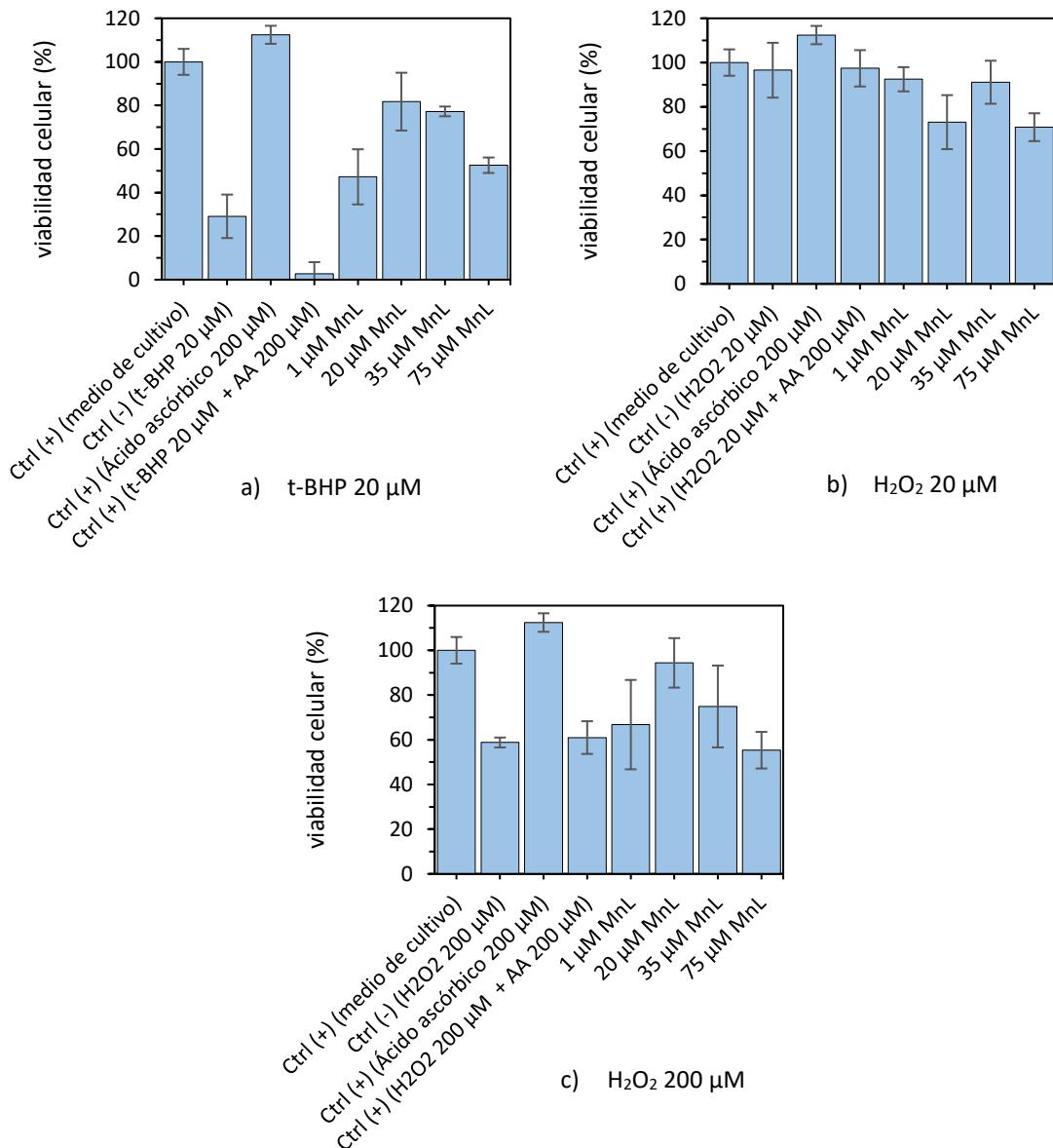
Sin embargo, en los resultados de viabilidad mitocondrial obtenidos tras la incubación con concentraciones de MnL 0,0009 mM – 0,25 mM (Figura 4.7) sí se encontraron diferencias significativas (análisis de la varianza - ANOVA) entre la concentración de tratamiento y la viabilidad metabólica ( $p<0,05$ ). El análisis estadístico de *Student* determinó que la mayor variabilidad entre las muestras se encontraba en las concentraciones superiores a 0,075 mM, donde se observó una disminución de la viabilidad mitocondrial (<60%) dosis-dependiente.

Estos resultados podrían compararse a los obtenidos por Chen *et al.*, quienes evaluaron la citotoxicidad de complejos de manganeso polinitrogenados sobre células de feocromocitoma de ratón (PC12) mediante el ensayo XTT. Los resultados de estos autores demostraron una relación dosis-dependiente de la viabilidad celular con una disminución la misma (<75%) a partir de una concentración 250  $\mu$ M.<sup>54</sup>

Estos resultados sugieren que el complejo de manganeso tiene un efecto citotóxico sobre la viabilidad mitocondrial a dosis altas (<0,075 mM) aunque no parece afectar a la integridad de la membrana plasmática. Teniendo en cuenta este efecto, se decidió excluir las concentraciones más altas de posteriores ensayos de viabilidad. Estos resultados, aunque preliminares, son fundamentales para incorporar posteriormente en estos sistemas tipo apósito, una dosis mínima eficaz y terapéutica, pero no citotóxica.

