

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPONJAS DE
ALGINATO CON *UNCARIA TOMENTOSA* COMO ADITIVO PARA SU
APLICACIÓN COMO APÓSITO DE HERIDAS**

Tesis para obtener el título profesional de Licenciado en Química

AUTOR:

Reynaldo Alonso Donayre Serpa

ASESOR:

Javier Nakamatsu Kuniyoshi

Lima, Mayo, 2022

RESUMEN

Las heridas en la piel son una problemática con efectos cada vez más perjudiciales para las personas que las padecen. Esta afirmación es principalmente cierta para las heridas crónicas —heridas que no terminan del curar completamente y muestran procesos de inflamación permanentes—. Esto exige el diseño de apósitos de heridas que muestren respuestas más completas, que no solo contemplen la protección contra la infección, sino otros factores como la absorción efectiva de exudado y la capacidad antioxidante.

En este trabajo se estudia el diseño de un apósito de heridas basado en una esponja de alginato que tenga incorporado los beneficios medicinales de un extracto de uña de gato. Como parte de este objetivo, se evalúan las mejores condiciones que permitan la obtención de una esponja con integridad, un buen volumen y una buena capacidad absorbente. Esta última característica fue medida mediante pruebas de hinchamiento a pH 5,5 y 7,5 (simulación de fluido de herida). También se estudia el procedimiento para la obtención del extracto de uña de gato, el cual se caracteriza en base a su contenido total de compuestos fenólicos —por medio de la prueba de Folin-Ciocalteu— y a su capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) por el método de ABTS.

Por último, se evalúa la capacidad antioxidante por medio de ABTS de la esponja cargada con el extracto, lo que resulta en un apósito que presenta una capacidad alta y prolongada, con un porcentaje de inhibición máximo de aproximadamente 27,5%. Este porcentaje si se compara con el 12,5% de inhibición presentado por la esponja sin extracto, evidencia que se ha podido incorporar las propiedades antioxidantes del extracto a la esponja de alginato.

El estudio tiene el valor agregado de trabajar con recursos naturales abundantes en nuestro país, lo que, con proyección a futuro, generaría un mayor impacto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, Georgina y Guillermo que a través de su esfuerzo me permitieron tener la educación y la carrera que tengo. Su apoyo y cariño constante me dieron la tranquilidad necesaria para centrarme en mi desarrollo profesional. A mis hermanos Renzo, Larissa y Jean Pierre por su compañía y apoyo incondicional.

A mi asesor Javier Nakamatsu, que desde que ingresé a su laboratorio, recién egresado de Estudios Generales, me aconsejó y ayudó a formarme como investigador, por medio de sus enseñanzas. Siempre estaré agradecido por la confianza que me brindó a lo largo de cada proyecto en el que participé, en especial para esta tesis de licenciatura.

A Suyeon Kim, por confiar en mí para este proyecto y por cada consejo y opinión que me brindó para su desarrollo.

A la profesora Betty Galarreta, por su apoyo e interés por aportar a la mejora de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio 211, en especial a Mariela, que me apoyó durante todo el proyecto e hizo el trabajo más ameno.

A mis amigos de promoción de la carrera, por los buenos tiempos vividos y sufrimiento compartido. En especial quiero agradecer a Aldo, Diego, Álvaro, Luis-Felipe y Marcos, por su amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), que a través del proyecto N°151-2017-FONDECYT, financiaron este trabajo.

No quiero dejar de agradecer a todos los trabajadores de la Sección Química, que a través de su labor nos permiten seguir trabajando e investigando. En especial quiero agradecer a

Milka, Nico, Gilmer y David, así como al centro de RMN, por su colaboración con mediciones, disponibilidad de reactivos, entre otros.



TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Heridas en piel y su curación	1
1.1.1. Definición de herida en piel	1
1.1.2. Proceso de curación de una herida	2
1.1.3. Apósitos para la curación de heridas: características ideales.....	3
1.2. Alginato	5
1.2.1. Introducción	5
1.2.2. Composición y estructura química	6
1.2.3. Propiedades.....	8
1.2.4. Caracterización.....	11
1.2.5. Las esponjas de alginato.....	12
1.3. Uña de gato.....	13
1.3.1. Introducción	13
1.3.2. Composición y estructura química	15
1.3.3. Propiedades.....	20
1.3.4. Caracterización del potencial antioxidante en muestras	22
1.3.4.1. Prueba del reactivo de Folin-Ciocalteu.....	22
1.3.4.2. Prueba de la capacidad antioxidante equivalente al trolox.....	23
2. OBJETIVOS	25
3. PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1. Reactivos, equipos y materiales.....	26
3.1.1. Reactivos.....	26
3.1.2. Equipos, materiales y software.....	27
3.2. Metodología.....	29
3.2.1. Caracterización del alginato	29
3.2.1.1. Análisis de la composición y estructura por RMN	29

3.2.1.2.	Análisis de la composición por FT-IR.....	30
3.2.1.3.	Determinación de la masa molar promedio de viscosidad.....	30
3.2.1.4.	Determinación de la distribución de masas molares por GPC.....	31
3.2.2.	Extracción de los compuestos de la uña de gato.....	31
3.2.3.	Caracterización del extracto de uña de gato.....	32
3.2.3.1.	Análisis por FT-IR.....	32
3.2.3.2.	Determinación del contenido total de fenoles.....	32
3.2.4.	Elaboración y caracterización de las esponjas de alginato.....	34
3.2.4.1.	Métodos para la elaboración de esponjas.....	34
3.2.4.2.	Caracterización de las esponjas.....	37
3.2.4.2.1.	Prueba de hinchamiento de las esponjas a pH 5,5.....	37
3.2.4.2.2.	Prueba de hinchamiento de las esponjas en simulación de un medio con herida.....	39
3.2.5.	Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox del extracto de UT y evaluación de la capacidad antioxidante de la esponja cargada con el extracto.....	40
3.2.5.1.	Preparación de la solución de ABTS y obtención de la curva de calibración de trolox.....	40
3.2.5.2.	Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) del extracto de UT....	41
3.2.5.3.	Adición del extracto de UT a la esponja de alginato.....	41
3.2.5.4.	Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de UT, la esponja de alginato y de la esponja cargada con UT.....	42
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1.1.	Caracterización del alginato.....	44
4.1.1.1.	Análisis de la composición y estructura por RMN.....	44
4.1.1.2.	Análisis de la composición por FT-IR.....	48
4.1.1.3.	Determinación de la masa molar promedio de viscosidad.....	50
4.1.1.4.	Determinación de la distribución de masas molares por GPC.....	53
4.1.2.	Extracción de los compuestos de uña de gato.....	56
4.1.3.	Caracterización del extracto de uña de gato.....	56
4.1.3.1.	Análisis por FT-IR.....	56
4.1.3.2.	Determinación del contenido total de fenoles.....	58
4.1.4.	Elaboración y caracterización de las esponjas de alginato.....	60
4.1.4.1.	Métodos para la elaboración de esponjas.....	60
4.1.4.2.	Caracterización de las esponjas.....	68
4.1.4.2.3.	Prueba de hinchamiento de las esponjas a pH 5,5.....	68

4.1.4.2.4.	Prueba de hinchamiento de las esponjas en simulación de un medio con herida	71
4.1.5.	Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) del extracto de UT y evaluación de la capacidad antioxidante de la esponja cargada con el extracto	73
4.1.5.1.	Obtención de la curva de calibración de trolox.....	73
4.1.5.2.	Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) del extracto de UT....	75
4.1.5.3.	Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de UT, la esponja de alginato y de la esponja cargada con UT.....	79
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	86
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	89
7.	ANEXOS	101



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal de la piel donde se observan las tres capas que la conforman: la hipodermis, la dermis y la epidermis. ²	1
Figura 2. Diagrama en el que se muestran las características ideales que se buscan en un apósito (<i>dressing</i>). Imagen modificada a partir de Murray, R <i>et al.</i> ¹²	4
Figura 3. Estructuras de los monómeros que conforman a los alginatos: el ácido L-gulurónico (G) y el ácido D-manurónico (M) en su forma de piranosa.	6
Figura 4. Diferentes secuencias presentes en los alginatos. (a) poli- β -1,4-D-ácido manurónico y (b) poli- α -1,4-L-ácido gulurónico y, (c) bloque MG (disposición alternada). ³²	7
Figura 5. Interacción entre cationes calcio y los tres distintos tipos de bloque: (a) dos segmentos poli-G, (b) dos segmentos poli-MG y (c) un bloque poli-G y un poli-MG. ⁴²	9
Figura 6. Modelo de la caja de huevos en el que los cationes divalentes (calcio en este caso) se encuentran en la cavidad formada por dos bloques poli-G de segmentos diferentes de cadena, unidos por fuerzas polares e iónicas. ⁴⁵	10
Figura 7. Planta de <i>Uncaria tomentosa</i> . A la izquierda, el pedúnculo característico por el que recibe el nombre de uña de gato y a la derecha, corte transversal del tallo. ⁶³	14
Figura 8. Unidades estructurales de las clases de compuestos en UT. Para los alcaloides en a) , b) y c) , el rectángulo rojo representa anillo oxindólico y el verde, uno indólico. ⁶⁰ En la figura d) si R1=H y R2=Me, se trata de un triterpenoide de tipo oleanano, mientras que si R1=Me y R2=H, uno de tipo ursano.	17
Figura 9. Clasificación de los polifenoles. Los flavonoides, a su vez, se dividen en diversas clases. .	18
Figura 10. Diagrama que resume la prueba de FC.....	23
Figura 11. Reacción redox del ABTS.	24
Figura 12. Resumen del procedimiento seguido para cada uno de los métodos.	36
Figura 13. Diagrama de la forma y volumen de los fragmentos de esponjas usados para la prueba antioxidante y la prueba de hinchamiento.....	38
Figura 14. Espectro de RMN en el que se aprecian, además de las señales correspondientes al alginato, las señales del estándar TMSP y del solvente, HOD.	44
Figura 15. Deconvolución de las señales obtenidas del espectro de RMN del alginato, en la región de 4,4-5,4 ppm. Para cada señal se ha asignado una etiqueta (ver tabla 2).	45

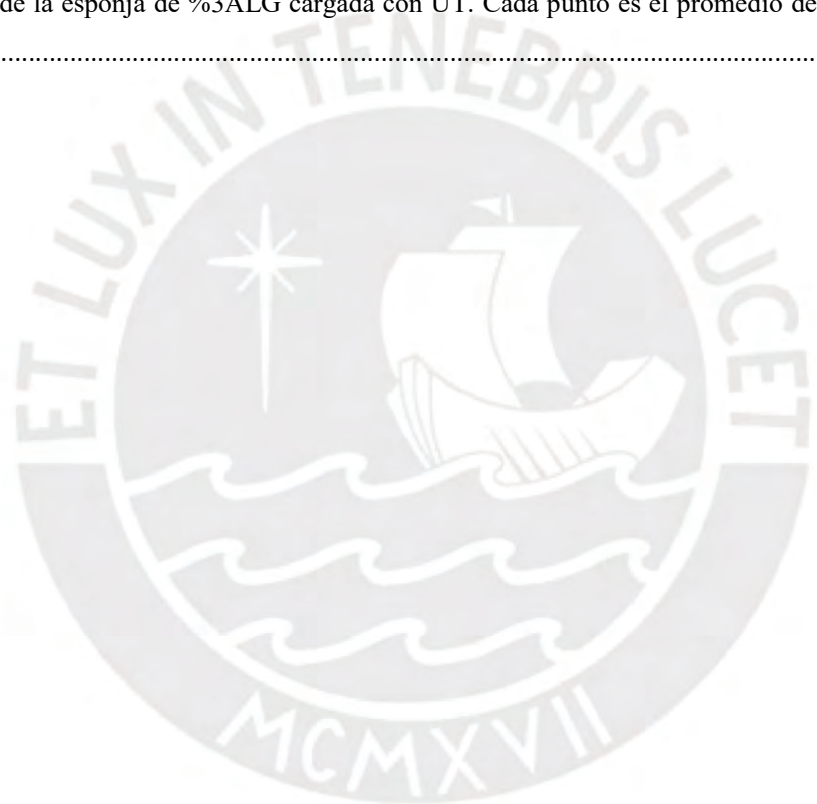
Figura 16. Espectro FT-IR de la muestra de alginato, obtenido por transmisión con pastilla de KBr.	48
Figura 17. Sección del espectro FT-IR de 1500 a 850 cm^{-1} en el que se identifican las señales usadas para la determinación del ratio M/G.	50
Figura 18. Viscosidad reducida y la viscosidad inherente de cada solución de alginato de sodio para el cálculo de la viscosidad intrínseca.	53
Figura 19. Cromatograma de la solución de alginato y los estándares de pululano. Sobre cada uno de los picos se muestra el volumen de retención respectivo. La intensidad de la señal no está a escala.	54
Figura 20. Curva de calibración elaborada a partir de los estándares de pululano. Se indican los valores de M_p así como el volumen de retención de cada estándar.	55
Figura 21. Cromatograma del alginato de sodio. En ella se señalan las M_w , M_n y M_p en la curva, así como sus valores en una tabla adjunta.	56
Figura 22. Espectro FT-IR del extracto de uña de gato (obtenido por transmisión con pastilla de KBr).	57
Figura 23. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación total de compuestos fenólicos por medio de FC. Medición por quintuplicado ($n=5$).	59
Figura 24. Esponja B liofilizada. Se presenta un acercamiento sobre un sector en el que se presenta el patrón de “planos” paralelos.	65
Figura 25. Curvas de porcentaje de hinchamiento de las esponjas obtenidas por el método A-D (mostradas en a) - d), respectivamente) en un medio de pH 5,5. Cada punto corresponde al promedio de 3 muestras ($n=3$).	69
Figura 26. Curva de porcentaje de hinchamiento de las esponjas obtenidas por el método C en el SWF de pH 7,5. En gris claro se muestran las curvas de las esponjas del método C, pero a pH 5,5. Cada punto corresponde al promedio de 3 muestras ($n=3$).	73
Figura 27. Curva de porcentaje de inhibición promedio (medición por triplicado, $n=3$) de los estándares de trolox en el tiempo.	74
Figura 28. Curva de calibración de trolox a los 30 min de medición. Cada punto representa el promedio de 3 soluciones independientes. Las barras de error representan la desviación estándar.	75
Figura 29. Curva de porcentaje de inhibición de las soluciones del extracto de UT en el tiempo.	76
Figura 30. Curvas de % inhibición de diferentes concentraciones de UT para los distintos tiempos de medición: a) 1 min, b) 5 min, c) 10 min, d) 15 min, e) 30 min, f) 45 min y g) 60 min. En h) se muestran dichas curvas superpuestas. Cada punto es el promedio de 3 mediciones ($n=3$).	77

Figura 31. Curva de porcentaje de inhibición de la esponja de alginato 3%ALG obtenida por el método C. Cada punto es el promedio de 3 mediciones (n=3) y se muestra la desviación estándar como barra de error..... 79

Figura 32. Curva de porcentaje de inhibición para UT. Cada punto es el promedio de 3 mediciones (n=3) y se muestra la desviación estándar como barra de error. 81

Figura 33. Curva de porcentaje de inhibición de la esponja 3%ALG obtenida por el método C, cargada con 125 μ L de una solución 3 mg/mL de UT. Cada punto es el promedio de 3 mediciones (n=3) y se muestra la desviación estándar como barra de error. 82

Figura 34. Superposición de las curvas de porcentaje de inhibición del extracto de UT, de la esponja de %3ALG y de la esponja de %3ALG cargada con UT. Cada punto es el promedio de 3 mediciones (n=3)..... 84



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos polifenólicos reportados en la UT. La lista de compuestos proviene de Navarro, 2015, ⁷⁶ salvo que se indique lo contrario.	19
Tabla 2. Tiempos registrados por viscosimetría capilar para 4 diferentes concentraciones de alginato de sodio Sigma-Aldrich y los valores de viscosidad determinados con ellos.	46
Tabla 3. Fracciones (proporciones) de monómeros, díadas y triadas; ratio M/G y longitudes promedio de los bloques G y M en la muestra de alginato, obtenidas a partir del espectro de RMN.	47
Tabla 4. Identificación de señales en el espectro de FT-IR del alginato. ^{99,100}	49
Tabla 5. Tiempos promedio (a partir de n=5) registrados por viscosimetría capilar para 4 diferentes concentraciones de alginato de sodio Sigma-Aldrich y los valores de viscosidad determinados con ellos.	52
Tabla 6. Valores de viscosidad intrínseca y cálculo de la masa molar por ecuación de Mark-Houwink-Sakurada.....	53
Tabla 7. Identificación de señales en el espectro de FT-IR del UT. ^{102,103}	58
Tabla 8. Contenido total de compuestos fenólicos en una solución de concentración 3 mg/mL del extracto de UT.....	59
Tabla 9. Imágenes de las esponjas elaboradas por medio de los métodos A-D en 3 etapas del proceso: antes del entrecruzamiento, después del entrecruzamiento y la esponja final (después del secado). Para el producto final se incluye una foto lateral de la esponja.	62
Tabla 10. Dimensiones promedio (n=6) y volumen aproximado de las esponjas de los métodos A y C. Los valores diámetro (d) y la altura (h) fueron medidos y el volumen (V) fue calculado a partir de éstos.	63
Tabla 11. Masas promedio y desviación estándar de las esponjas finales de los métodos A-D. Para cada método y concentración de alginato (1,5%ALG y 3%ALG) se midieron 6 muestras (n=6).	67
Tabla 12. Capacidad antioxidante en equivalente de trolox (TEAC) del extracto de UT para diferentes tiempos de medición.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ECM	Matriz extracelular (Extracellular Matrix)
ET	Transferencia de electrones (Electron Transfer)
FC	Folin-Ciocalteu
FT-IR	Infrarrojo-Transformada de Fourier (Fourier Transformation-Infrared)
G	Ácido gulurónico
GAE	Equivalentes de ácido gálico (Gallic Acid Equivalent)
GF	Factores de crecimiento (Growth Factor)
GPC	Cromatografía por Permeación en Gel (Gel Permeation Chromatography)
HAT	Transferencia de átomo de hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer)
HOD	Agua semideuterada
HPLC-MS	Espectrometría de masas acoplado a cromatografía líquida de alta eficacia (Mass Spectrometry-High Performance Liquid Chromatography)
M	Ácido manurónico
MWCO	Corte de peso molecular (Molecular Weight Cutoff)
PDI	Índice de polidispersión (Poly Dispersion Index)
PF	Polifenoles
POA	Alcaloides oxindólicos pentacíclicos (Pentacyclic Oxindole Alkaloids)
RMN	Resonancia magnética nuclear
SEM	Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy)
SWF	Fluido de herida simulado (Simulated Wound Fluid)
T.A.	Temperatura ambiente

TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TMSP	Ácido trimetilsililpropanoico (Trimethylsililpropanoic Acid)
TOA	Alcaloides oxindólicos tetracíclicos (Tetracyclic Oxindole Alkaloids)
UT	<i>Uncaria tomentosa</i> / Uña de gato
UV-Vis	Ultravioleta-visible



1. Marco teórico

1.1. Heridas en piel y su curación

La piel en los vertebrados es un órgano que forma parte del sistema integumentario.¹ En seres humanos, dicho órgano cumple diversas funciones entre las que destacan la función de protección —desempeña un rol como barrera tanto física, contra esfuerzos mecánicos y la radiación solar, cómo biológica, dónde es considerada como la primera línea de defensa inmunológica—, la función de homeostasis —lo que incluye la termorregulación y control de entrada y salida de agua— y las funciones sensoriales.^{2,3} Estructuralmente, la piel puede dividirse en tres capas, de más interna a más externa, hipodermis, dermis y epidermis,² ver figura 1.