### 4.11 Evaluación de la proliferación celular en ambiente extracelular oxidativo

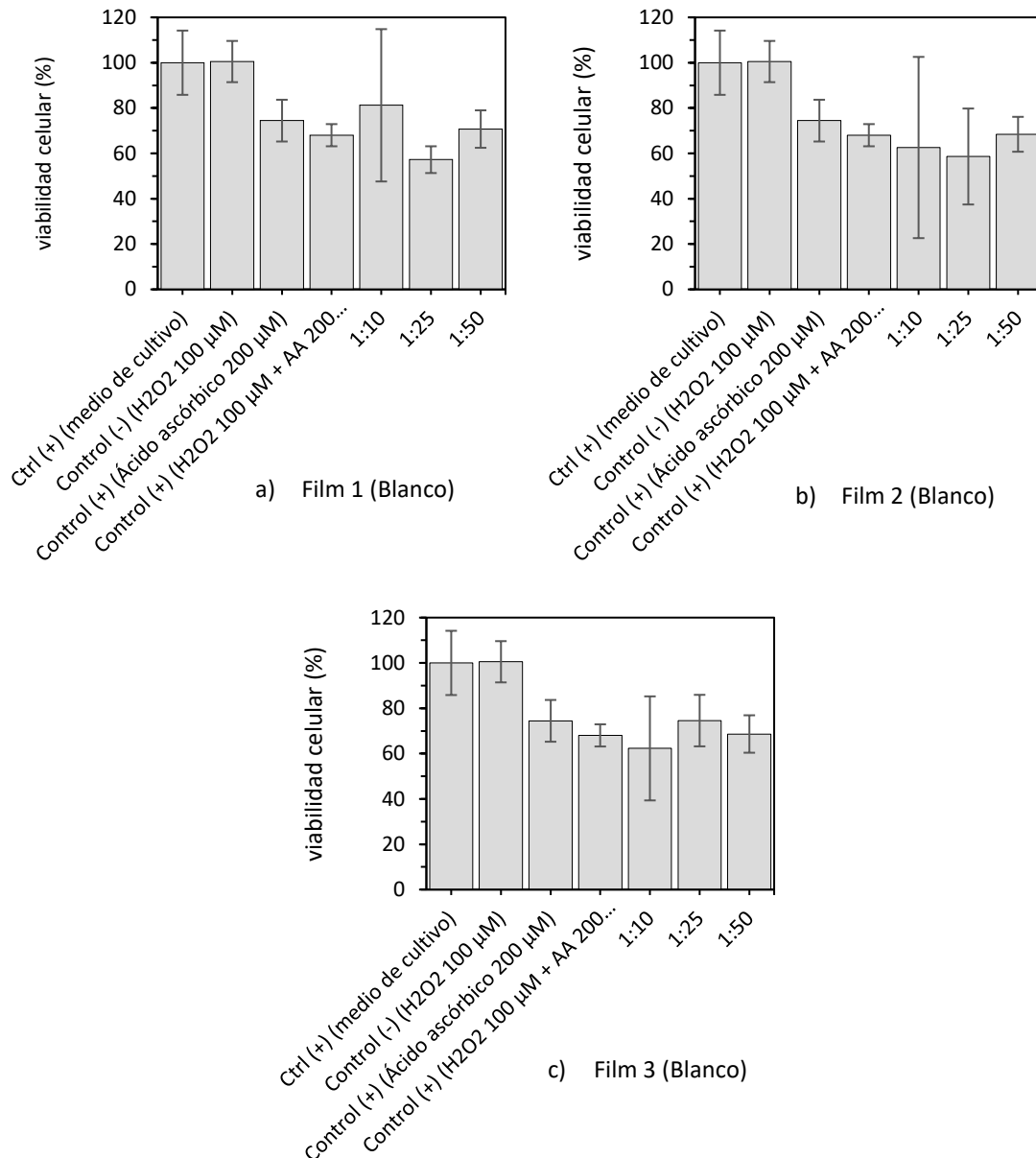
Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de los complejos de manganeso en el medio extracelular se coincubaron los queratinocitos con las concentraciones de MnL determinadas y un agente oxidante, se usó t-BHP 20  $\mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  como controles de oxidación. También se incluyó como control antioxidante ácido ascórbico 200  $\mu\text{M}$ . Cabe destacar que en el caso del control (+) (t-BHP 20  $\mu\text{M}$  + ácido ascórbico 200  $\mu\text{M}$ ) se dio una reacción entre los compuestos que impidió la correcta lectura de las muestras, tras la observación al microscopio de los pocillos afectados se confirmó que no hubo mortalidad celular, sin embargo, no se produjo una coloración en el medio que permitiera su lectura por métodos espectroscópicos.



**Figura 4.8** Porcentaje de viabilidad de los queratinocitos determinado por el ensayo XTT incubados 24 horas con disoluciones 1  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 35  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$  de MnL en medio con a) t-BHP 20  $\mu\text{M}$ , b)  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{M}$  y c)  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$ . Se usa como control positivo de actividad antioxidante ácido ascórbico 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

El análisis de varianza (ANOVA) determinó que existen diferencias significativas entre la concentración de MnL en el tratamiento y la viabilidad en ambiente oxidativo ( $p < 0,05$ ). En los resultados obtenidos para las células coincubadas con t-BHP 20  $\mu\text{M}$  (Figura 4.8-a) se observó que el mayor porcentaje de viabilidad ( $>77\%$ ) se dio con las concentraciones 20  $\mu\text{M}$  y 35  $\mu\text{M}$ , este efecto también se observó en las células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$  (Figura 4.8-c).