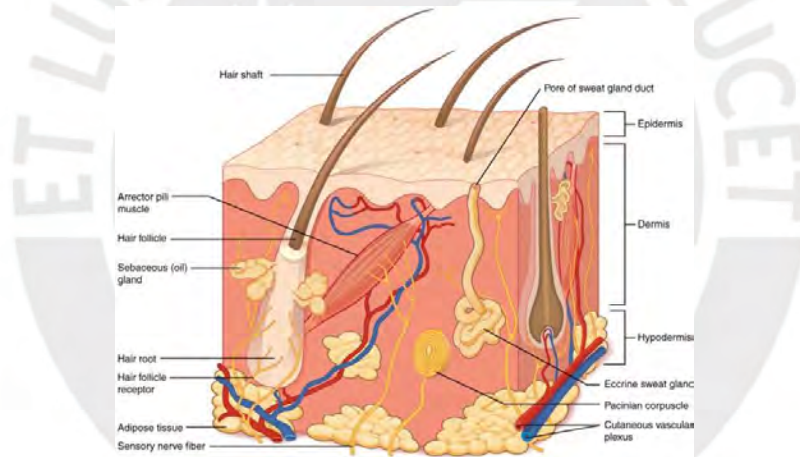


Figura 1. Corte transversal de la piel donde se observan las tres capas que la conforman: la hipodermis, la dermis y la epidermis.²

1.1.1. Definición de herida en piel

Una herida es definida como una irrupción en la estructura y función de algún tejido biológico, ocasionada por agentes patológicos de origen interno o externo.⁴ En el caso de la piel, la herida implica la ruptura de una o más de las capas recién nombradas y la consecuente perturbación de las funciones ejercidas por dicho órgano. Las heridas en piel pueden

clasificarse en agudas y crónicas. Las heridas agudas se caracterizan por tener periodos de curación delimitados (tienen un inicio y un fin); mientras que las heridas crónicas se caracterizan por un proceso de curación que se prolonga de manera indefinida.⁴ Para una clasificación más directa, se considera que las heridas agudas curan en un periodo de entre 8 a 12 semanas,⁵ mientras que las crónicas, no lo hacen antes de las 12 semanas.⁶

1.1.2. Proceso de curación de una herida

El proceso de curación de una herida consiste en cuatro etapas: hemostasis, inflamación, proliferación y remodelación. La hemostasis inicia apenas se produce la herida y su objetivo es frenar el sangrado por medio de procesos como la coagulación y vasoconstricción.⁷ El coágulo formado cumple un triple rol: funge de “tapón” para proporcionar un cierre temporal de la ruptura; actúa como un centro que propicia la quimioatracción de moléculas y células importantes para la reparación tisular (este último proceso ocurre por acción de agentes quimotácticos —factores de crecimiento (GF) y citoquinas— liberados por gránulos de las plaquetas durante la coagulación) y, por último, funge como andamiaje para la migración que ocurre durante la etapa inflamatoria.⁸

Durante la inflamación, el organismo busca facilitar procesos de migración, tanto de células como de moléculas necesarias para la curación. Para ello, se favorecen los procesos de permeabilización de los vasos sanguíneos, aumenta la producción de agentes quimotácticos y se activan las células que migran. Células como neutrófilos, macrófagos y linfocitos, y proteínas como los GF ven su movimiento y anclaje a diferentes regiones, facilitado por el coágulo ya descrito.⁸

La etapa de proliferación se caracteriza por la producción de los diversos componentes perdidos por la lesión, lo que incluye el desarrollo de procesos de reproducción celular —para recuperar fibroblastos, células epiteliales, entre otras—, la producción de componentes de matriz extracelular (ECM) y la generación de nuevos vasos sanguíneos por angiogénesis. El

proceso de curación culmina con la remodelación del tejido regenerado. En esta última etapa ocurren procesos de rearrreglo y entrecruzamiento de colágeno que incrementan la fortaleza del nuevo tejido sintetizado.⁷

1.1.3. Apósitos para la curación de heridas: características ideales

Si bien el proceso de curación está diseñado para que la reparación ocurra de la manera más rápida y eficiente posible, el uso de apósitos puede colaborar a acelerar el proceso o, en algunos casos, a alcanzar la recuperación de estructura y funciones que de otra manera no sería posible. De este modo, se puede realizar un perfil de las características ideales que se desea que todo apósito posea. Este perfil resulta de utilidad como modelo de referencia para evaluar las cualidades de un apósito en desarrollo, como es el caso de este trabajo. En general, se desea que un apósito:

- Posea buena resistencia mecánica frente a los esfuerzos de compresión, tensión y flexión, generados tanto por agentes externos como por el movimiento del usuario. No se requiere una resistencia excesiva, simplemente que ésta sea similar a la de la piel.
- Permita la adecuada difusión de gases (una adecuada ventilación) y de residuos metabólicos entre la herida y el exterior.^{9,10}
- Mantenga un ambiente con adecuada humedad,⁹ que evite que los fluidos producidos por la herida se acumulen. Una herida seca retarda el proceso de curación, al igual que una herida con gran cantidad de exudado sin remover (éste exudado contiene proteasas que en exceso pueden dañar tejido adyacente).¹⁰
- Otorgue una barrera que evite el ingreso de bacterias y otros microorganismos que puedan generar una infección.¹⁰ Si el apósito posee cierto grado de actividad antibacteriana, mejor aún.

- Sea biocompatible. Dado que el apósito está en contacto con tejido durante extensos periodos de tiempo, es importante que no genere efectos adversos ni respuesta inmunológica en el sistema biológico en el que está inmerso.¹⁰
- Posea bioactividad. Se desea que los apósitos no se limiten a ser artefactos que cubran las heridas —como los apósitos tradicionales—¹¹, sino que sean capaces de interactuar de forma activa en el proceso de curación por medio de, por ejemplo, su asociación a células, la participación en procesos de señalización y su incorporación a rutas metabólicas. Fruto de esta bioactividad, los apósitos pueden regular de forma positiva o negativa —esto es, promoviendo o frenando—, respuestas inflamatorias, la proliferación de células y la síntesis de otras moléculas,
- Sea rentable en términos de costo de producción.¹⁰ Si el fin ulterior del apósito es que tenga un impacto positivo en la salud de la mayor cantidad de personas, la materia prima de la que éste se elabora debe ser accesible (tanto en cantidad como en costo) y el proceso de producción debe ser viable económicamente.

En la figura 2 se muestra un diagrama que sintetiza la mayor parte de las características ideales previamente enlistadas.

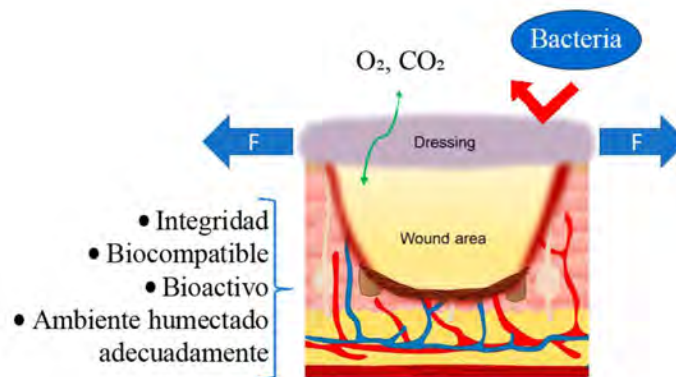


Figura 2. Diagrama en el que se muestran las características ideales que se buscan en un apósito (*dressing*). Imagen modificada a partir de Murray, R *et al.*¹²

Un apósito que tenga una elevada capacidad de absorción —por su carácter hidrofílico— sólo será deseable para heridas que tengan profuso exudado, mientras que, para heridas con tejido reseco, *e.g.* heridas con escaras, se presentan mejoras en el proceso de curación con hidrogeles (apósitos con contenido de agua y que tienen menor capacidad de absorción).¹³ Debe evitarse tanto exceso como falta de humedad, para una curación óptima.¹³ De manera similar, un apósito que sirva como matriz dentro de la cual se pueda sintetizar nuevo tejido, sólo será deseable si está hecho de un material biodegradable, de otra manera sería imposible retirar el apósito sin crear una ruptura en el tejido reparado.

1.2. Alginato

1.2.1. Introducción

El ácido algínico y sus sales, los alginatos, son una familia de polisacáridos lineales sintetizados por varias especies de algas pardas y bacterias.¹⁴ En dichas especies cumple un rol estructural y de protección. En las algas, los alginatos se presentan de manera natural en su forma de sales de calcio, magnesio y sodio, y forman parte de la pared celular¹⁵ aportando fuerza mecánica y flexibilidad a dicha estructura.¹⁴ En bacterias, el alginato —con la unidad manurónica acetilada—¹⁶ tiene como rol central la protección frente a agentes perjudiciales para la supervivencia del organismo.^{17,18}

El ácido algínico fue descubierto, extraído y patentado por primera vez por Edward Stanford en 1881.¹⁹ En la actualidad, la extracción se realiza principalmente a partir de algas, siendo las especies más usadas para este fin *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japónica*, *Ecklonia máxima*, *Lessonia nigrescens* y *Durvillaea antarctica*.¹⁴ La extracción de alginato es importante por su uso en procesos industriales —por ejemplo, en la producción de tintes—,²⁰ sus aplicaciones en el área de la medicina donde es usado para la elaboración de vectores para la entrega de fármacos

(*drug delivery*)^{21,22} y en la producción de apósitos para heridas.^{23–28} Sin embargo, su uso mayoritario es en la industria alimentaria, donde es utilizada como agente espesante.²⁹

La variedad de aplicaciones que se le ha dado a los alginatos muestra el potencial que presentan como recurso económico y de conocimiento científico. Por ello su estudio es de gran importancia, especialmente para el Perú, en cuyo mar habitan gran cantidad de especies de algas.

1.2.2. Composición y estructura química

El ácido algínico y los alginatos son polisacáridos lineales conformados por dos unidades monoméricas diferentes, el ácido L-gulurónico (G) y el ácido D-manurónico (M), que se unen por medio de enlaces glucosídicos 1-4¹⁵ y cuyas estructuras químicas se muestran en la figura 3. El G siempre se presenta en conformación 1C₄, mientras que la unidad M lo hace en 4C₁.³⁰

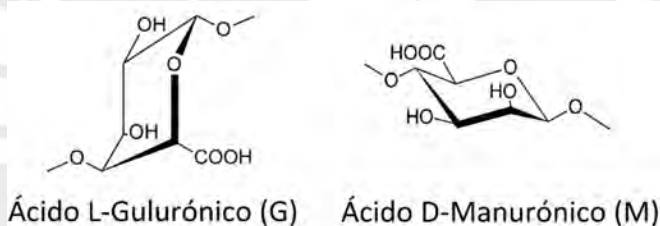


Figura 3. Estructuras de los monómeros que conforman a los alginatos: el ácido L-gulurónico (G) y el ácido D-manurónico (M) en su forma de piranosa.

En el ácido algínico, los monómeros presentan los grupos carboxílicos protonados, tal y como se muestran en la figura anterior; mientras que, en los alginatos, dichos monómeros han perdido el hidrógeno ácido de los grupos carboxílicos. La carga generada en esos casos se encuentra estabilizada por la interacción con diversos tipos de cationes polivalentes.

La estructura química de los alginatos es diversa debido a las diferentes secuencias de monómeros que se pueden presentar. En general se reconocen cuatro diferentes tipos de secuencia en estos polímeros: secuencias aleatorias M-G, bloques poli-G —un gran número de unidades G unidas de manera sucesiva—, bloques poli-M —similar a la situación del poli-G

pero con ácido manurónico— y los bloques MG, en los que las unidades se alternan.¹⁵ Los tres tipos de bloques tienen patrones repetitivos determinados que influyen en las propiedades del material como se verá en la siguiente sección. La predominancia de una secuencia sobre otra depende de factores como la especie de alga de la que proviene el alginato, la temporada de cosecha y la ubicación geográfica de la fuente.³¹ En la figura 4 se pueden observar las estructuras formadas por las disposiciones en bloque de un alginato.

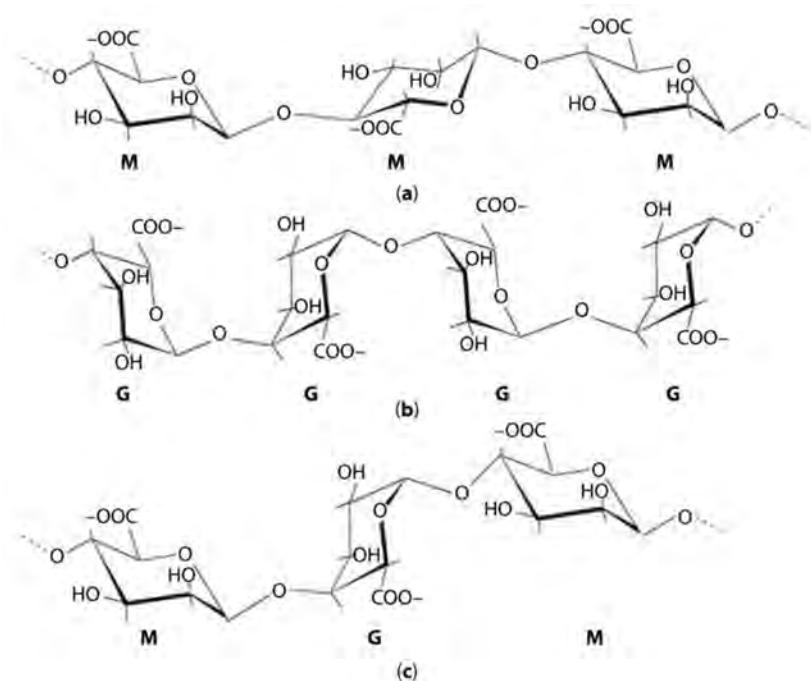


Figura 4. Diferentes secuencias presentes en los alginatos. (a) poli-β-1,4-D-ácido manurónico y (b) poli-α-1,4-L-ácido gulurónico y, (c) bloque MG (disposición alternada).³²

En la figura 4 se puede observar que los bloques poli-M, por ejemplo, se caracterizan por tener enlaces glucosídicos biecuatoriales, lo que le otorga una forma más extendida y plana a la cadena. En oposición, el bloque poli-G tiene enlaces glucosídicos biaxiales que generan una conformación más ondulada y rígida en la que aparecen cavidades cóncavas y convexas. Por su parte, los bloques MG con enlaces axial-ecuatorial y ecuatorial-axial son los menos

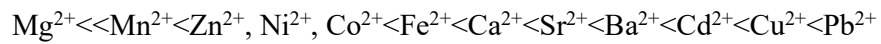
homogéneos y muestran una alta flexibilidad.¹⁴ De hecho, los bloques muestran una rigidez decreciente en el orden poli-G >poli-M> poli-MG.³³

1.2.3. Propiedades

Una de las propiedades más importantes de estos polímeros es su presencia como especie polianiónica en solución. La forma polianiónica no es observada en todas las situaciones, pues requiere que al menos los grupos carboxílicos de una de las unidades esté desprotonada. Sin embargo, en la práctica, debido a los bajos pKa de las unidades M y G —pKa de 3,38 y de 3,65 respectivamente—³⁴ la desprotonación se presenta en un gran rango de valores de pH. Así, en un medio con un pH mayor a 3,38, al menos la subunidad M está desprotonada y la muestra es un alginato en su forma polianiónica. Si dicha solución es acidificada hasta un pH por debajo del valor umbral, se observa la precipitación de cadenas de ácido algínico, de carácter poco soluble en agua y en solventes orgánicos.^{35,36}

El carácter polianiónico de los alginatos es uno de los dos factores que explica otra propiedad fundamental del polímero: su capacidad de gelación en presencia de ciertos cationes.³⁷ En estos casos, la gelación procede por un mecanismo de entrecruzamiento iónico en el que el ion metálico funge de unión entre dos monómeros de cadenas diferentes. El otro factor que explica la gelación mostrada por los alginatos es la estructura presentada por sus cadenas, que como ya se vio, depende de la secuencia de unidades en la cadena. La fuerza de unión de un determinado catión con el alginato depende de la distribución y proporción de los diferentes tipos de bloques (M, G y MG) y de propiedades como la carga y el tamaño de los iones. Por ejemplo, el Ca²⁺ muestra interacciones con bloques poli-G y poli-MG (figura 5) pero entre ellos, se une de manera más intensa a bloques poli-G; mientras que el Ba²⁺ se une principalmente a bloques poli-G y poli-M³⁸ y especies como el Al³⁺ y Fe³⁺, incluso, se unen a 3 segmentos poliméricos de manera simultánea.³⁹ A pesar de la dependencia de la fuerza de

unión con el tipo de secuencia, una serie útil que nos permite tener una aproximación de la fuerza de unión entre cationes y alginato es la siguiente:^{37,40}



Como se observa, el calcio muestra una unión bastante fuerte (parte media de la serie). Un modelo que permite entender el fenómeno de gelación y el rol que tienen tanto las especies catiónicas como las secuencias monoméricas es el modelo de la caja de huevos.⁴¹ En este modelo, el catión se encuentra ocupando las zonas cóncavas de dos bloques poli-G distintos, unido a dichas regiones por las interacciones electrostáticas de los grupos COO^- e hidroxilo de los G. La posición ocupada por el catión permite la unión o entrecruzamiento entre dos segmentos diferentes del polímero, lo que produce la gelación.