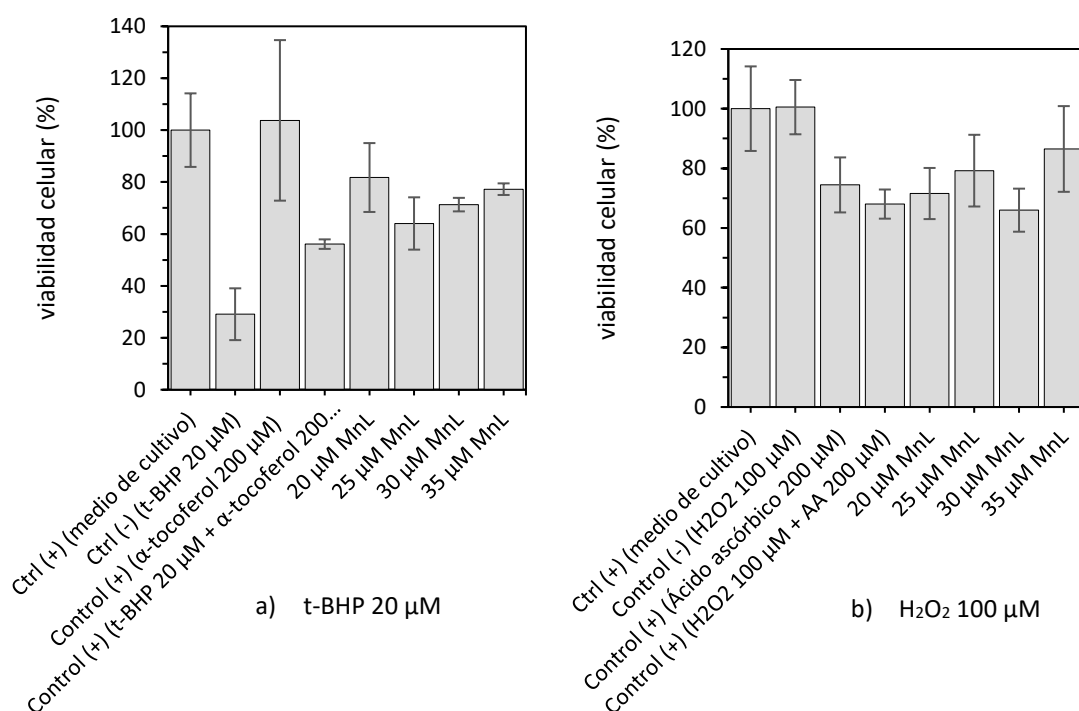
Por otro lado, no se pudo determinar una concentración que promoviera la proliferación en las células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{M}$  (Figura 4.8-c), la baja concentración del agente oxidante no permitió determinar el efecto de este sobre el cultivo, por lo que no se pudo evaluar la posible actividad antioxidante del complejo.



**Figura 4.9** Porcentaje de viabilidad de los queratinocitos determinado por el ensayo de XTT incubados 24 horas con disoluciones 1:10, 1:25 y 1:50 de los films a) 1 (Blanco), b) 2 (Blanco) y c) 3 (Blanco) en medio con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ , se usa como control positivo de actividad antioxidante ácido ascórbico 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

Una vez establecido el rango de concentraciones de MnL con mayor efecto antioxidante en un ambiente extracelular oxidativo (20  $\mu\text{M}$  – 35  $\mu\text{M}$ ) se repitió el ensayo ajustando la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100  $\mu\text{M}$ , esto con el fin de lograr un efecto oxidante en el entorno celular sin llegar a causar una excesiva mortalidad. Además, se evaluaron diluciones 1:10, 1:25 y 1:50 de los films 1 (Blanco), 2 (Blanco) y 3 (Blanco) sintetizados con la intención de determinar si la matriz de liberación del MnL podría actuar como coadyuvante en el efecto antioxidante del MnL.

En la Figura 4.9 se pueden observar los resultados de viabilidad celular de la coincubación de diluciones de los films con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100  $\mu\text{M}$  como agente oxidante. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en términos de actividad antioxidante entre la composición de los films evaluados y la viabilidad celular (expresado en %).



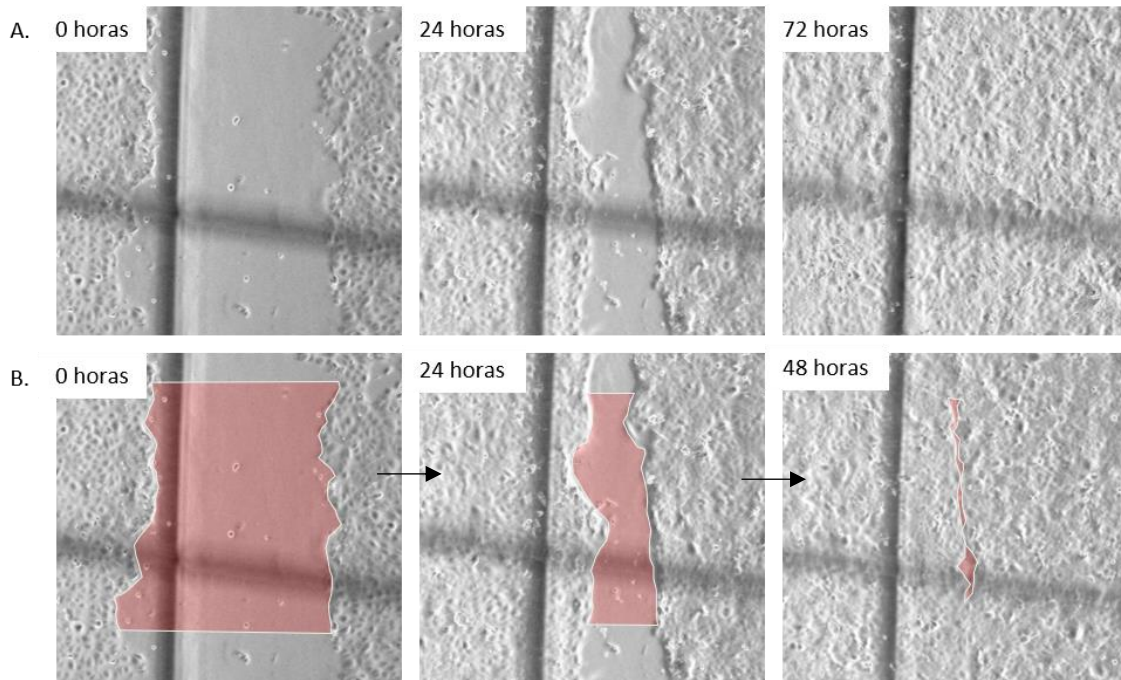
**Figura 4.10** Porcentaje de viabilidad de los queratinocitos determinado por el ensayo XTT incubados 24 horas con disoluciones 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 35  $\mu\text{M}$  de MnL en medio con a) t-BHP 20  $\mu\text{M}$ , y b)  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ . Se usó como controles positivos de actividad antioxidante  $\alpha$ -tocoferol 200  $\mu\text{M}$  (t-BHP) y ácido ascórbico 200  $\mu\text{M}$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