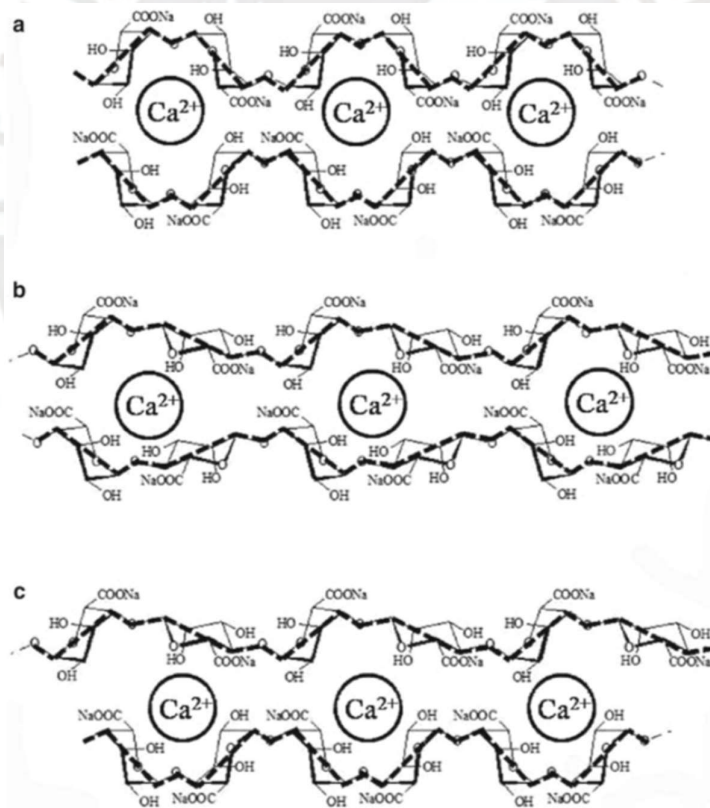


Figura 5. Interacción entre cationes calcio y los tres distintos tipos de bloque: (a) dos segmentos poli-G, (b) dos segmentos poli-MG y (c) un bloque poli-G y un poli-MG.⁴²

Otras propiedades importantes de los alginatos es que tienen gran capacidad para absorber agua (característica que se puede explicar por su carácter aniónico y polar) y el hecho de que produce soluciones viscosas con comportamiento no newtoniano (exactamente, se comporta como un pseudoplástico).⁴³ La viscosidad de las soluciones de alginato —y su rigidez por tanto— tiene una relación directamente proporcional con el peso molecular del polímero⁴⁴ y con su concentración, y puede ser aprovechada ampliamente en su uso como espesante de alimentos.²⁹

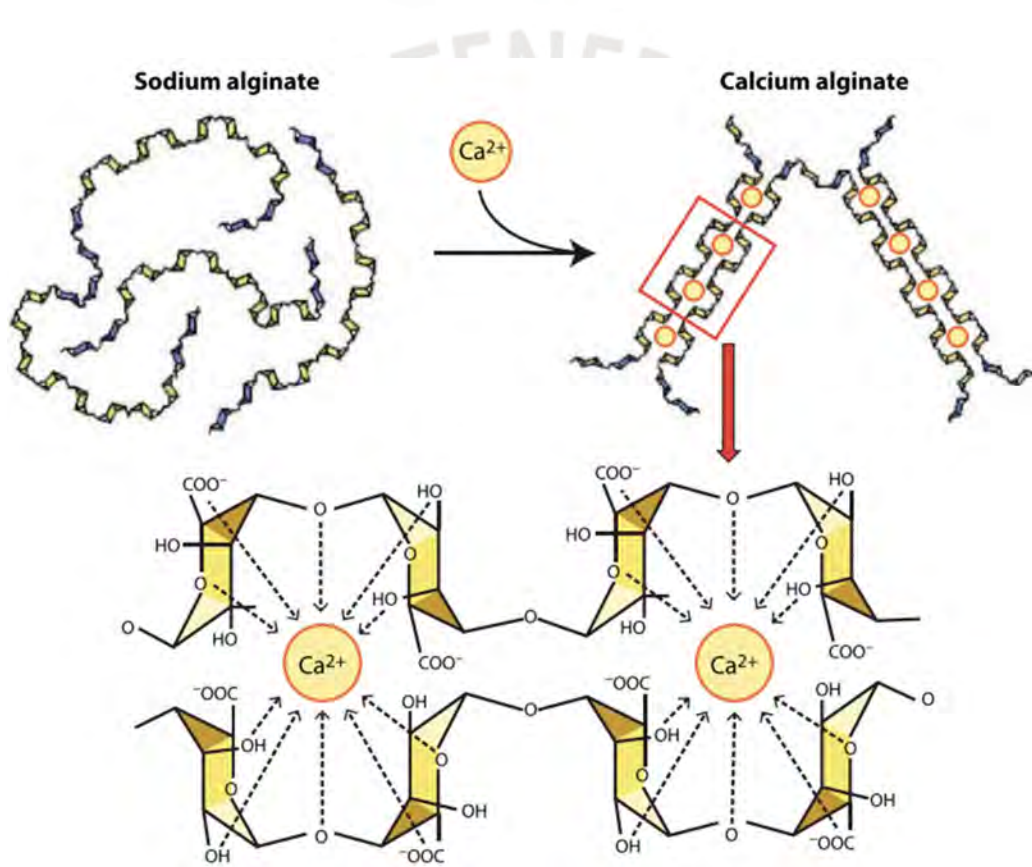


Figura 6. Modelo de la caja de huevos en el que los cationes divalentes (calcio en este caso) se encuentran en la cavidad formada por dos bloques poli-G de segmentos diferentes de cadena, unidos por fuerzas polares e iónicas.⁴⁵

Adicionalmente, es importante mencionar el comportamiento de los alginatos con los sistemas vivos: los materiales de alginato son degradables en el sentido en el que cadenas

enteras del polímero pueden separarse del material utilizado y ser excretadas vía renal, mientras dichas cadenas sean de un tamaño menor a 50 kDa.⁴⁶ Sin embargo, el organismo humano es incapaz de hidrolizar enlaces glucosídicos de los alginatos por la ausencia de enzimas adecuadas.⁴⁷ El carácter no biodegradable se soluciona si al alginato se le oxida con peryodato de potasio⁴⁸ o con peróxido de hidrógeno.⁴⁹

Además, los alginatos no son capaces de asociarse a las células debido a la ausencia de grupos funcionales que cumplan el rol de ligandos a receptores de membrana.⁵⁰ En diversos estudios, se han elaborado materiales de alginato con capacidad para asociarse a células por medio de la elaboración de materiales compuestos con biomoléculas que sí se asocian naturalmente a receptores de membrana —por ejemplo, alginato unido a gelatina vía reacción de base de Schiff—⁵¹ o por medio de la unión de pequeños péptidos reconocidos por receptores celulares⁵⁰.

1.2.4. Caracterización

Dado que las propiedades de los alginatos dependen principalmente de la composición, la secuencia de unidades M y G,¹⁴ y del peso molecular de la muestra, la caracterización de la muestra es fundamental para predecir su comportamiento y para el diseño de productos que exploten sus cualidades.

La determinación de la secuencia de unidades de cadena se suele realizar por resonancia magnética nuclear, RMN, técnica con la que, en base a las intensidades de señales de diadas y triadas de unidades M y G se puede determinar cantidades como el ratio M/G, entre otros valores.⁵² Otras técnicas menos convencionales para el análisis de composición de las cadenas de alginato son el uso de métodos espectroscópicos como el uso de espectroscopía infrarroja (FT-IR)⁵³ o Raman.⁵⁴

Para determinar la masa molar promedio del polímero se utiliza tanto la cromatografía por permeación en gel (GPC) como la viscosimetría capilar, ambas técnicas relativas. La GPC

permite determinar la distribución de masas molares en la muestra, así como valores promedio entre los que se incluyen la masa molar promedio en número (M_n) y la masa molar promedio en peso (M_w). En contraste, la viscosimetría capilar permite determinar la masa molar promedio de viscosidad (M_v), un valor obtenido a partir de mediciones realizadas con un viscosímetro y mediante el uso de diversas ecuaciones. Las masas molares promedio determinadas por GPC y viscosimetría no son comparables (M_v , M_n y M_w tienen fórmulas distintas), pero se espera que el valor de M_v se encuentre entre los valores de M_w y M_n .⁵⁵

Entre las ecuaciones que nos permite determinar la masa molar promedio de viscosidad se encuentra la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada.⁵⁵ Esta ecuación establece la relación entre la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y la masa molar promedio (M), considerando dos parámetros, K y α , de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (1)$$

Los dos parámetros son dependientes del sistema polímero-solvente, por lo que deben conocerse para la determinación de la masa molar por viscosimetría capilar.

1.2.5. Las esponjas de alginato

Las esponjas de alginato son uno de los tipos de membrana que se puede elaborar en base a dicho polímero. Son membranas tridimensionales (a diferencia de las películas o *films*) formadas por una red de poros interconectados en la que la razón de área superficial/volumen es elevada.⁵⁶ Este último factor asegura la elevada porosidad del material.

Las esponjas comparten muchas características con los hidrogeles, pues ambas son estructuras tridimensionales en las que el esqueleto polimérico está dispuesto de una forma tal que forma poros y canales. La diferencia principal entre hidrogeles y esponjas es que los primeros tienen un alto contenido de agua que engloba a la red polimérica. Esta diferencia queda en evidencia con el hecho de que se pueden elaborar esponjas por medio de la liofilización de hidrogeles.⁵⁶

Las aplicaciones para las que se emplean las esponjas de alginato son similares a los usos que se les da a los hidrogeles: son utilizados como andamiajes para la ingeniería de tejidos, como sistemas para el almacén y liberación de fármacos y moléculas⁵⁷ y como apósitos para heridas. Para ésta última aplicación, las esponjas podrían usarse para el tratamiento de heridas que generen profuso exudado, situación en la que los hidrogeles no son recomendables; pues, las esponjas de alginato tienen un alto poder absorbente. De acuerdo con la literatura, los apósitos secos de alginato (como la esponja) durante su uso re-gelifican por el contacto que tienen con fluidos. Esto significaría que, luego de ser aplicadas, las esponjas se comportarían de manera similar a hidrogeles.²³ La ventaja principal de las esponjas, estaría entonces en su facilidad de almacenamiento —es más fácil almacenar y movilizar un material seco que uno con humedad—.

La estructura porosa de las esponjas guarda cierta similitud con la forma y funciones que puede cumplir la ECM, especialmente durante el proceso de curación de heridas, pues es una matriz en la cual pueden penetrar células y sobre la que pueden migrar diferentes componentes celulares, compuestos necesarios para la reparación, así como desechos y nutrientes.⁵⁸ El anclaje de células sobre la red de alginato requeriría que este polímero sea modificado o mezclado con otro biopolímero (hay que recordar que el alginato no se asocia naturalmente con células).

1.3. Uña de gato

1.3.1. Introducción

La uña de gato, con nombre científico *Uncaria tomentosa* (UT), es una planta del genus *Uncaria* que pertenece a la familia Rubiaceae.⁵⁹ Es una de las 34 especies que conforman dicho genus, junto con especies como *U. rhynchophylla* y *U. attenuata*.⁶⁰ En lo que respecta a origen y distribución geográfica, la uña de gato es una planta oriunda del Perú que crece en la selva amazónica peruana y brasileña, así como en América central.⁶¹

Desde el punto de vista estructural, la uña de gato es una trepadora que recibe su nombre por unos pedúnculos curvados que salen de su tallo y que asemejan a ganchos.⁶⁰ Si bien se denomina uña de gato principalmente a la UT, éste nombre común ha sido tradicionalmente asociado también a la *Uncaria guianensis* y, tanto ésta como la UT, han sido utilizadas medicinalmente para el tratamiento de diversos problemas de salud.⁶² En cualquiera de los casos, la parte de la planta que se utiliza principalmente como elemento medicinal es el tallo leñoso. En la figura 7 se aprecia una imagen de la planta.

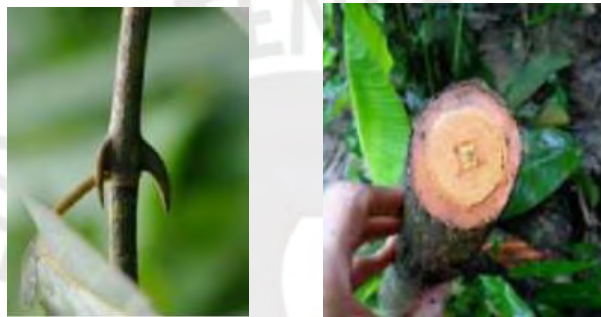


Figura 7. Planta de *Uncaria tomentosa*. A la izquierda, el pedúnculo característico por el que recibe el nombre de uña de gato y a la derecha, corte transversal del tallo.⁶³

En la actualidad, la UT se ha popularizado mundialmente como producto comercial debido a la atribución de numerosos beneficios en el tratamiento de muchas enfermedades y padecimientos. Desde 1997, en Estados Unidos se han comercializado más de 50 productos que contienen uña de gato para el tratamiento de males tan diversos como artritis, asma, cáncer, úlceras gástricas, hemorragias, entre otras.⁶⁴ En Europa y América se usa como remedio contra el cáncer.⁶⁵ En este contexto, resulta de mucha importancia estudiar los reales beneficios del uso medicinal de la uña de gato, pues hasta ahora no se conocen los mecanismos moleculares de acción^{66,67} y falta profundizar en la identidad de los compuestos terapéuticos.⁶⁴

De manera adicional, en el caso peruano, la UT tiene una importancia que trasciende el tema netamente medicinal o económico. En el Perú el uso de la uña de gato forma parte de

tradiciones de larga data para grupos étnicos como los Yanasha y los Asháninkas. En estas sociedades, el uso medicinal de las plantas está relacionado muchos casos a la cosmovisión y su estudio es llevado a cabo por individuos especializados.⁶⁸ Resultaría interesante estudiar los reales beneficios del uso de uña de gato para incluirlo en la problemática de salud intercultural.

1.3.2. Composición y estructura química

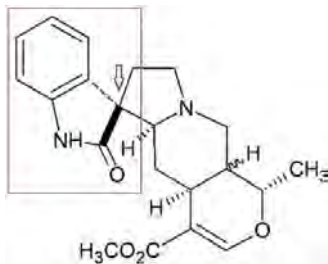
Dado que los extractos de UT contienen una mezcla compleja de múltiples compuestos con principios activos, resulta de mucha utilidad clasificarlos en un esfuerzo por separar sus contribuciones al efecto medicinal total. A grandes rasgos, se pueden identificar las siguientes clases de compuestos: alcaloides oxindólicos pentacíclicos (POA), alcaloides oxindólicos tetracíclicos (TOA), alcaloides indólicos, triterpenoides y polifenoles (PF). Para la identificación facilitada de los 5 grupos señalados, en la figura 8 se muestran las unidades estructurales características.