Por otro lado, observando los resultados del porcentaje de viabilidad de los queratinocitos coincubados con 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 35  $\mu\text{M}$  de MnL en medio con t-BHP 20  $\mu\text{M}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  (Figura 4.10) como agentes oxidantes, se pudo determinar que la concentración de complejo de manganeso con mayor actividad antioxidante fue 25  $\mu\text{M}$  MnL frente al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 20  $\mu\text{M}$  MnL frente al t-BHP.

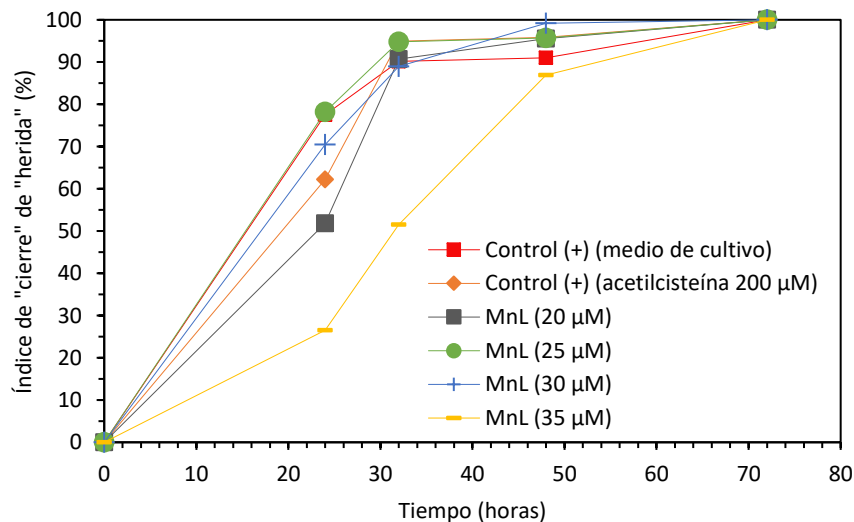
Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Chen *et al.*, quién demostró el efecto antioxidante de complejos de manganeso polinitrogenados sobre células tumorales y neuronales de ratón incubadas durante 24 horas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ , la viabilidad celular incrementó entre un 60% y un 90% en función del tiempo de preincubación de las células con el complejo de manganeso.<sup>54</sup>

#### 4.12 Evaluación de la migración celular. Ensayo *scratch*

Con el fin de determinar si el complejo de manganeso ligando podría tener algún efecto observable sobre la migración celular, se evaluó el “cierre” de una incisión realizada sobre una monocapa confluyente de queratinocitos. La Figura 4.11 ilustra algunos ejemplos de las imágenes de microscopía tomadas, así como de la medición del área en las muestras.



**Figura 4.11** A. Imágenes tomadas por microscopía óptica de la muestra  $20 \mu\text{M}$  MnL a distintos tiempos desde el inicio del ensayo. B. Representación del proceso de toma de medidas de área en la muestra  $20 \mu\text{M}$  MnL a distintos tiempos desde el inicio del ensayo. Tanto el tratamiento de las imágenes como la medición del área se realizó con el software ImageJ.



**Figura 4.12** Representación gráfica del índice de “cierre” de la incisión (%) realizada sobre la monocapa de queratinocitos en función del tiempo (horas). Se utiliza como control (+) de migración normal medio de cultivo y como control (+) de actividad antioxidante acetilcisteína  $200 \mu\text{M}$ .

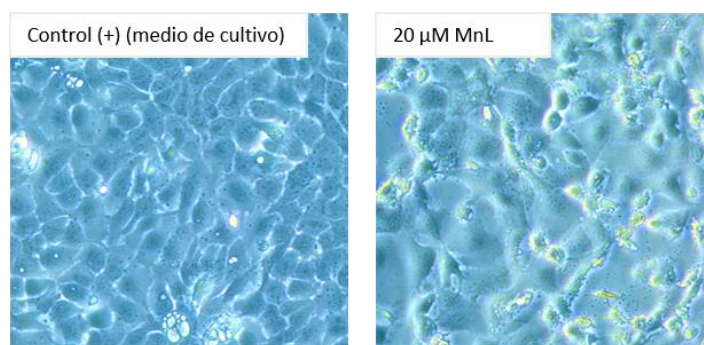
De todas la muestras y controles evaluados se observó el mejor efecto positivo en la migración celular con la concentración 25  $\mu\text{M}$  MnL, cuyo índice de “cierre” tras las primeras 24 horas de incubación fue del 78,2% (Figura 4.12), 0,68% y 15,8% por encima del control positivo para migración normal el control positivo para migración en medio antioxidante respectivamente.