Los alcaloides oxindólicos son compuestos espiro que se caracterizan por tener un anillo oxindólico, similar al anillo indólico, pero con un carbonilo adyacente al nitrógeno de éste. En la UT, hay dos subgrupos de alcaloides oxindólicos: los alcaloides oxindólicos pentacíclicos (POA) y los tetracíclicos (TOA). En la figura 8 se pueden observar ejemplos de las estructuras de ambos subgrupos, así como el carbono del anillo espiro, señalado por la flecha en las figuras a) y b). Entre los POA reportados en la UT más importantes están la pteropodina (Uncarina C), la especiofilina (Uncarina D), la mitrafilina, la isomitrafalina, la isopteropodina (Uncarina E) y la Uncarina F;^{60,67,69,70} mientras que entre los TOA más característicos se pueden encontrar compuestos como la rinchofilina, isorinchofilina, entre otros.^{60,69,70}

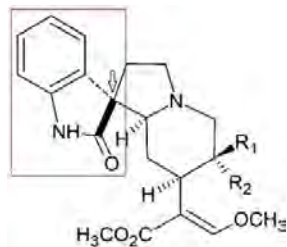
Los alcaloides indólicos tienen la misma unidad estructural base que los oxindólicos, pero sin el carbonilo ni el espirociclo. En la UT, se han reportado alcaloides indólicos tetracíclicos como por ejemplo la hirsuteina y la hirsutina, así como otros pentacíclicos, entre los que destaca la isoajmalicina.^{60,69} Otro conjunto de compuestos presente en la UT son los

triterpenoides, compuestos formados por 6 unidades de isopreno. En la UT se encuentran triterpenoides tipo ursano y tipo oleanano, que se caracterizan por su estructura de 5 anillos hexacíclicos fusionados, como se observa en la figura 8. Los triterpenoides en la UT son numerosos, pero entre los más destacados de tipo ursano encontramos al ácido ursólico —mostrado en la figura 8d, con R1=Me y R2=H— y al ácido quinóvico (ambos presentes también en sus formas glicosiladas y como ésteres);^{60,71} mientras que de tipo oleanano destacan el ácido oleanólico⁷¹ —mostrado en la figura 8d, pero para R1=H y R2=Me—, así como las tomentosidas A y B.⁷²

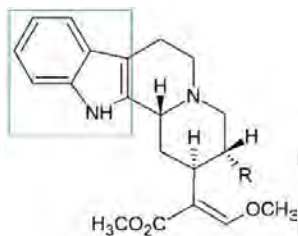
Los polifenoles (PF) son uno de los tipos de compuestos con mayor diversidad y abundancia en la UT, además de ser el foco de estudio de este trabajo por sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos se obtienen como parte de la ruta metabólica del ácido shikímico, que ocurre en bacterias y en plantas.⁷³ Los PF presentan en una gran variedad de estructuras, pero con una característica común: consisten básicamente en anillos aromáticos con grupos hidroxilo como sustituyentes.⁷⁴ Se pueden clasificar en 6 tipos como se aprecia en el diagrama de la figura 9, de elaboración propia en base a la literatura sobre PF.⁷³⁻⁷⁵



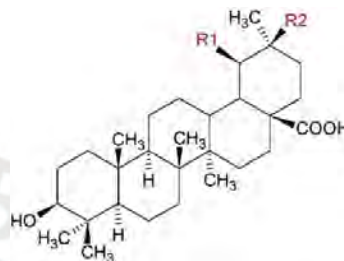
a) Alcaloides oxindólicos pentacíclicos



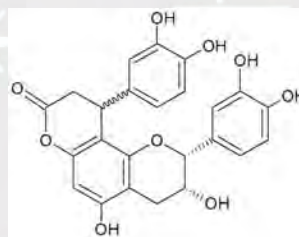
b) Alcaloides oxindólicos tetracíclicos



c) Alcaloides indólicos



d) Triterpenoides



e) Polifenoles. Se muestra como ejemplo un flavalignano

Figura 8. Unidades estructurales de las clases de compuestos en UT. Para los alcaloides en a), b) y c), el rectángulo rojo representa anillo oxindólico y el verde, uno indólico.⁶⁰ En la figura d) si R1=H y R2=Me, se trata de un triterpenoide de tipo oleanano, mientras que si R1=Me y R2=H, uno de tipo ursano.

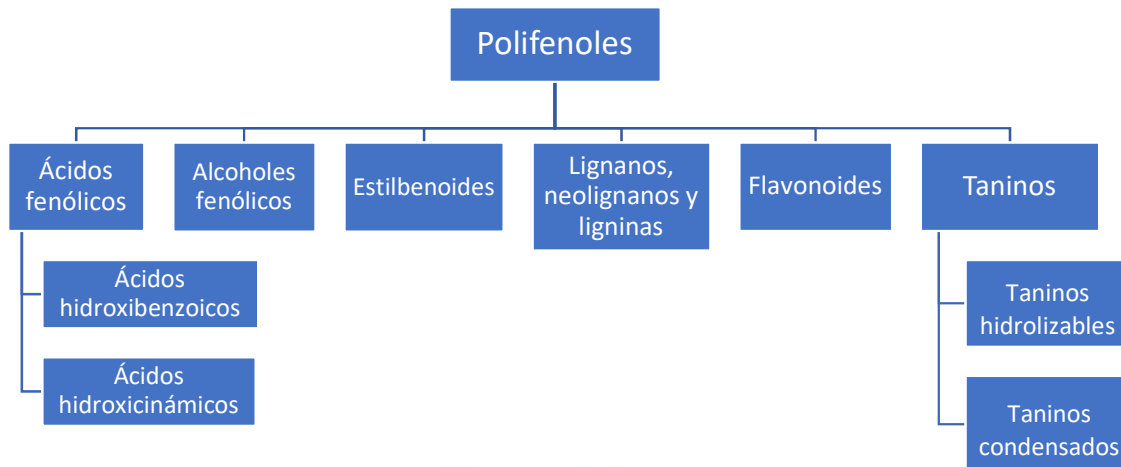
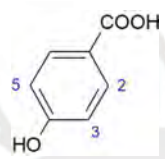
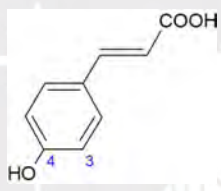
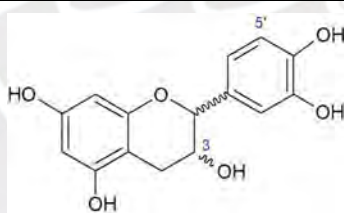
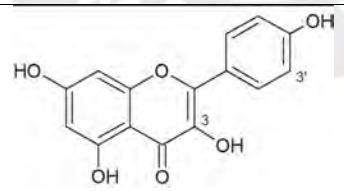


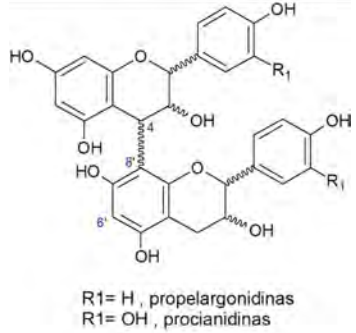
Figura 9. Clasificación de los polifenoles. Los flavonoides, a su vez, se dividen en diversas clases.

De todas las subclases presentadas en la figura 9, nos centraremos sólo en las que han sido principalmente reportadas en la UT: los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos, específicamente los condensados. Los ácidos fenólicos son la clase de polifenoles más simples, pues presentan un solo anillo aromático. En este grupo se encuentran tanto los ácidos hidroxibenzoicos —derivados hidroxilados del ácido benzoico—, como los ácidos hidroxicinámicos —metabólicamente provenientes de la L-fenilalanina—⁷³. Bajo el rubro de flavonoides se agrupa una gran diversidad de compuestos que se caracterizan por presentar un esqueleto de cromeno y un grupo fenilo enlazado en la posición C2 de éste (salvo para los isoflavonoides y neoflavonoides en cuyo caso se enlaza en el C3 y C4 respectivamente). Dependiendo de las variantes en el esqueleto de cromeno, los flavonoides reciben diferentes denominaciones. En la UT se han reportado dos tipos de flavonoides: los flavan-3-oles y flavonoles. Los taninos condensados son los PF de mayor tamaño en la UT. Estos se forman en base a la polimerización de dos o más unidades de flavan-3-ol y reciben también el nombre de proantocianidinas.⁷⁵ En la tabla 1 se presenta una lista detallada de los PF reportados en la

UT, además de la estructura general de éstos, donde se ha resaltado las posiciones de hidroxilación/metoxilación/glicosilación que da origen a los diferentes compuestos.

Tabla 1. Compuestos polifenólicos reportados en la UT. La lista de compuestos proviene de Navarro, 2015,⁷⁶ salvo que se indique lo contrario.

Polifenol	Estructura general	Compuesto
Ácidos fenólicos		
Ácido hidroxibenzoico		Ácido benzoico
		Ácido salicílico
		Ácido 4-hidroxibenzoico
		Ácido protocatéuico
		Ácido gálico
		Ácido vanílico
Ácido hidroxicinámico		Ácido p-cumárico
		Ácido cafeico
		Ácido ferúlico
		Ácido isoferúlico
Flavonoides		
Flavan-3-ol		Catequina
		Epicatequina
		Epigallocatequina (también el derivado galato) ⁶⁷
Flavonol		Quercetina (sólo un derivado) ⁶⁶
		Kaempferol (derivado glicosilado de nombre Trifolin) ⁶⁶
Taninos		
Proantocianidinas (dímeros)		Procianidina B1-B4
		Procianidina B5 y B7

	 <p>R1= H , propelargonidinas R1= OH , procianidinas</p>	Dímeros de propelargonidina
Proantocianidinas (trímeros)	Similar a la estructura de dímeros, pero con una unidad adicional.	Procianidina C1 Procianidina Trimer T2 Procianidina Trimer B
Otros PF		
Flavalignanos	Ver figura 8e) (ii)	Cinchonain Ia ⁶⁰ Cinchonain Ib ⁶⁰
Dilactonas	Ver figura 8e) (i)	Ácido elágico (derivado) ⁶⁶
<p><u>Notas:</u> En todas las estructuras se han enumerado los carbonos en los que ocurren las hidroxilaciones, metoxilaciones o glicolisaciones. Para las proantocianidinas, se han enumerado los carbonos por los que se puede dar la unión entre los monómeros flavan-3-ol (uniones 4-8' y 4-6').</p>		

1.3.3. Propiedades

Sin considerar todas las propiedades que son asignadas a la uña de gato, muchas investigaciones han reconocido como mínimo el carácter antiinflamatorio, inmunomodulador, citotóxico y antioxidante de muchos de los componentes de esta planta.

En un principio, se planteó la idea de que las propiedades curativas de la UT provenían de los alcaloides presentes en esta especie, a tal grado que la caracterización que se hacía sobre el producto comercial se basaba exclusivamente la identificación y cuantificación de este tipo de compuestos;⁶⁷ sin embargo, en la actualidad se contempla el rol que aportan los diferentes tipos de compuestos en la UT e, incluso, la importancia de la sinergia ocasionada por la interacción de los mismos.⁷⁷

Por la complejidad de la composición de la uña de gato, muchas veces resulta complicado establecer el rol individual que cumplen cada uno de los distintos tipos de moléculas. Muchos estudios, por ello —y también por el valor que se les asigna ahora a las relaciones sinérgicas—

, se centran en estudiar el efecto de diferentes extractos de UT como un todo. Así, existen estudios que han mostrado el rol citotóxico de extractos acuosos de UT: su uso muestra inhibición del crecimiento de líneas celulares de leucemia y promoción de apoptosis.⁷⁸ Otro estudio comparó el potencial antiinflamatorio de un extracto en mezcla de agua:etanol 1:4 con uno acuoso mediante el efecto que tenía su aplicación sobre un modelo de edema de ratón y determinó la mejor respuesta generada por la mezcla de etanol-agua.⁷⁹

Aun así, muchos estudios logran identificar los compuestos responsables de una determinada respuesta. Por ejemplo, se sabe que la gran capacidad antioxidante mostrada por la uña de gato proviene de la presencia de diterpenos y compuestos polifenólicos como los flavonoides, taninos y compuestos fenólicos⁸⁰ y que, incluso, dicha propiedad no guarda relación con el contenido de alcaloides.⁶⁷ Por esta razón, numerosos estudios se centran en evaluar precisamente la capacidad antioxidante de extractos de UT ricos en polifenoles.⁸¹ Sin embargo, la capacidad antioxidante no es la única propiedad asociada a los polifenoles, también se ha podido determinar que las flavalignanos como la cinchonain Ia y la cinchonain Ib, así como procianidinas como la (-)-epicatequina, muestran tanto capacidad antiinflamatoria como antiviral.⁶⁰

Los estudios que se centran en analizar el rol de tanto TOA como POA muestran que estos dos tipos de compuestos poseen propiedades inmunomoduladoras, pero con acciones que son antagónicas. Así, mientras los compuestos POA muestran propiedades inmunoestimulantes al promover procesos como la fagocitosis, hay evidencias que señalan que los TOA inhiben dichos procesos.⁶⁴ La razón por la que, a pesar de tener propiedades antagónicas, la UT puede usarse medicinalmente se explicaría por la presencia de quimiotipos dentro de la especie: el número de quimiotipos no está completamente definido, pero se coincide en la existencia de por lo menos uno en el que predominan los POA y otro en el que predomina la cantidad de TOA.^{69,70}

Sobre los triterpenoides en UT, los glucósidos de ácido quinóico han sido los compuestos más estudiados. Se han realizado estudios que dan indicios del potencial antiinflamatorio⁷¹ y antiviral⁸² de dichos compuestos. Asimismo, otro estudio se centra en evaluar su rol como inductor de apoptosis en células cancerígenas.⁸³ En el caso de los alcaloides indólicos, hay pocos estudios que evalúen los efectos farmacológicos de éstos para el caso de la UT. Sin embargo, hay algunos estudios sobre hirsutina proveniente de *Uncaria rhynchophylla* que muestran los beneficios de dicho compuesto para condiciones relacionadas al aspecto cardiovascular (vasodilatación, protección de cardiomiocitos).^{84,85}

1.3.4. Caracterización del potencial antioxidante en muestras

Como ya se señaló, entre todos los compuestos presentes en la UT, los polifenoles se destacan por su rol antioxidante. Las pruebas empleadas para medición de la capacidad antioxidante en muestras se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su naturaleza química: las pruebas basadas en reacciones de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) y las pruebas basadas en transferencia de electrones (ET). El principio de medición empleado para las reacciones de ET consiste en exponer la muestra antioxidante a un agente cuya reducción genere un cambio perceptible.⁸⁶ En este trabajo se utilizan dos pruebas de reacción tipo ET para determinar la capacidad antioxidante: la determinación del contenido de fenoles totales por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu (FC)^{86,87} y la determinación de capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC por sus siglas en inglés) por medio de ABTS (existen otras pruebas similares que usan reactivos diferentes, por ejemplo, la prueba con DPPH).⁸⁶

1.3.4.1. Prueba del reactivo de Folin-Ciocalteu

El método de FC es un método colorimétrico que se utiliza como prueba estándar para la cuantificación total de compuestos fenólicos mediante el uso de un reactivo denominado reactivo de FC. Este reactivo es una mezcla compleja en medio ácido, cuya composición química exacta no ha sido determinada, pero se cree que presenta heteropolifosforungstato-

molibdatos como principal componente. La idea más aceptada es que es el molibdeno participa directamente en la reacción redox, al aceptar el electrón del agente antioxidante.⁸⁶ La reducción del reactivo de FC frente a compuestos fenólicos ocurre a un pH básico (aproximadamente pH 10),^{86,87} puesto que en este entorno, el fenol se desprotona para formar iones fenolato que son los que posteriormente transfieren su electrón al molibdeno. Es por ello que durante la prueba se adiciona carbonato de sodio. Producto de la ET, el reactivo de FC cambia de un color amarillo a un color azul, que es medido por espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 765 nm.⁸⁷

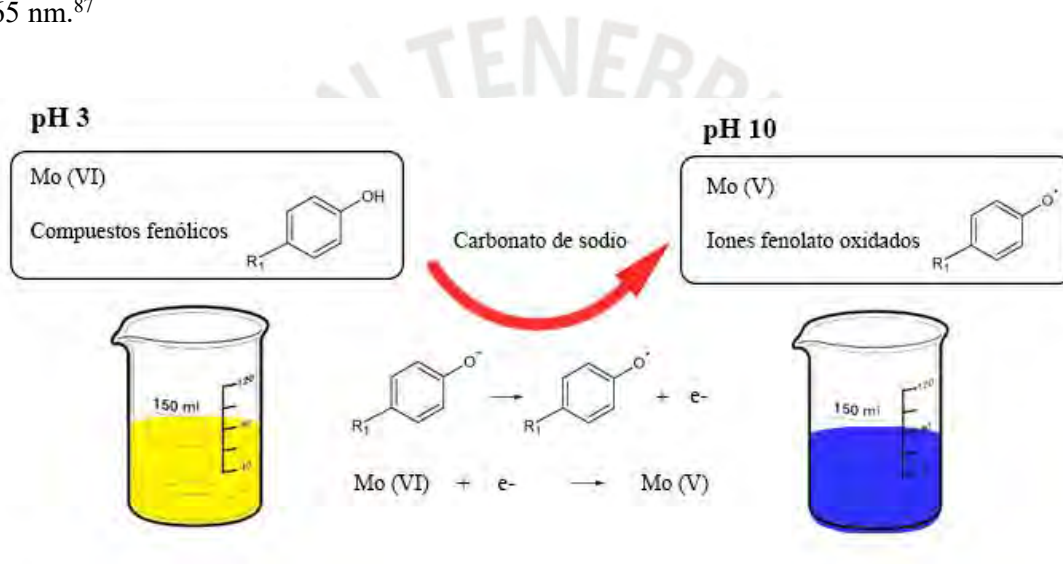


Figura 10. Diagrama que resume la prueba de FC.

Aunque este método se usa para cuantificar la cantidad total de compuestos fenólicos, se debe señalar que en realidad no es específico para este tipo de compuestos, pues reacciona con otras especies que muestran poder reductor como, por ejemplo, el ácido ascórbico y los azúcares reductores.⁸⁷

1.3.4.2. Prueba de la capacidad antioxidante equivalente al trolox

La medición de la TEAC utiliza como reactivo principal al 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) o ABTS, cuya estructura se muestra en la figura 11. El ABTS posee la propiedad de cambiar de color entre su estado reducido y oxidado (imagen

superior e inferior en la figura 11, respectivamente). Cuando la molécula se oxida, presenta un color verde-azul (734 nm).⁸⁸

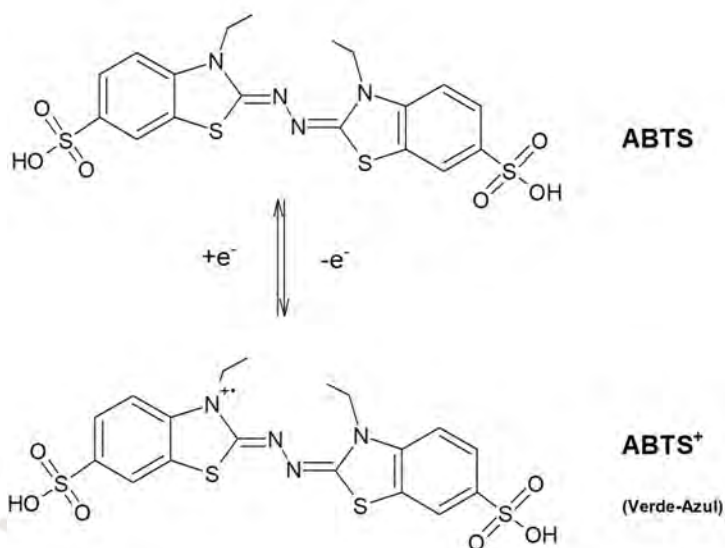


Figura 11. Reacción redox del ABTS.

La prueba consiste en evaluar el potencial antioxidante de una determinada muestra observando cuántas moléculas de ABTS⁺ son reducidas en un lapso de tiempo. Una muestra con alto poder antioxidante muestra una predisposición a oxidarse y a reducir al ABTS⁺. Este proceso se ve expresado en el cambio de coloración de la solución de ABTS. Dicho cambio es medido por espectroscopía UV-Vis, registrando la absorbancia del sistema a 734 nm.⁸⁸ El valor obtenido al determinar la TEAC es expresado en referencia a la capacidad antioxidante mostrada por el estándar usado en la prueba, el trolox (por ello el término “equivalente al trolox”).

2. Objetivos

El objetivo general de este estudio fue lograr el desarrollo de un apósito para heridas con una esponja de alginato como base, en el que se lograra incorporar las cualidades antioxidantes de extractos de uña de gato.

Objetivos específicos:

- Determinar el procedimiento que permita obtener una esponja de alginato con capacidad de hinchamiento y características óptimas para su uso como apósito.
- Obtener el extracto de uña de gato (UT) a partir de una muestra comercial de la corteza.
- Determinar la cantidad total de fenoles del extracto de UT obtenido.
- Estudiar la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) del extracto de UT obtenido.
- Estudiar la capacidad antioxidante la esponja de alginato cargada con el extracto de UT y de los componentes que la conforman (esponja de alginato y extracto de UT por separado).

3. Parte experimental

3.1. Reactivos, equipos y materiales

3.1.1. Reactivos

- Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) sal de diamonio, reactivo para HPLC ($\geq 98\%$). Marca Sigma-Aldrich.
- Ácido algínico, sal de sodio con viscosidad en el rango de 200 – 400 cps. Lote #: 05008JA. Marca Sigma-Aldrich.
- Ácido clorhídrico. Reactivo Baker® ACS. Marca J.T. Baker.
- Ácido gálico. Marca Riedel-de-Häen.
- Agua deuterada, MagniSolv™, con grado de deuteración de 99,9%. Marca Merck.
- Agua ultrapura, obtenida por sistema de ósmosis inversa. Equipo Barnstead™ Nanopure™ de la marca Thermo Fischer Scientific. Resistividad del sistema: 18,2 MΩ-cm.
- Albúmina de suero de bovino, polvo liofilizado ($\geq 96\%$). Lote #SLBQ6589V. Marca Sigma-Aldrich.
- Alcohol etílico absoluto, 'Reactivo Baker'® ACS. Marca J.T. Baker.
- Bromuro de potasio. Reactivo Baker Instra-Analyzed™. Marca J.T. Baker.
- Carbonato de sodio. Marca
- Cloruro de calcio anhidro. Marca Merck.
- Cloruro de sodio, 'Baker Analyzed'® ACS, grado analítico. Marca J.T. Baker.
- Corteza de uña de gato. Marca Naturandes.
- Diclorometano, LiChrosolv®, grado para cromatografía de gases. Marca Merck.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sal disódica. Marca Merck.

- Estándares de Pululano para GPC, Standards Kit. Estándares de: 6 kDa PDI:1,05, 50 kDa PDI:1,07, 110 kDa PDI: 1,13, 200 kDa PDI: 1,09 y 400 kDa PDI: 1,12. Marca PSS (Polymer Standards Service GmbH).
- Hidróxido de sodio en perlas. AR® (ACS). Marca Macron.
- Nitrógeno líquido.
- Persulfato de potasio de 99,99% de pureza. Marca Sigma-Aldrich.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu, concentración 2 N. Marca Sigma-Aldrich.
- Soluciones tampón para calibración de medidor de pH: Solución buffer de ftalato de potasio pH 4,01 a 25 °C Orion™, marca ThermoFisher Scientific. Solución buffer de fosfato pH 6,97 a 25 °C 'Reactivo Baker'®, marca J.T. Baker. Solución buffer de tetraborato disódico pH 9,22 a 20 °C Certipur®, marca Merck.
- Sulfato de sodio anhidro. Marca Merck.
- TMSP. Marca.
- Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). Marca Merck.

3.1.2. Equipos, materiales y software

- Agitador-calentador Heidolph modelo MR Hei-Tec.
- Balanza analítica Sartorius BL 210 S, de capacidad máxima 210 g e incertidumbre 0.1 mg.
- Baño de ultrasonido. Marca VWR, modelo 97043-760. Frecuencia de operación: 35 kHz.
- Baño termostato con agitador acoplado. Marca Memmert. Modelo de baño termostato: WNE-14. Modelo de agitador: SV-14 / 22.
- Bomba de vacío Vacuubrand tipo MZ 2C. Marca Merck.
- Celdas de UV de cuarzo y de poliestireno.
- Centrifuga. Marca LW Scientific. Modelo C5. Rotación máxima: 4000 rpm.

- Columna de GPC para polímeros aniónicos, Viscotek CLM302, grado A6000M, Aq GPC/SEC Col. Tamaño de partícula 13 μm , número de platos teóricos <12 000, tamaño máximo de poro 15000 Å.
- Cromatógrafo por permeación en gel Viscotek. El sistema está conformado por un degasificador modelo VE 7510, un sistema de entrega de solvente VE 1122, un detector RI modelo VE 3580.
- Escurridor de vegetales manual.
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance III HD 500 MHz.
- Espectrómetro infrarrojo Perkin-Elmer con transformada de Fourier, modelo Frontier.
- Espectrofotómetro UV/Vis ThermoFisher Scientific, modelo Genesys 50.
- Filtro de jeringa Millex[®], poro de tamaño 0,45 μm . Material: Membrana de Nylon. Marca Merck.
- Filtro de membrana de éster de celulosa tipo GSWP, de tamaño de poro 0,22 μm . Marca Merck.
- Liofilizador Yamato Scientific Co., LTD modelo DC401.
- Medidor de pH marca Crison, modelo pH Basic 20. Resolución de 0,01 pH, 1 mV y 0,1 °C. Escalas: -2 a 16 pH, ± 2000 mV y -20 a 50 °C.
- Membranas de diálisis, Standard RC Tubing. Se usó membrana Spectra/Por 1 de MWCO 6-8 kD y membrana Spectra/Por 4 de MCWO 12-14 kD y de relación volumen/longitud de 6,4 mL/cm. Marca Spectrum Laboratories Inc.
- Paños para tareas delicadas Kimwipe[®]. Marca Kimberly-Clark.
- Prensa hidráulica manual para pastillas de KBr. Marca Specac.
- Rotavaporador Heidolph modelo Laborota 4000, con temperatura hasta 95 °C y velocidad de rotación de hasta 270 rpm.

- Termostato de inmersión (para la viscosimetría): Marca Julabo, modelo MP.
- TopSpin. Software diseñado por Bruker para la adquisición y procesamiento de espectros de RMN. Versión 4.0.8.
- Viscosímetro Ubbelohde Technical Glass Products Inc. 1C (K=0,02871).

3.2. Metodología

En esta sección se trabajó con soluciones acuosas de alginato de sodio. Todas estas soluciones fueron sometidas calentamiento a aproximadamente 55°C por una hora y a agitación, a temperatura ambiente, por 24 horas para asegurar la disolución completa del polímero. Además, siempre que se trabajó con agua, fue con agua ultrapura, salvo que se indique lo contrario.

3.2.1. Caracterización del alginato

3.2.1.1. Análisis de la composición y estructura por RMN

De acuerdo a la norma ASTM F 2259 – 10,⁵² se preparó 100 mL de una solución de concentración 0,1% (w/v) de alginato de sodio en agua. Mediante el uso de un medidor de pH y de soluciones acuosas de HCl (de concentraciones 1 M y 0,1 M), se llevó a la solución polimérica a un valor de pH de 5,6 y se dejó calentar la solución en un baño de silicona a 100°C por 1 hora. Este proceso permite la hidrólisis ácida del polímero con el objetivo de disminuir el tamaño de las cadenas. Luego de transcurrida la hora, se agregó una cantidad adicional de la solución ácida hasta que se alcanzó un pH 3,8. Se reanudó la hidrólisis ácida por calentamiento por media hora. Culminado el proceso de hidrólisis y se neutralizó la solución de alginato por medio de soluciones acuosas de NaOH (de concentraciones 1 M y 0,1 M) y se liofilizó. Se disolvió el sólido obtenido en agua deuterada y se repitió el proceso de liofilización.

Para la introducción de la muestra en el equipo de RMN, se disolvieron 12 mg del alginato liofilizado en 1 mL de D₂O. De esa solución, se vertieron 0,7 mL en el tubo de RMN. La adquisición de la data se realizó a una temperatura de 80°C, con la muestra girando a una

frecuencia de 20 Hz. En lo que refiere al programa de pulsos, se siguió un programa zg con tiempo de relajación de 2 s, pulso de 90° y tiempo de adquisición de 4,096 s. Se realizaron 64 escaneos con los que se obtuvieron 65536 puntos de medición. El procesamiento se realizó por medio del software TopSpin.

3.2.1.2. *Análisis de la composición por FT-IR*

La determinación del ratio M/G de una muestra de alginato por espectroscopia de infrarrojo es una buena opción de no ser posible un análisis por RMN. En este análisis se empleó el método propuesto por Filippov y Kohn, en el que se utiliza la técnica de pastilla de bromuro de potasio.⁵³ Según el método, se realiza una curva de calibración que relacione un ratio de absorbancia A_x/A_y del espectro de una muestra de alginato de potasio —donde x e y son dos números de onda diferentes—, en función de su composición porcentual de M y G. En el estudio referenciado, se observó que se lograba un menor error de predicción para A_{1320}/A_{1290} . La relación A_{1125}/A_{1030} también presentó una buena predicción en dicho estudio.

Para este análisis, se preparó una solución de 1 mg alginato de sodio y 200 mg de KBr en agua. Esta solución fue liofilizada y se tomó una parte del sólido para formar pastillas de 7 mm de diámetro. Se obtuvieron los espectros de FT-IR por transmisión con resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos. Ante la dificultad de conseguir estándares de alginato para la elaboración de las curvas de calibración, se decidió utilizar las reportadas por Filippov y Kohn,⁵³ para una determinación aproximada del ratio M/G, a partir de los espectros de absorbancia obtenidos en este estudio.

3.2.1.3. *Determinación de la masa molar promedio de viscosidad*

Para la aplicación de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada en la determinación de la masa molar de alginato por viscosimetría capilar, es necesario conocer el valor de los parámetros K y α .⁵⁵ Se prepararon 25 mL de una solución de alginato de sodio de concentración 2,1 mg/mL con $\text{NaCl}_{(\text{ac})}$ 0,1 M como solvente, considerando que Martinsen *et*

al. reportaron valores de $K = 0,073$ y $\alpha = 0,92$ para dicho sistema de polímero-solvente.⁸⁹ El viscosímetro utilizado fue un Ubbelohde 1C ($K = 0,02871$). En dicho instrumento se introdujeron 10 mL de la solución preparada de alginato, previamente filtrada con filtro de nylon de paso 0,45 μm . Se introdujo el viscosímetro con la solución a un baño termostato a 25°C y se dejó que el sistema alcance el equilibrio térmico por 20 minutos, antes de iniciar las mediciones. Se registraron los tiempos de flujo para esta solución y para diluciones de 1,8, 1,6 y 1,4 mg/mL —estas diluciones se obtuvieron agregando consecutivamente 2 mL de NaCl 0,1 M a la solución en el interior del viscosímetro—. Para cada concentración, los tiempos se midieron 6 veces ($n=6$) y se obtuvo un promedio. También se obtuvo el tiempo promedio de 10 mL de la solución de NaCl (muestra blanco).

3.2.1.4. Determinación de la distribución de masas molares por GPC

Se realizó la caracterización de alginato por GPC de acuerdo a la norma ASTM F 2605 – 08.⁹⁰ Para esto, se preparó una solución de 0,05 M de Na_2SO_4 /0,01 M de EDTA en agua, que se usó como fase móvil. Dicha solución fue filtrada al vacío, con un filtro de éster de celulosa previo a su uso. Para la muestra de alginato, se prepararon 3 mL de una solución 1,5 mg/mL, la cual fue filtrada con un filtro de jeringa de 0,45 μm de poro. Se repitió el mismo procedimiento que con el alginato para cada uno de los 5 estándares de pululano (de 6, 50, 110, 200 y 400 kDa, respectivamente). El volumen de muestra usado para la inyección, tanto para el alginato como para los estándares, fue de 250 μL , de los que 100 μL entraron al cromatógrafo. El flujo utilizado en la cromatografía fue de 0,5 mL/min, por 40 minutos y a una temperatura de columna de 35°C.

3.2.2. Extracción de los compuestos de la uña de gato

El extracto de UT se obtuvo a partir de corteza en hilachas marca Naturandes. El procedimiento seguido consistió en una lixiviación de la UT en una solución 60% (V/V) de etanol en agua (se identificará dicha solución de aquí en adelante con el código 60%EtOH),

facilitada por un baño de ultrasonido, de acuerdo a lo reportado en la literatura.⁹¹ Para la extracción, se pesó 800 mg de la corteza en un vaso de precipitados, se le agregó 12 mL de la solución 60%EtOH y se tapó el recipiente para evitar la evaporación de la solución durante el proceso. Se introdujo dicho vaso en un baño de ultrasonido por 20 minutos, luego se trasvasó la fase líquida a un tubo de centrifuga. Se repitió la extracción por ultrasonido sobre los remanentes sólidos del vaso dos veces más, introduciendo en cada una un volumen adicional de 60%EtOH de manera que al final del proceso se obtuvieron aproximadamente 36 mL de extracto en el tubo de centrifuga. A continuación, se centrifugó el extracto obtenido por 10 minutos a 3500 rpm para luego rotavaporar el sobrenadante con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de solvente posible. El extracto concentrado obtenido fue liofilizado para obtener un extracto en polvo. Se almacenó el extracto en un desecador.

3.2.3. Caracterización del extracto de uña de gato

3.2.3.1. Análisis por FT-IR

Se elaboró una pastilla de 7 mm de diámetro a partir de la mezcla de 0,03 g del extracto liofilizado y 3 g de KBr. Para garantizar una mezcla homogénea, se molieron ambos sólidos con la ayuda de un mortero. Se obtuvo el espectro por transmisión con 32 barridos a una resolución de 4 cm⁻¹.

3.2.3.2. Determinación del contenido total de fenoles

Se caracterizó el extracto sólido en base a su contenido total de compuestos fenólicos usando como referencia un protocolo para el análisis a microescala de polifenoles en vinos.⁹² Dicho protocolo se basa en el uso del reactivo de FC y fue adaptado para su aplicación sobre la muestra de UT.

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó, en primer lugar, una solución stock de ácido gálico (estándar común para la cuantificación de polifenoles) a partir de 0,5 g del compuesto. Para facilitar la disolución del ácido gálico, primero se disolvió el sólido en 10

mL de etanol, para luego diluirlo con agua hasta obtener 100 mL de solución stock. A partir de dicha solución, mediante dilución con agua, se obtuvieron 100 mL de cuatro diferentes concentraciones: 400, 500, 800 y 1200 $\mu\text{g/mL}$. Se debe hacer hincapié en que las 4 soluciones obtenidas tuvieron un diferente contenido de EtOH, pues éste no se compensó al tomar diferentes volúmenes de la solución stock y diluirlos hasta el volumen final de 100 mL. Aun así, debido a la baja concentración de EtOH en las soluciones finales, se esperó que la diferencia en contenido de EtOH, no influyera en las mediciones realizadas —la concentración de EtOH en la solución de 1200 $\mu\text{g/mL}$ (la más concentrada), fue de 2,4% v/v—. Durante el trabajo con el ácido gálico se mantuvieron las soluciones cubiertas con papel aluminio en todo momento, debido a que dicho compuesto es fotosensible. En el caso del extracto de UT, se preparó 10 mL de una solución de concentración 3 mg/mL con la solución de 60%EtOH como solvente. Para las muestras, las mediciones se hicieron por triplicado ($n=3$) y para el caso del estándar, por quintuplicado ($n=5$), y en ambos casos se trabajó a una temperatura de 20°C. Asimismo, se utilizó la solución 60%EtOH como blanco.

El procedimiento para el análisis de las soluciones (estándares y muestra de UT) se realizó de manera directa en celdas de acrílico (protocolo a microescala). Primero se agregó en la celda 20 μL de la solución correspondiente, junto con 1,58 mL de agua y 100 μL de reactivo FC. Se agitó la celda para asegurar una mezcla homogénea y se dejó incubar por 7 minutos, aproximadamente, en un ambiente oscuro. A continuación, se agregó en la celda 300 μL de una solución acuosa de Na_2CO_3 de concentración 20 % (w/w) y se dejó incubar por 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Pasado dicho periodo de tiempo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm.