En general, los resultados fueron muy similares para todas las concentraciones de MnL evaluadas, excepto en el caso de MnL 35  $\mu\text{M}$ , cuyo efecto final fue el mismo que en todas las muestras y controles, pero su velocidad de “cierre” fue mucho menor.

Los resultados generales de este ensayo podrían compararse con los obtenidos por Stelling *et al.* quienes demostraron el efecto positivo de  $\text{Mn}^{+2}$  sobre la migración de células de epitelio pulmonar de ratón (LLC), incubaron células LLC con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{MnCl}_2$  durante 1 hora y observaron un incremento en los eventos de migración del cultivo en comparativa con el control.<sup>55</sup>

#### 4.13 Evaluación de la morfología celular. Tinción Giemsa

Con objeto de evaluar los posibles cambios en la morfología celular de los queratinocitos provocados por el complejo de manganeso, se observó por microscopía óptica células HaCaT incubadas por 24 horas con 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 35  $\mu\text{M}$  de MnL y se comparó con el control (+) (medio de cultivo).



**Figura 4.13** Imágenes tomadas por microscopía óptica de queratinocitos humanos incubados 24 horas con 20  $\mu\text{M}$  MnL (derecha) en comparativa con el control (+) (medio de cultivo) (izquierda).

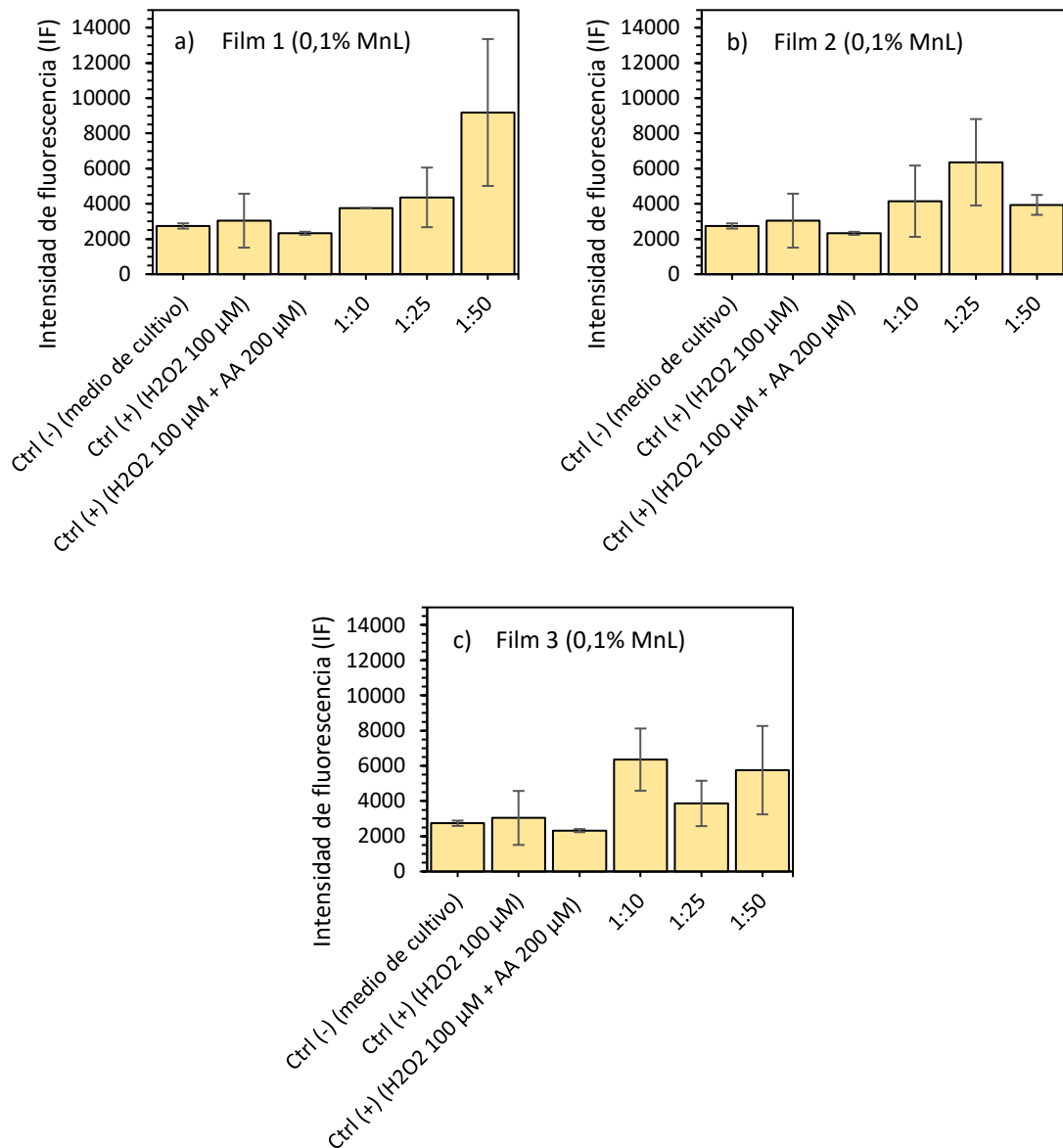
No se observaron diferencias macroscópicas en la morfología de las muestras en comparativa con el control positivo (Figura 4.13). Se podría concluir que el complejo de manganeso a las concentraciones evaluadas no tiene efectos sobre el tamaño, forma o estructura de las células HaCaT. No se encontró información en la bibliografía que respalde estas conclusiones, es necesario continuar investigando los efectos que el MnL pueda tener en la morfología celular o en su posible captación.

#### 4.14 Evaluación de la actividad antioxidante frente al ROS intracelular

Con la intención de profundizar en el efecto antioxidante de los complejos de manganeso, así como en el posible efecto coadyuvante que los films sintetizados, se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular en queratinocitos humanos tras su estimulación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  y 2,4-clorodinitrobenzeno (DNCB) 60  $\mu\text{M}$  como agentes oxidantes. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.14 y Figura 4.15.

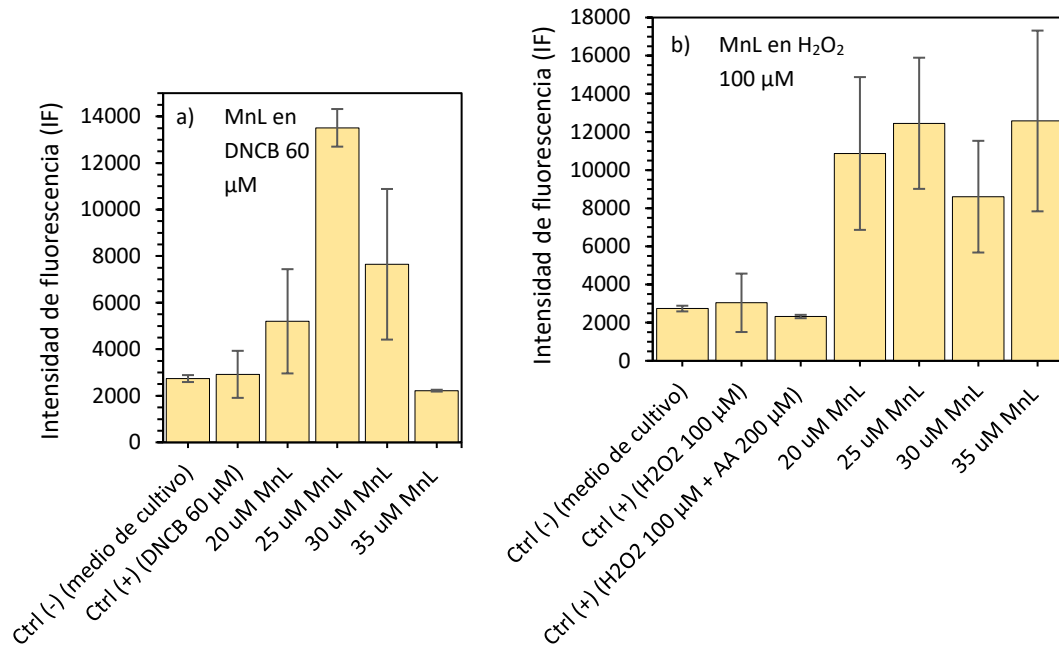
Los resultados obtenidos fueron en extremo irregulares, presentando una elevada variabilidad en la mayoría de las muestras evaluadas. Estos resultados han servido para determinar que el tiempo de incubación de las células con los agentes oxidantes fue excesivo (24 horas), dando como resultado mortalidad en el cultivo. Este efecto se observó en las intensidades de fluorescencia extremadamente bajas tanto en los controles como en las muestras coincubadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  o DNCB 60  $\mu\text{M}$ . La observación del cultivo por microscopía óptica una vez finalizado el ensayo confirmó la mortalidad celular producida por los agentes oxidantes.

Este error experimental impidió el correcto análisis de los datos, pues la falta de controles no permitió realizar un estudio comparativo entre la respuesta al ROS intracelular de las concentraciones de MnL contra la respuesta del cultivo incubado con los agentes oxidantes.



**Figura 4.14** Intensidad de fluorescencia medida en el cultivo coincubado por 24 horas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  y muestras de a) Film 1 (0,1% MnL), b) Film 2 (0,1% MnL) y c) Film 3 (0,1% MnL). Se incluye como control positivo de actividad antioxidante ácido ascórbico 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

No obstante, se obtuvieron medidas de intensidad de fluorescencia altas en las muestras coincubadas con MnL en ambos controles oxidantes (Figura 4.15). Aunque esto no permite precisar la actividad antioxidante del complejo en relación al ROS intracelular, los resultados son prometedores y están en consonancia con los obtenidos en este mismo trabajo sobre la determinación de la capacidad antioxidante del complejo en ambiente celular oxidativo (apartado 4.11).



**Figura 4.15** Intensidad de fluorescencia medida en el cultivo coincubado por 24 horas con distintas concentraciones de MnL (20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 35  $\mu$ M) en medio con a) DNCB 60  $\mu$ M y b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M. Se incluye como control positivo de actividad antioxidante ácido ascórbico 200  $\mu$ M (solo en b). Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Esta aparente actividad antioxidante del manganeso en relación al ROS intracelular fue evaluada por Chen *et al.*, quienes demostraron una disminución del 40% en los niveles de ROS intracelular, determinado por fluorescencia del DCF, de células neuronales de ratón incubadas con complejos de manganeso polinitrogenados durante 24 horas.<sup>54</sup>

Para finalizar y en vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que sería necesario continuar con la investigación sobre el efecto de estos complejos de manganeso como agentes antioxidantes frente al ROS intracelular. Ampliando este tipo de ensayos de actividad antioxidante y variando los distintos factores que puedan afectar a estos procesos (tiempo de exposición, concentración de estímulos, etc).

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir que es posible producir films a base de polímeros reticulados y con las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de biocompatibilidad celular adecuadas para una posible aplicación como apósitos para la absorción de exudados de heridas.