3.2.4. Elaboración y caracterización de las esponjas de alginato

3.2.4.1. Métodos para la elaboración de esponjas

Se plantearon cuatro métodos distintos para la elaboración de esponjas con el objetivo de evaluar las diferentes características obtenidas y elegir la más apropiada para la elaboración de los apósitos. Para cada método se trabajó con soluciones acuosas de alginato de sodio de concentraciones 1,5 y 3% (w/v) (se identificarán en adelante con los códigos 1,5%ALG y 3%ALG, respectivamente) las cuales fueron desgasificadas por medio de una cámara de vacío para evitar que la presencia de aire en la muestra pudiese afectar la formación natural de poros en el apósito. La desgasificación de cada muestra se realizó a -29 pulgadas de Hg por un periodo de 1 h, para los dos primeros métodos, y 2 h para el resto. Para todos los métodos, el entrecruzamiento de las muestras se realizó con una solución acuosa de CaCl_2 al 1% w/v. Por último, dada la naturaleza del procedimiento seguido, todas las esponjas obtenidas tienen una forma aproximadamente cilíndrica.

Para el primer método (Método A) se tomó la solución respectiva sin desgasificar y se vertió su contenido en envases plásticos que sirvieron de molde. La cantidad de solución en cada envase fue de 10 mL para asegurar la similitud entre muestras. La desgasificación descrita previamente se realizó directamente en los moldes por motivos prácticos y para evitar que, durante el traspaso de la solución, pudiese introducirse aire nuevamente en la solución. A continuación, se trató cada muestra en base a la patente de Seung-Man Han (2004),⁹³ en la que el entrecruzamiento del alginato se da de forma posterior a la formación de la esponja. De acuerdo a dicha patente, se congelaron las muestras en nitrógeno líquido (-196°C) para luego liofilizarlas. Durante el congelamiento, se procuró ingresar los envases con las muestras al nitrógeno lentamente, para evitar un cambio violento de temperatura en la muestra que pudiese causar ruptura de la esponja por expansión térmica. La esponja ya liofilizada se entrecruzó sumergiéndola en la solución acuosa 1% w/v de CaCl_2 por 3 horas bajo agitación constante. Al

retirar la esponja de la solución de entrecruzamiento, se lavó con agua para retirar los residuos de CaCl_2 y, posteriormente se secó. El secado se realizó inicialmente en una cámara con extractor de aire a temperatura ambiente, que permitió retirar la mayor parte de la humedad de la muestra. Luego se terminó el secado en un desecador (temperatura ambiente, también) cuya humedad relativa se mantuvo en un valor alrededor de 17%.

El método B siguió el mismo procedimiento que el método A hasta el punto de la desgasificación; la diferencia radicó en que las muestras B no se congelaron en nitrógeno líquido ni se liofilizaron. En su lugar, las muestras se congelaron a una temperatura de -14°C (en refrigerador) por 24 h. Dado que las muestras no habían sido entrecruzadas, introducirlas en la solución acuosa 1% w/v de CaCl_2 hubiese causado la disolución del alginato a medida que las muestras se descongelaban y antes de que hubiese terminado el entrecruzamiento. Por esta razón se siguió un proceso de entrecruzamiento en frío (temperatura 1°C), que permitiese que las muestras mantuvieran el estado sólido el tiempo suficiente como para permitir el entrecruzamiento de toda la superficie de la muestra en contacto con la solución de calcio, algo que impide la disolución del alginato. Para ello, se introdujeron las muestras congeladas (con todo y moldes plásticos) en una solución fría de entrecruzamiento, asegurando que se mantuviesen sumergidas por completo. Al igual que para el método A, el proceso se realizó bajo constante agitación de la solución de CaCl_2 1% w/v, pero se adicionó un baño frío a las condiciones del proceso. A los 3 minutos de iniciado el entrecruzamiento, se desmoldaron las muestras y se colocaron en una jaula diseñada para mantener a las muestras sumergidas a la vez de que se permitía que toda la superficie de estas estuviese en contacto con la solución de entrecruzamiento. Se dejó entrecruzar por 48 horas luego de lo que se retiraron las muestras, se lavaron con agua para retirar residuos de la sal de calcio y se dejaron secar de la misma forma que en el método A. En la figura 12 se observa un diagrama que resume tanto los métodos A y B, ya descritos, como los C y D, que se detallan a continuación.

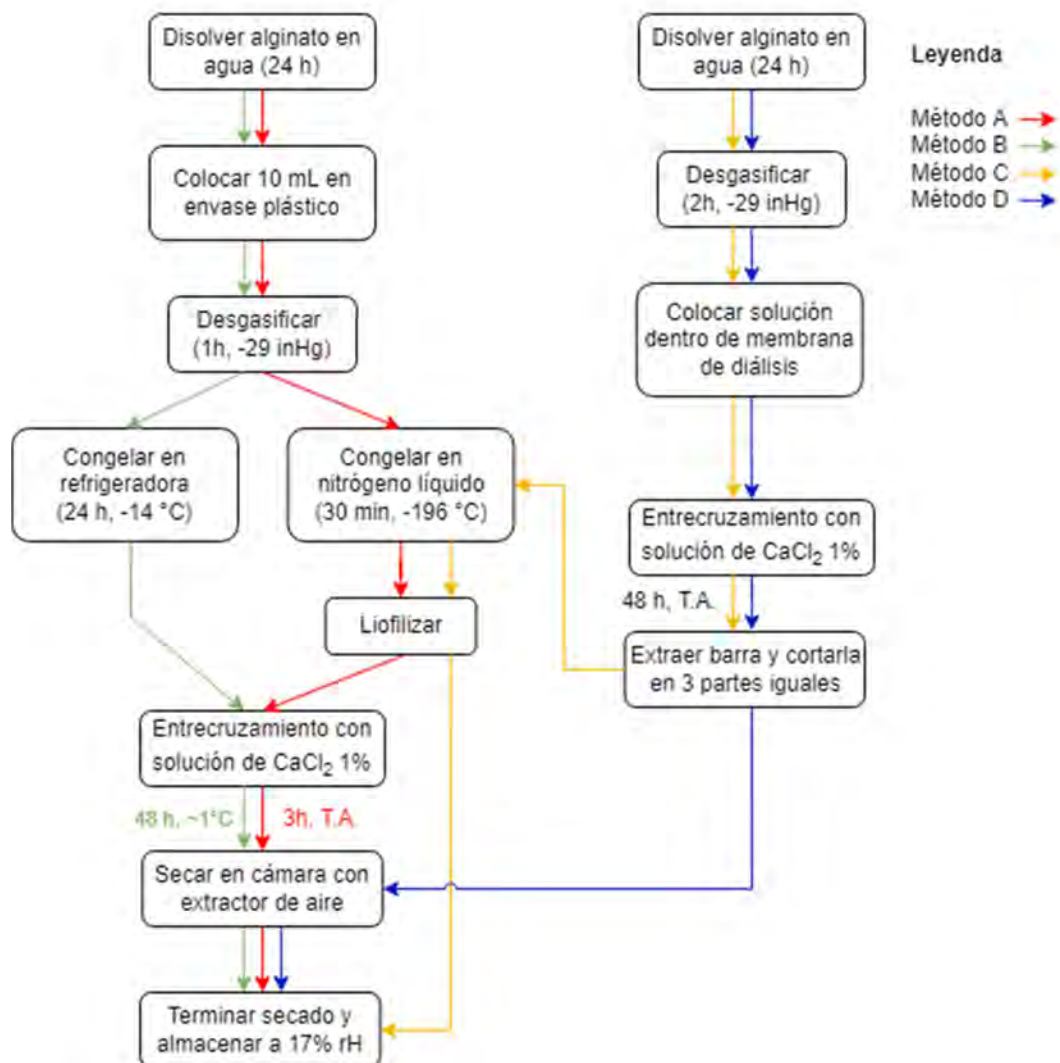


Figura 12. Resumen del procedimiento seguido para cada uno de los métodos.

Los métodos C y D son muy diferentes a los dos anteriores puesto que no utilizan moldes plásticos para la elaboración de esponjas. Además, las muestras no están en estado sólido durante el entrecruzamiento, sino en solución. El procedimiento consistió en tomar 50 mL de la solución desgasificada de alginato e introducir ese volumen en una membrana de diálisis con MWCO de 12-14 kD. Luego se sumergió por completo la membrana de diálisis con alginato en la solución de entrecruzamiento por 48 horas, renovando la solución a las 24 horas, para asegurar suficiente cantidad de calcio. Después de transcurridos los dos días, se retiró la

membrana de diálisis de la solución y se extrajo de su interior la barra cilíndrica del alginato entrecruzado que se había formado. Se lavó la barra con agua para retirar el residuo de CaCl_2 y de ésta se cortaron 3 segmentos cilíndricos iguales para formar lo que luego serían 3 esponjas de alginato. Para el método C, se congelaron en nitrógeno líquido, se liofilizaron los segmentos de barra obtenidos y se almacenaron en un desecador a 17% de humedad relativa. En el caso del método D, no se realizó congelamiento ni liofilización, se dejaron secar las muestras cilíndricas en la cámara de extractor de aire y en el desecador con humedad relativa de 17%.

3.2.4.2. Caracterización de las esponjas

3.2.4.2.1. Prueba de hinchamiento de las esponjas a pH 5,5

Primero, se evaluó el hinchamiento de las esponjas en un medio acuoso que simule la situación en la que no hay una herida. De acuerdo a la literatura, la parte superior de la piel sana (*i.e.* los estratos más externos de la epidermis como los estratos córneo, lúcido y granuloso) tiene un pH en el rango de 4 a 6,^{94,95} por lo que se decidió realizar la medición a un valor de pH de 5,5. El procedimiento consistió en introducir la esponja seca (con masa w_0) en un buffer a pH 5,5 (buffer de 1,22 g de acetato de sodio trihidratado disuelto en 59 μL de ácido acético glacial y diluido hasta un volumen de 1 L) por un periodo de 24 horas y registrar la masa de la esponja húmeda (w_h) a distintos tiempos durante la prueba. Luego, para cada uno de estos tiempos se calculó el porcentaje de hinchamiento de acuerdo con la ecuación en (2).

Las mediciones se hicieron, por triplicado ($n=3$), para fragmentos de las esponjas, específicamente sectores cilíndricos de 1/8 del volumen total de la esponja, obtenidas por cada uno de los métodos (A al D) a partir de las soluciones 1,5%ALG y 3%ALG. En la figura 13 se muestra un diagrama que esclarece las formas y el volumen de los fragmentos de las esponjas usados, tanto para la prueba de hinchamiento, recién descrita, como para la prueba antioxidante que se describe más adelante. En esta figura, D y h son el diámetro y la altura de la esponja

entera, con volumen V . Los fragmentos son sectores cilíndricos con un ángulo de sector determinado y con volúmenes que son una fracción de V .

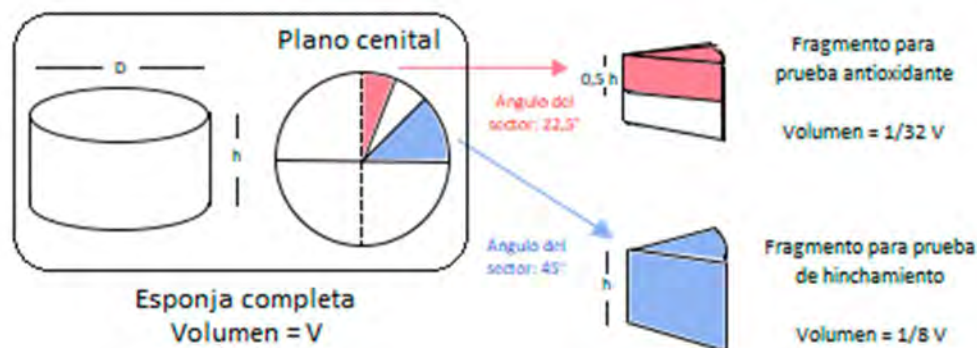


Figura 13. Diagrama de la forma y volumen de los fragmentos de esponjas usados para la prueba antioxidante y la prueba de hinchamiento.

Además, el concepto de esponja seca utilizado fue el de una esponja almacenada en el desecador con 17% de humedad relativa.

$$\% \text{ hinchamiento} = \frac{w_h - w_0}{w_0} * 100 \quad (2)$$

Se llenó un tubo de centrifuga con 35 mL del buffer para cada una de las muestras y se introdujeron éstos dentro de un baño termostato hasta que se alcanzó el equilibrio térmico a $37,5^\circ\text{C}$. Se colocaron las muestras, luego de pesarlas, dentro de los respectivos tubos, asegurando que queden sumergidas completamente en el buffer y se registró la masa de cada muestra a los 20, 40 y 60 minutos, así como a las 3, 5, 8 y 24 horas. Para registrar los valores de w_h de cada muestra, se retiró ésta de la solución, se secó realizando 2 toques sobre un papel Kimwipe y se centrifugó la muestra a 100 rpm, para recién luego pesarla. Después de pesada, la esponja se volvió a sumergir en el buffer a pH 5,5 para que continúe el experimento. El proceso desde que se retiró la esponja del tubo de centrifuga con buffer para pesarla hasta que se reintrodujo en éste, fue de aproximadamente 3 minutos para cada medida.

3.2.4.2.2. Prueba de hinchamiento de las esponjas en simulación de un medio con herida

Luego de evaluar la capacidad de absorción de las esponjas en un medio que simula un ambiente sin herida, se decidió evaluar el hinchamiento en la situación en la que existe una herida. Para ello, se preparó un fluido de herida simulado (SWF, por sus siglas en inglés) que tuviese un pH 7,5 —el rango de pH reportado para heridas abiertas es de 6,5 a 8,5—. ⁹⁶ La preparación del SWF se basó en un estudio realizado por Boateng *et al.*,⁹⁷ en el que se realizó prueba de hinchamiento sobre una película de carragenina y óxido de polietileno, y consistió en obtener una 250 mL de una solución acuosa de 0,4 M de NaCl, 0,02 M de CaCl₂, 0,008 M de tris(hidroximetil)aminometano y 2% (w/v) de albúmina de suero de bovino (BSA). Durante la preparación del SWF, se procuró no someter al BSA a condiciones que pudieran generar su desnaturalización. Por ello, el BSA se agregó después de disolver el resto de compuestos y de haber llevado la solución al pH deseado con soluciones de HCl y NaOH (concentraciones 1 M y 0,1 tanto para el ácido como para la base). La disolución de la proteína se realizó mediante agitación manual para evitar la generación de espuma. Luego de disuelto el BSA, se completó con agua el volumen deseado.

La medición de hinchamiento con el buffer a pH 7,5 se realizó de manera idéntica a la seguida para el buffer a pH 5,5 —misma cantidad de solución en los tubos de centrifuga, mismos tiempos de medición, misma temperatura, mismo número de mediciones por muestra (triplicado, n=3) y mismo proceso de secado y pesado—; la única diferencia fue que en esta prueba sólo se evaluaron las esponjas de 1,5%ALG y 3%ALG del método C. Al igual que para la prueba de hinchamiento a pH 5,5, para la medición se utilizaron fragmentos de 1/8 del volumen total de la esponja. Para las esponjas C 1,5%ALG y 3%ALG, el volumen aproximado de dichos fragmentos fue de 0,5143 cm³ y 0,6099 cm³, respectivamente.

3.2.5. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox del extracto de UT y evaluación de la capacidad antioxidante de la esponja cargada con el extracto.

La determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC, por sus siglas en inglés), como ya se explicó en el marco teórico, se mide en referencia al trolox. Por ello, es necesario elaborar una curva de calibración con dicho estándar. La obtención de la curva de calibración, así como la determinación de la TEAC del extracto de UT, se basó en el procedimiento seguido en un estudio que evaluó la TEAC de diversos compuestos por medio del uso de ABTS.⁸⁸

En el caso de la esponja cargada con UT, se consideró que no era necesario medir la capacidad antioxidante en función del trolox, y sólo se tomó en cuenta la evolución del porcentaje de inhibición en el tiempo para cada uno de los componentes que conforman la esponja cargada —es decir, para el extracto de UT y la esponja por separado—, y compararlo con la de la esponja cargada, sin necesidad de hacerlo en función a ningún estándar.

3.2.5.1. Preparación de la solución de ABTS y obtención de la curva de calibración de trolox

Antes de iniciar la prueba se prepararon 10 mL de una solución de 7 mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato de potasio en agua. Esta solución se almacenó en la oscuridad por 24 horas para asegurar la completa oxidación de ABTS. Luego de transcurridas las 24 horas, se diluyó parte de la solución de ABTS oxidada en etanol hasta que se obtuvo una absorbancia de $0,700 \pm 0,003$.

Para la elaboración de la curva de calibración, se prepararon soluciones de trolox de 4 diferentes concentraciones en etanol de manera que las concentraciones finales en la celda de medición fueran de 3, 5, 10 y 15 μM , respectivamente (el volumen final total en celda fue de 3,03 mL). El proceso de medición consistió en agregar 3 mL de ABTS con absorbancia de 0,7

a la celda, añadir 30 μL de la solución de trolox, agitar la celda para asegurar una mezcla homogénea y registrar los valores de absorbancia ($A_{muestra}$) a 734 nm, en tiempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos, a temperatura ambiente (20°C). Las mediciones sobre la muestra se realizaron a la par de mediciones sobre un control, el cual siguió el procedimiento ya descrito, salvo que, en lugar de agregar 30 μL de trolox, se añadieron 30 μL de etanol. Con los valores de absorbancia del control ($A_{control}$) y los de $A_{muestra}$, se calculó el % inhibición de acuerdo a la ecuación (3). Para cada solución de trolox y su respectivo blanco, se hicieron mediciones por triplicado ($n=3$).

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_{muestra} - A_{control}}{A_{control}} * 100 \quad (3)$$

3.2.5.2. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) del extracto de UT

El análisis del extracto se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para los estándares, pero reemplazando los 30 μL de la solución de trolox por 30 μL de una solución del extracto en la solución 60%EtOH, previamente preparada. Se decidió hacer la prueba para varias concentraciones del extracto, específicamente 0,5; 0,75; 1 y 1,5 mg/mL. El control utilizado en estos casos fue la solución 60%EtOH.

3.2.5.3. Adición del extracto de UT a la esponja de alginato

La adición del extracto de UT se realizó sobre fragmentos de las esponjas de 3%ALG del método C, similares a los sectores cilíndricos usados para la prueba de hinchamiento, pero en este caso de un volumen aproximado de $0,1524 \text{ cm}^3$, lo que corresponde a $1/32$ del volumen total promedio de la esponja 3%ALG del método C (ver figura 13) La masa correspondiente a esas porciones estuvo en el rango de $92 \pm 1 \text{ mg}$. No se trabajó con las esponjas 1,5%ALG por cuestiones de tiempo.

Sobre dichas porciones se añadió un volumen de 125 μL de una solución de concentración 3 mg/mL del extracto de UT (el solvente de la solución fue la solución 60%EtOH

usada durante la extracción) con un pH de 5. La aplicación de la solución de UT fue realizada por goteo con una micropipeta, procurando la completa absorción de ésta por parte de la esponja. Se decidió aplicar el extracto por goteo en lugar de sumergir las esponjas en el extracto, para tener un mejor conocimiento de la cantidad de extracto absorbido por la esponja. Además, otra razón fue evitar que el agua presente en la solución 3 mg/mL del extracto humedeciera en exceso a la esponja, lo que podría modificar significativamente la forma de la muestra (el proceso de secado de la esponja a temperatura ambiente, la deforma de manera considerable como se puede observar en la tabla 9, más adelante).

3.2.5.4. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de UT, la esponja de alginato y de la esponja cargada con UT

Debido al tamaño de la esponja cargada de UT, se adaptó el procedimiento utilizado en la determinación de TEAC del extracto de UT a una mayor escala: se pasó de un volumen de solución de ABTS de 3 mL a un volumen de 50 mL que permitiera una apropiada medición de la capacidad antioxidante. Como parte de la adaptación, la prueba se realizó en recipientes cerrados en lugar de hacerlo directamente en las cubetas de UV, dejando estas últimas únicamente para el momento de la toma de la medición de la absorbancia en los tiempos designados.

Las mediciones de la capacidad antioxidante, tanto del extracto de UT como de la esponja de alginato y de la esponja cargada con UT, se realizaron por triplicado ($n=3$) y a 20°C. Se trabajó con dos recipientes, uno de control y el otro de medición de la muestra. Como ya se estableció, en ambos recipientes se colocaron 50 mL de la solución de ABTS con una absorbancia inicial de $0,700 \pm 0,003$. En el recipiente de medición de la muestra se introdujo, además del ABTS, la muestra respectiva para evaluar el porcentaje de inhibición a distintos tiempos, a lo largo de 2 días. Los tiempos de medición escogidos fueron a los minutos 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 540, 1320, 1440, 1560, 1680, 1800 y 1920.

Para cada uno de estos tiempos, el procedimiento fue el mismo: se agitaban levemente los recipientes justo antes de la medición (el resto del tiempo se encontraban en reposo), se tomaba una alícuota de 3 mL de la solución para realizar la medición en las cubetas y se devolvía dicha alícuota al respectivo recipiente. Los recipientes, protegidos de la luz por papel aluminio, se mantenían cerrados en todo momento, salvo cuando se realizaban las mediciones.

Para la determinación de la capacidad antioxidante de la solución de UT, la muestra introducida en el recipiente de medición fue 125 μ L de la solución de UT 3 mg/mL (la misma cantidad que se cargó a las esponjas de alginato). Para la esponja de alginato, se procuró usar una esponja de las mismas dimensiones y masa que las esponjas que se cargaron con UT (algo que se consiguió, pues las masas fueron de 88 ± 2 mg, valor cercano al de las esponjas cargadas). Para el caso de la esponja cargada con UT, luego de agregar la solución del extracto de acuerdo a lo ya descrito en el apartado 3.2.5.3, se dejó secar la muestra, protegida de la luz, por 30 minutos antes de empezar la medición. En el recipiente de control, se introdujo 125 μ L de la solución acuosa 60%EtOH para el caso de la medición de la capacidad antioxidante del extracto de UT; mientras que, para las esponjas, no se introdujo nada.

4. Resultados y discusión

4.1.1. Caracterización del alginato

4.1.1.1. Análisis de la composición y estructura por RMN

El espectro de ^1H -RMN obtenido se muestra en la figura 14. En este, se observa, además de las señales correspondientes al alginato, dos señales especiales: la señal del TMSP (estándar interno utilizado) a un desplazamiento químico de 0 ppm y la señal del HOD, debido al intercambio de deuterio por hidrógeno en el agua deuterada usada como solvente, a 4,32 ppm. En el mismo espectro, se ha realizado un acercamiento de la región de 4,4-5,4 ppm, en donde se encuentran las señales correspondientes principalmente a los protones de los carbonos anoméricos de los monómeros de alginato, así como señales asociadas al H del carbono 5 de la subunidad G.

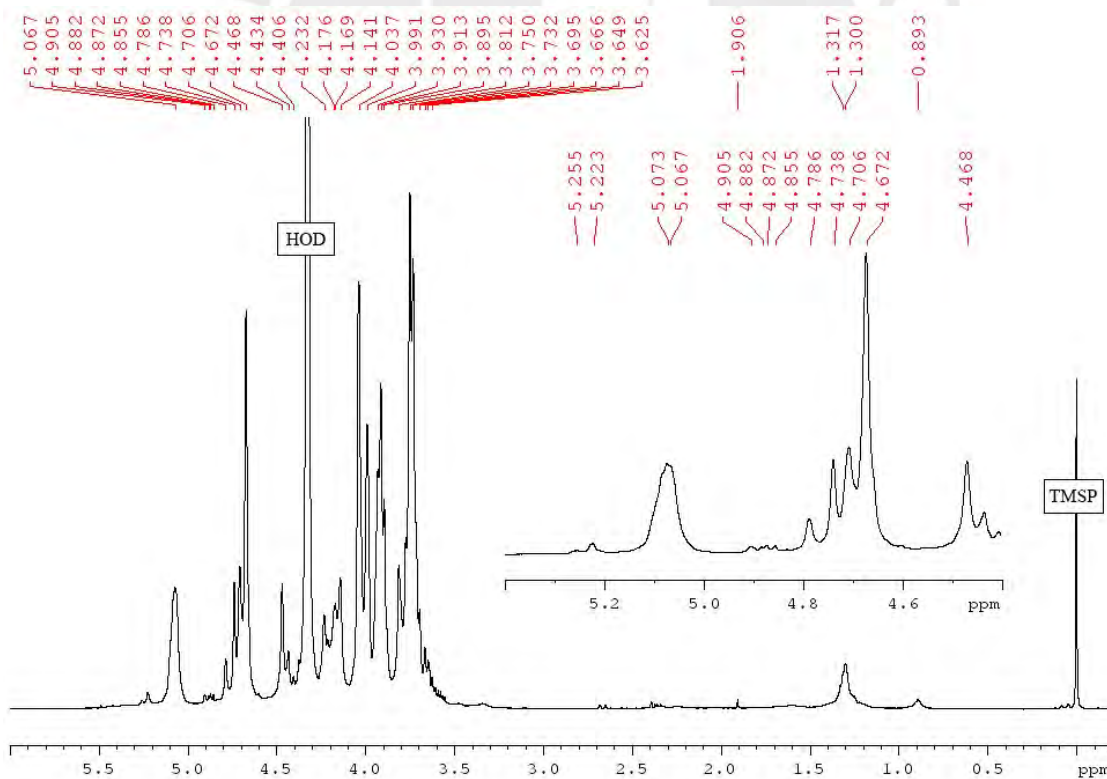


Figura 14. Espectro de RMN en el que se aprecian, además de las señales correspondientes al alginato, las señales del estándar TMSP y del solvente, HOD.

De acuerdo a lo reportado en la literatura,^{30,98} podemos establecer que la señal a 5,073 ppm corresponde al H del C1 del G. Asimismo, se identifican 4 señales correspondientes al protón del C5 del G presente en triadas, específicamente las triadas GGM, MGM, GGG y MGG (la subunidad subraya es a la que pertenece el H) con desplazamientos de 4,786, 4,738, 4,468 y 4,434 ppm. En lo que se refiere al M, identificamos dos señales correspondientes al protón del carbono anomérico, uno para la diada MM y otro para la MG, a desplazamientos de 4,672 y 4,706 ppm, respectivamente. Por último, encontramos 2 señales de baja intensidad en 5,255 y 5,223 ppm que corresponde al protón anomérico del extremo reductor G en configuración α , así como 4 señales entre 4,855 y 4,905 ppm originados por el extremo reductor G en configuración β . En la figura 15, se muestra la zona del espectro previamente analizada, después de haberse realizado una deconvolución de las señales.

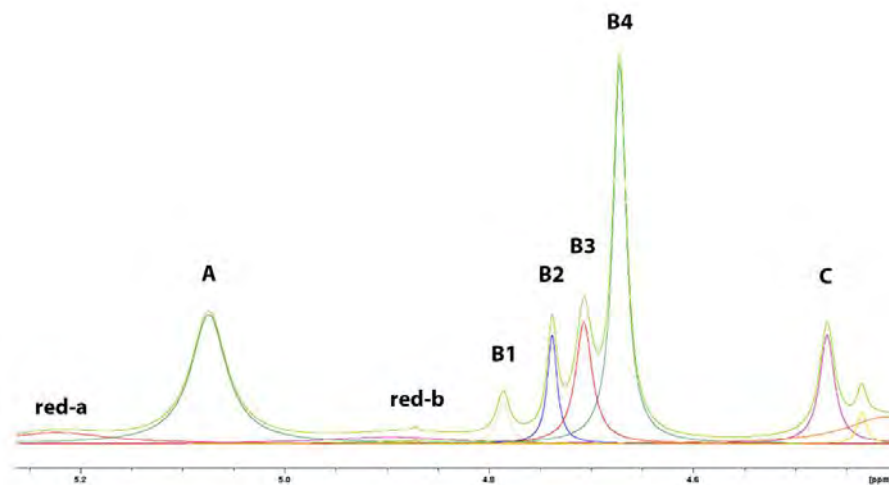


Figura 15. Deconvolución de las señales obtenidas del espectro de RMN del alginato, en la región de 4,4-5,4 ppm. Para cada señal se ha asignado una etiqueta (ver tabla 2).

En la tabla 2 se encuentran detallados los valores de integración para cada pico luego de la deconvolución, así como otra información importante sobre ellos. Si bien en el espectro obtenido se pueden apreciar dos picos correspondientes a la señal H-5 de las triadas GGG y

M \underline{G} G, tal y como ya se analizó, de acuerdo a lo establecido por la norma seguida, la integración de estos dos picos se evaluó como una única (señal C), correspondiente al H-5 de la diada \underline{G} G.

Tabla 2. Tiempos registrados por viscosimetría capilar para 4 diferentes concentraciones de alginato de sodio Sigma-Aldrich y los valores de viscosidad determinados con ellos.

Señal	H asociado a la señal	δ (ppm)	Integración de la señal (u.a.)
A	H-1 de G	5,073	22,122
B1	H-5 de \underline{G} \underline{G} M	4,786	2,548
B2	H-5 de \underline{M} \underline{G} M	4,738	5,111
B3	H-1 de \underline{M} G	4,706	9,721
B4	H-1 de \underline{M} M	4,672	24,343
C	H-5 de \underline{G} G	4,434 (M \underline{G} G); 4,468 (G \underline{G} G)	7,868
red-a	H-1 de G (extremo reductor α)	5,223; 5,255	-
red-b	H-1 de G (extremo reductor β)	4,855; 4,872; 4,882; 4,905	-

En base a los valores de integración obtenidos para cada señal, se determinan, mediante ecuaciones presentadas en la norma usada (consultar tabla A2 y A3 del anexo) la proporción o fracción de G y M en la muestra de alginato, así como la de diadas GG, MM, GM y MG y triadas GGM, MGG, MGM y GGG. Con dicha información, se calcula el ratio M/G del alginato utilizado, encontrándose que es de 1,7080. Este valor coincide con lo esperado por lo mostrado en la figura 14, en el que la intensidad de los picos B1-B4 (todos ellos correspondientes a diadas y triadas que contienen M) son mayores en relación a los picos A y C (que corresponden a G), lo que es indicativo de una presencia mayoritaria de M con respecto a G. Por último, se determinan las longitudes promedio de los bloques G y M (N_G y N_M) —valor que incluye los

bloques de longitud 1 (e.g. MGM ó GMG)—, así como $N_{G>1}$, que excluye para el cálculo los bloques de longitud 1.

Tabla 3. Fracciones (proporciones) de monómeros, diadas y triadas; ratio M/G y longitudes promedio de los bloques G y M en la muestra de alginato, obtenidas a partir del espectro de RMN.

Fracciones de monómeros, diadas y triadas	
Monómeros	$F_G = 0,3293$ $F_M = 0,6307$
Diadas	$F_{GG} = 0,2033$ $F_{MG} = F_{GM} = 0,1659$ $F_{MM} = 0,4648$
Triadas	$F_{GGM} = F_{MGG} = 0,0552$ $F_{MGM} = 0,1107$ $F_{GGG} = 0,1481$
$Ratio\ M/G = 1,7080$	
Longitudes promedio de bloques	
Bloque G	$N_G = 2,2$
Bloque M	$N_M = 3,8$
Bloque G (excluyendo los de longitud 1)	$N_{G>1} = 4,7$

El ratio M/G nos permite concluir que el alginato con la que se trabajó tiene un porcentaje de 63,07% de M, sobre el número total de monómeros. La mayor presencia de unidades M sobre G así como el hecho de que $N_{G>1} = 4,7$ nos indica la ausencia de bloques extensos poli-G que aportan rigidez a las cadenas de la muestra. Por lo tanto, se espera que predominen bloques MG y que las cadenas sean flexibles.

4.1.1.2. Análisis de la composición por FT-IR

El espectro obtenido se muestra en la figura 16. En dicho espectro se encuentran identificadas las bandas principales cuya interpretación, basada en referencias bibliográficas,^{99,100} se presenta en la tabla 4.

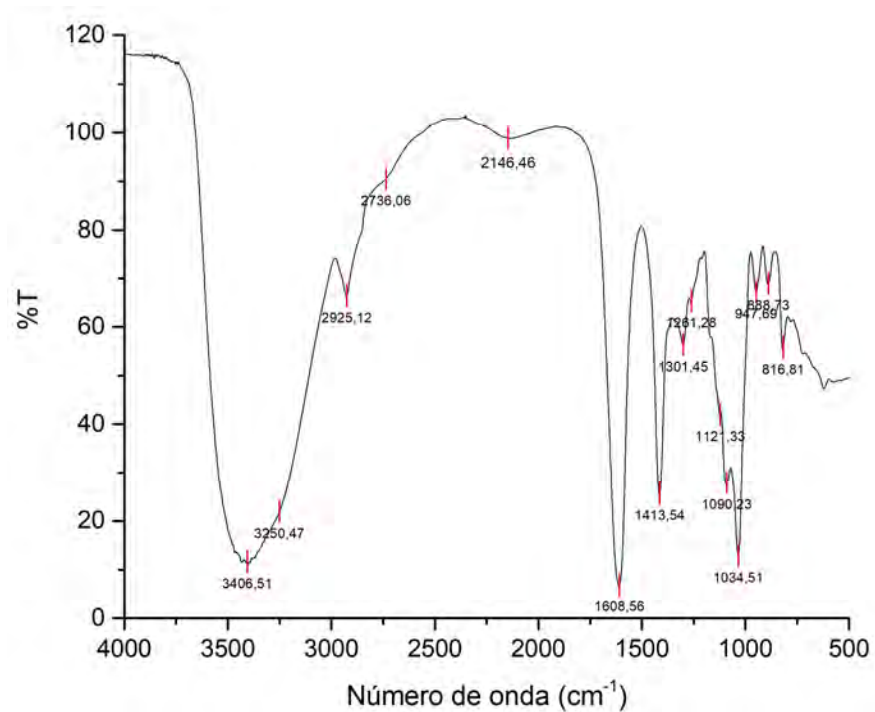


Figura 16. Espectro FT-IR de la muestra de alginato, obtenido por transmisión con pastilla de KBr.

Tabla 4. Identificación de señales en el espectro de FT-IR del alginato.^{99,100}

Número de onda (cm ⁻¹)	Vibración asociada
3406,51 (3250,47 ^h)	Estiramiento (v) del OH
2925,12 (2736,06 ^h)	Estiramiento (v) del CH alifático
1608,56	Estiramiento asimétrico (v _{as}) del COO ⁻
1413,54	Estiramiento simétrico (v _s) del COO ⁻
1301,45 (1261,68 ^h)	Estiramiento (v) de CO
1121,33	Estiramiento (v) de CC
1090,23	Estiramiento (v) CO y C-O-C
1034,51	Estiramiento CO (v)*
947,69	Estiramiento CO (v) de residuos de ácido urónico
888,73	Deformación de C1-H de residuos de ácido β-manurónico
816,81	Residuo de ácido manurónico*

^h Señal correspondiente a un hombro en el espectro, *Posible interpretación⁹⁹

Para determinar el ratio M/G en base al método de Filippov y Kohn,⁵³ nos enfocamos en la sección de 1500 a 850 cm⁻¹ del espectro obtenido, específicamente en las señales obtenidas para 1320, 1290, 1125 y 1030 cm⁻¹. Debido a diferencias propias de la medición, los números de onda analizados en dicho método no coinciden con los nuestros, pero se puede hacer un paralelo al observar las bandas u hombros a los que dichos valores hacen referencia. En nuestro caso, las señales analizadas se muestran en la figura 17.