Se logró demostrar el efecto que distintos métodos de reticulación tienen sobre las propiedades mecánicas de los films sintetizados. Esto se vio reflejado en los resultados obtenidos a partir de los ensayos de caracterización, donde el índice de hinchamiento, resistencia, permeabilidad, flexibilidad y liberación variaron en función del tipo de reticulación y concentración de agente reticulante usado. De las tres muestras evaluadas, es el film 2 el que presenta los mejores resultados de caracterización, teniendo propiedades mecánicas similares a las buscadas en los apósitos destinados al tratamiento de heridas crónicas.

Además, se comprobó la total biocompatibilidad que polímeros como el alginato de sodio y la carboximetilcelulosa presentan sobre cultivos *in vitro* de queratinocitos humanos, al no indicar citotoxicidad celular en ninguno de los ensayos realizados. Por otro lado, la evaluación de la actividad antioxidante de los complejos de manganeso demostró su potencial como moléculas bioactivas con capacidad de contrarrestar los procesos oxidativos característicos de las heridas crónicas, pudiendo además obtener, unos rangos de concentración considerados como biocompatibles.

Atendiendo a estos resultados, se puede decir que se obtuvo de manera exitosa un prototipo de apósito superabsorbente, antioxidante y suplementado con complejo de manganeso para su posible aplicación en el tratamiento de las heridas crónicas exudativas. Cabe puntualizar, que al tratarse de un prototipo inicial es necesario continuar con el estudio de todas sus propiedades de interés, con el fin de obtener una formulación final que cumpla con los requerimientos que este tipo de apósitos deben tener para llegar a la fase final de un estudio preclínico.

Para finalizar, y en vista de los resultados preliminares, pero prometedores, que se han obtenido en este trabajo, cabe mencionar la necesidad de continuar con la investigación sobre las posibles aplicaciones que los biopolímeros y los complejos metálicos biomiméticos pueden tener en el área clínica como formulaciones para el tratamiento de las heridas crónicas exudativas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Boateng J, Catanzano O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. *J Pharm Sci.* 104(11):3653-80.
2. W. G. Meijer, J. Trip, S. M. H. J. J. Quality of life in patients with diabetic foot ulcers. *Disabil Rehabil.* 23(8):336-40.
3. Stoica AE, Chircov C, Grumezescu AM. Nanomaterials for Wound Dressings: An Up-to-Date Overview. *Molecules.* 25(11):2699.
4. Kim YE, Choi SW, Kim MK, Nguyen TL, Kim J. Therapeutic Hydrogel Patch to Treat Atopic Dermatitis by Regulating Oxidative Stress. *Nano Lett.* 22(5):2038-47.
5. Soleimanpour M, Mirhaji SS, Jafari S, Derakhshankhah H, Mamashli F, Nedaei H, et al.. Designing a new alginate-fibrinogen biomaterial composite hydrogel for wound healing. *Sci Rep.* 12(1):7213.
6. Summa M, Russo D, Penna I, Margaroli N, Bayer IS, Bandiera T, et al.. A biocompatible sodium alginate/povidone iodine film enhances wound healing. *Eur J Pharm Biopharm.* 122:17-24.
7. Hu Y, Hu S, Zhang S, Dong S, Hu J, Kang L, et al.. A double-layer hydrogel based on alginate-carboxymethyl cellulose and synthetic polymer as sustained drug delivery system. *Sci Rep.* 11(1):9142.
8. López Alayeto C, Alexandre Lozano S, Gimeno Pi I, Marquilles Bonet C, Bernis Domenech M. Prevalence of chronic wounds and dependency-related injuries in primary care in the province of Lleida in 2022. Vol. 34, *Gerokomos.*
9. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 453(7193):314-21.
10. Rezvanian M, Ahmad N, Mohd Amin MCI, Ng SF. Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications. *Int J Biol Macromol.* 97:131-40.
11. Laseca-Arranz A, Sánchez-Dengra B, Bermejo-Sanz M, González-Álvarez I, González-Álvarez M. Formulaciones para la cicatrización de heridas, presente y futuro Formulations for wound healing: present and future. *Rev Esp Cienc Farm.* 2(1):1-12.
12. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 4(9):560-82.
13. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 6(265).
14. Norahan MH, Pedroza-González SC, Sánchez-Salazar MG, Álvarez MM, Trujillo de Santiago G. Structural and biological engineering of 3D hydrogels for wound healing. *Bioact Mater.* 24:197-235.
15. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol.* 163(2):257-68.

16. Stoica AE, Chircov C, Grumezescu AM. Nanomaterials for Wound Dressings: An Up-to-Date Overview. *Molecules*. 25(11):2699.
17. Mogoşanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm*. 463(2):127-36.
18. Bombaldi de Souza RF, Bombaldi de Souza FC, Bierhalz ACK, Pires ALR, Moraes ÂM. Biopolymer-based films and membranes as wound dressings. En: *Biopolymer Membranes and Films*. Elsevier; p. 165-94.
19. Froelich A, Jakubowska E, Wojtyłko M, Jadach B, Gackowski M, Gadziński P, et al.. Alginate-Based Materials Loaded with Nanoparticles in Wound Healing. *Pharmaceutics*. 15(4):1142.
20. Zhang H, Cheng J, Ao Q. Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Mar Drugs*. 19(5):264.
21. Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett*. 32(1):195-8.
22. Rahman MdS, Hasan MdS, Nitai AS, Nam S, Karmakar AK, Ahsan MdS, et al.. Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers (Basel)*. 13(8):1345.
23. Mota L, Gimenez L. Cellulose-Based Materials Crosslinked with Epichlorohydrin: A Mini Review. *Rev Vir Quim*. 15(1):159-70.
24. Muharam S, Fitri A, Yuningsih LM, Putri YMTA, Rahmawati I. Synthesis and Characterization of Controlled-Release Urea Fertilizer from Superabsorbent Hydrogels. *Indones J Chem*. 20(3):616.
25. Alam MN, Islam MdS, Christopher LP. Sustainable Production of Cellulose-Based Hydrogels with Superb Absorbing Potential in Physiological Saline. *ACS Omega*. 4(5):9419-26.
26. Kanikireddy V, Varaprasad K, Jayaramudu T, Karthikeyan C, Sadiku R. Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review. *Int J Biol Macromol*. 164:963-75.
27. Rouco L, González-Noya AM, Pedrido R, Maneiro M. Pursuing the Elixir of Life: In Vivo Antioxidative Effects of Manganosalen Complexes. *Antioxidants*. 9(8):727.
28. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al.. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:1-13.
29. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem*. 44(2):532-53.
30. Rouco L, Maneiro M. Neuroprotective effects of metalosalen complexes against oxidative stress. *Neural Regen Res*. 16(1):121.
31. Rouco L, Liberato A, Fernández-Trujillo MJ, Máñez A, Basallote MG, Alvareño R, et al.. Salen-manganese complexes for controlling ROS damage: Neuroprotective effects, antioxidant activity and kinetic studies. *J Inorg Biochem*. 203:110918.

32. Cazón P, Vázquez M, Velazquez G. Cellulose-glycerol-polyvinyl alcohol composite films for food packaging: Evaluation of water adsorption, mechanical properties, light-barrier properties and transparency. *Carbohydr Polym.* 195:432-43.
33. Cazón P, Morales-Sanchez E, Velazquez G, Vázquez M. Measurement of the Water Vapor Permeability of Chitosan Films: A Laboratory Experiment on Food Packaging Materials. *J Chem Educ.* 99(6):2403-8.
34. Wexler A. Vapor pressure formulation for water in range 0 to 100 C. A revision. *J Res Natl Bur Stand A Phys Chem.* 80A(5 and 6):775.
35. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 3(7):1125-31.
36. Berridge M, Herst P, Tan A. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. En: *Biotechnol Annu Rev.* p. 127-52.
37. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2(2):329-33.
38. Barcia J. The Giemsa Stain: Its History and Applications. *Int J Surg Pathol.* 15(3):292-6.
39. Wang H, Joseph J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 27(5-6):612-6.
40. LeBel C, Ischiropoulos H, Bondy S. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 5(2):227-31.
41. Borbolla-Jiménez F V., Peña-Corona SI, Farah SJ, Jiménez-Valdés MT, Pineda-Pérez E, Romero-Montero A, et al.. Films for Wound Healing Fabricated Using a Solvent Casting Technique. *Pharmaceutics.* 15(7):1914.
42. Aadil KR, Jha H. Physico-chemical properties of lignin–alginate based films in the presence of different plasticizers. *Iran Polym J.* 25(8):661-70.
43. Merakchi A, Bettayeb S, Drouiche N, Adour L, Lounici H. Cross-linking and modification of sodium alginate biopolymer for dye removal in aqueous solution. *Polym Bull.* 76(7):3535-54.
44. Costa M, Marques A, Pastrana L, Teixeira J, Sillankorva S, Cerqueira M. Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. *Food Hydrocoll.* 81:442-8.
45. Benavides S, Villalobos-Carvajal R, Reyes J. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *J Food Eng.* 110(2):232-9.
46. Shi S, Zhu K, Chen X, Hu J, Zhang L. Cross-Linked Cellulose Membranes with Robust Mechanical Property, Self-Adaptive Breathability, and Excellent Biocompatibility. *ACS Sustain Chem Eng.* 7(24):19799-806.
47. Giz A, Berberoglu M, Bener S, Aydelik-Ayazoglu S, Bayraktar H, Alaca BE, et al.. A detailed

- investigation of the effect of calcium crosslinking and glycerol plasticizing on the physical properties of alginate films. *Int J Biol Macromol.* 148:49-55.
48. Costa P, Sousa Lobo J. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 13(2):123-33.
  49. Korsmeyer R, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas N. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm.* 15(1):25-35.
  50. Maver T, Mohan T, Gradišnik L, Finšgar M, Stana Kleinschek K, Maver U. Polysaccharide Thin Solid Films for Analgesic Drug Delivery and Growth of Human Skin Cells. *Front Chem.* 7(APR).
  51. Lee J, Khang G, Lee J, Lee H. Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *J Colloid Interface Sci.* 205(2):323-30.
  52. Machida-Sano I, Hirakawa M, Matsumoto H, Kamada M, Ogawa S, Satoh N, et al.. Surface characteristics determining the cell compatibility of ionically cross-linked alginate gels. *J Biomed Mater Res.* 9(2):025007.
  53. Sharma M, Dube A, Majumder SK. Antibacterial photodynamic activity of photosensitizer-embedded alginate-pectin-carboxymethyl cellulose composite biopolymer films. *Lasers Med Sci.* 36(4):763-72.
  54. Chen C, Cao J, Ma X, Wang X, Chen Q, Yan S, et al.. Neuroprotection by Polynitrogen Manganese Complexes: Regulation of Reactive Oxygen Species-Related Pathways. *Sci Rep.* 6(1):20853.
  55. Stelling MP, Soares MA, Cardoso SC, Motta JM, de Abreu JC, Antunes MJM, et al.. Manganese systemic distribution is modulated in vivo during tumor progression and affects tumor cell migration and invasion in vitro. *Sci Rep.* 11(1):15833.