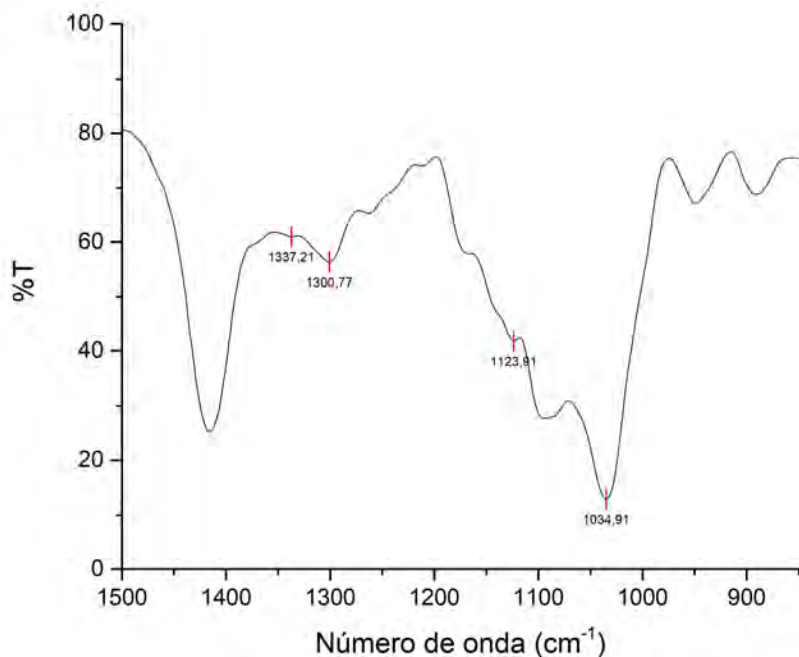


Figura 17. Sección del espectro FT-IR de 1500 a 850 cm^{-1} en el que se identifican las señales usadas para la determinación del ratio M/G.

Luego de realizar la conversión de %T a absorbancia, se obtienen valores de $A_{1337}/A_{1301}=0,8621$ y $A_{1124}/A_{1035}=0,4262$. En las curvas de calibración presentadas en el método seguido, esos valores del ratio de absorbancias corresponden, respectivamente, a muestras de alginato de 32% G - 68% M y 27% G - 73% M. Al comparar con los resultados obtenidos por RMN (donde se determina una composición de 36,93% G - 63,07% M), podemos observar que los valores son bastante cercanos para el caso del ratio A_{1337}/A_{1301} . Evidentemente, el hecho de utilizar una curva de calibración obtenida en otras condiciones (diferente espectrómetro, diferente número de escaneos, entre otros) y a partir de otras muestras hará que la determinación del ratio M/G tenga un error significativo, pero el cálculo aproximado es bueno si se considera la simplicidad del método.

4.1.1.3. Determinación de la masa molar promedio de viscosidad

A partir de los tiempos medidos para cada una de las soluciones y para el solvente, se calculan los valores de viscosidad relativa (η_r), viscosidad específica (η_{sp}), viscosidad

inherente (η_{inh}), viscosidad reducida (η_{red}) y la viscosidad intrínseca $[\eta]$, ésta última, obtenida tanto por el método de Kraemer, en (8),⁵⁵ como por el de Huggins, en (9).⁵⁵ A continuación, se detallan las expresiones⁵⁵ que nos permiten calcular cada una de las viscosidades, dónde t es el tiempo promedio medido para cada una de las soluciones, C es su concentración en g/mL y t_0 es el tiempo registrado para el blanco.

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (4)$$

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (5)$$

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_r}{C} \quad (6)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (7)$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{inh} \quad (8)$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{red} \quad (9)$$

Los valores obtenidos al reemplazar en las ecuaciones (4) a (6), los tiempos promedio (obtenidos a partir de 5 mediciones, n=5) y las concentraciones, se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Tiempos promedio (a partir de n=5) registrados por viscosimetría capilar para 4 diferentes concentraciones de alginato de sodio Sigma-Aldrich y los valores de viscosidad determinados con ellos.

	Concentración de alginato de sodio x 10 ⁻³ (g/mL)				
	2,097	1,797	1,573	1,398	Solvente
t promedio (s)	63,37	58,5	55,11	52,6	36,18
η_r	1,75	1,62	1,52	1,45	-
η_{sp}	0,75	0,62	0,52	0,45	-
η_{inh}	267,32	267,38	267,62	267,72	-
η_{red}	358,44	343,28	332,73	324,69	-

En la figura 18 se grafican los valores de viscosidad inherente (η_{inh}) y viscosidad reducida (η_{red}) para cada una de las soluciones en función de su concentración. Se establecen con ellas ajustes lineales y se evalúan sus valores en el límite de $C = 0$, para determinar los valores de $[\eta]$ de acuerdo con las ecuaciones (8) y (9).

Al calcular el valor de viscosidad intrínseca notamos que no coinciden por los dos métodos, por lo que se obtiene un promedio. Con dicho valor promedio y con los parámetros establecidos por Martinsen *et al.*,⁸⁹ se determina la masa molar promedio de viscosidad (M_v) con la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. Los valores calculados se resumen en la tabla 6.

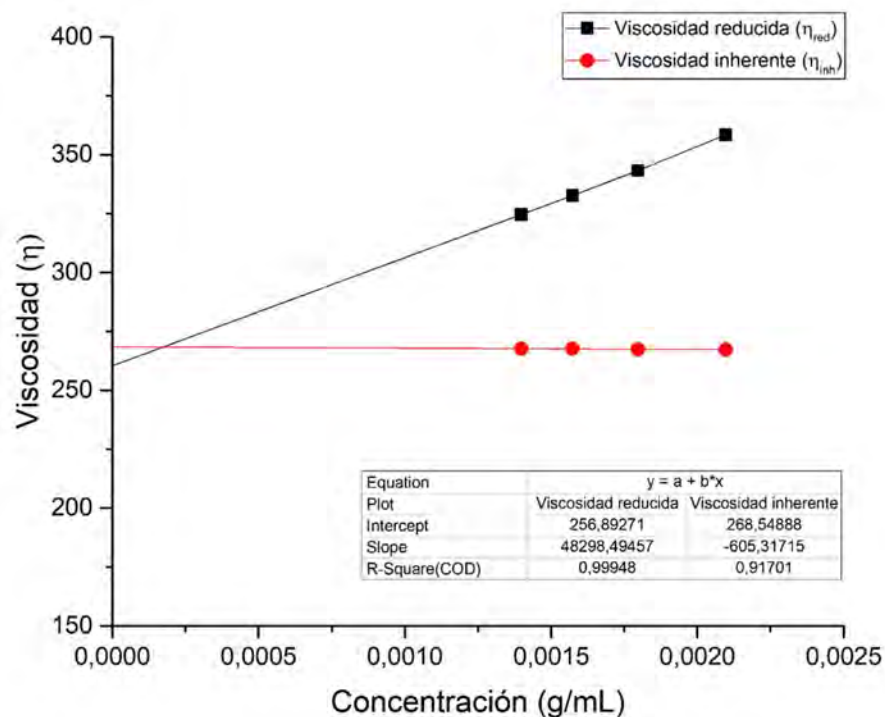


Figura 18. Viscosidad reducida y la viscosidad inherente de cada solución de alginato de sodio para el cálculo de la viscosidad intrínseca.

Tabla 6. Valores de viscosidad intrínseca y cálculo de la masa molar por ecuación de Mark-Houwink-Sakurada.

	M. Kraemer⁵⁵	M. Huggins⁵⁵	Promedio
[η] (mL/g)	268,55	256,89	262,72
M_v (g/mol)	89 614,23		

4.1.1.4. Determinación de la distribución de masas molares por GPC

La GPC nos permite determinar la distribución de masas molares de las cadenas en la muestra de alginato, así como diferentes valores de masas molares promedio como la masa molar promedio en peso (M_w), la masa molar promedio en número (M_n), así como la masa molar en el pico máximo del cromatograma (M_p). En la figura 19 se aprecian los

cromatogramas de los estándares de pululano, así como el cromatograma de la solución de alginato.

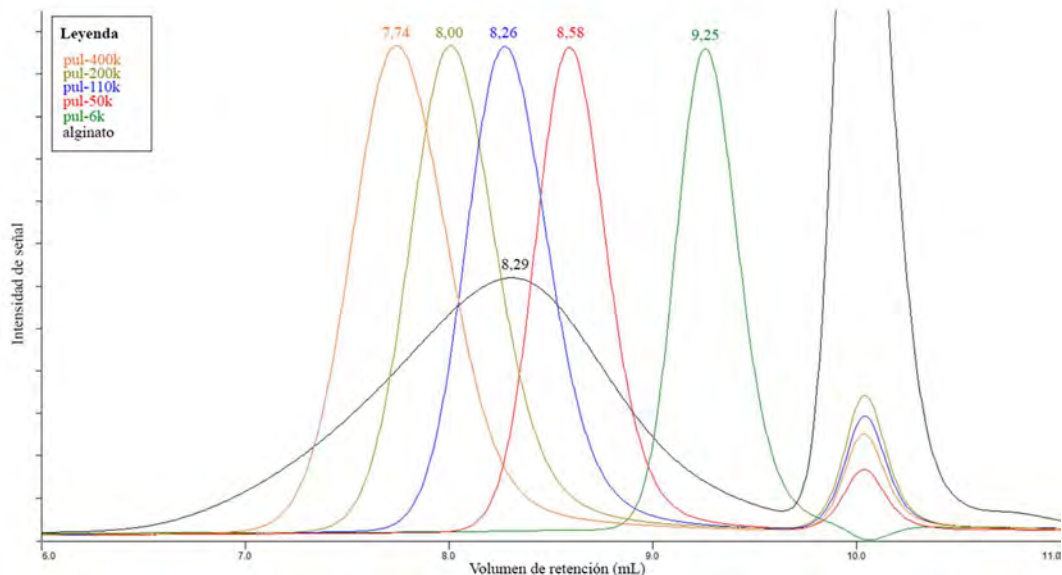


Figura 19. Cromatograma de la solución de alginato y los estándares de pululano. Sobre cada uno de los picos se muestra el volumen de retención respectivo. La intensidad de la señal no está a escala.

El orden en el que se sitúan los picos de los estándares de izquierda a derecha —el estándar de pululano de 400 kDa situado al lado izquierdo y el estándar de 6 kDa en el extremo derecho— es el esperado, pues las muestras con mayor masa molar promedio presentan un menor volumen de retención que los de menor masa molar promedio. Esto se debe a que una mayor masa molar promedio se asocia a una mayor población de cadenas largas en la muestra y, éstas, atraviesan la columna de GPC más rápido al no ingresar tanto en los poros de ésta. En la tabla A4 del anexo se presentan las masas molares promedio, así como el índice de polidispersión de los estándares de pululano, de acuerdo a la información brindada por el productor.

En la misma figura (figura 19) se puede observar que la curva de dispersión de las masas molares de la muestra de alginato se encuentra centrada aproximadamente sobre el pico del

pululano de 110 kDa, a un volumen de retención de 8,29 mL. Sin embargo, a diferencia de dicho estándar, y también del resto de estándares, la amplitud de la curva de distribución de masas molares de la muestra de alginato es mucho mayor. Esto implica que hay una mayor diversidad en las longitudes de la población de cadenas de la muestra de alginato. Cabe señalar que los valores de PDI reportados para polímeros naturales —en este caso, el alginato— son elevados,¹⁰¹ lo que concuerda con lo determinado en este trabajo.

Con la GPC de los estándares se estableció una curva de calibración de volumen de retención vs $\log M_p$. Con esta curva se pudo determinar los valores de $M_w = 245,444 \text{ kDa}$, $M_n = 50,738 \text{ kDa}$ y $M_p = 99,441 \text{ kDa}$ para el alginato, así como el PDI (4,837). En las figuras 20 y 21 se muestran la curva de calibración obtenida a partir de los estándares de pululano y el cromatograma de alginato a mayor detalle, respectivamente. En esta última se incluyen los valores de las diferentes masas molares promedio, así como el PDI.

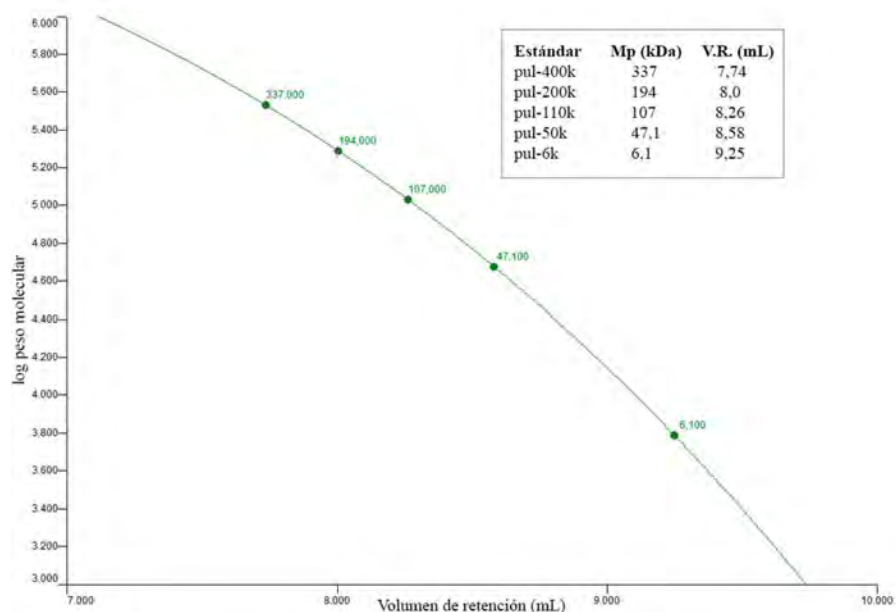


Figura 20. Curva de calibración elaborada a partir de los estándares de pululano. Se indican los valores de M_p así como el volumen de retención de cada estándar.

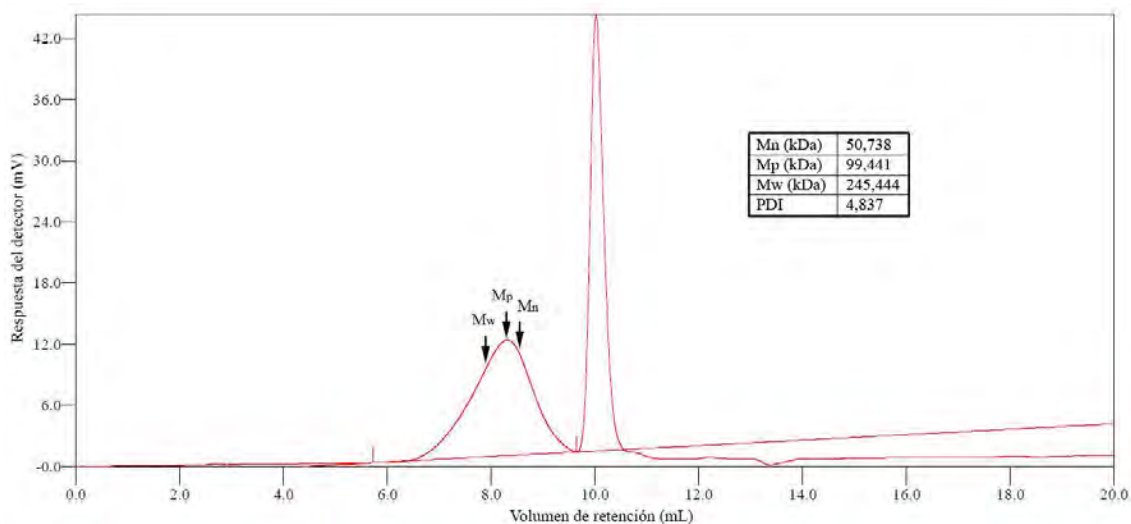


Figura 21. Cromatograma del alginato de sodio. En ella se señalan las M_w , M_n y M_p en la curva, así como sus valores en una tabla adjunta.

De acuerdo a lo esperado, se observa que $M_n < M_p < M_w$. Como a mayor valor de masa molar promedio, menor valor de volumen de retención, en el cromatograma los valores de M se presentan en el orden M_w , M_p y M_n , como lo muestran las flechas dibujadas sobre la curva. El valor de PDI de 4,837 concuerda con la observación hecha previamente de que la distribución de las masas molares del alginato es más dispersa (distribución más ancha) que las de los estándares. El PDI de los estándares es muy cercano a 1.

4.1.2. Extracción de los compuestos de uña de gato

De acuerdo al método seguido para la extracción, se obtiene un sólido de color marrón, con una tonalidad similar a la canela en polvo. En base a numerosas extracciones se establece que el porcentaje de masa de extracto obtenida con respecto a la masa de materia prima utilizada fue de $8,55 \pm 0,28$ % (ver anexo, Tabla A5).

4.1.3. Caracterización del extracto de uña de gato

4.1.3.1. Análisis por FT-IR

En la figura 22 se aprecia el espectro IR por transmisión con pastilla de KBr del extracto de UT. Dicho extracto, al ser una mezcla compleja, no permite una sencilla dilucidación de las

bandas del IR, por lo que la información que hay en la bibliografía es limitada. En la tabla 7 se resumen algunas de las señales que pudieron identificarse en base a un estudio de Kaiser *et al.*¹⁰² en el que se realizaron mediciones por FT-IR de UT (tanto de la especie *Uncaria tomentosa* como de la UG); así como, en base a espectros reportados en la literatura¹⁰³ para taninos de otras especies de plantas, pero que tienen una gran similitud con el espectro de la figura 22 (el espectro usado para la comparación se puede apreciar en el anexo).

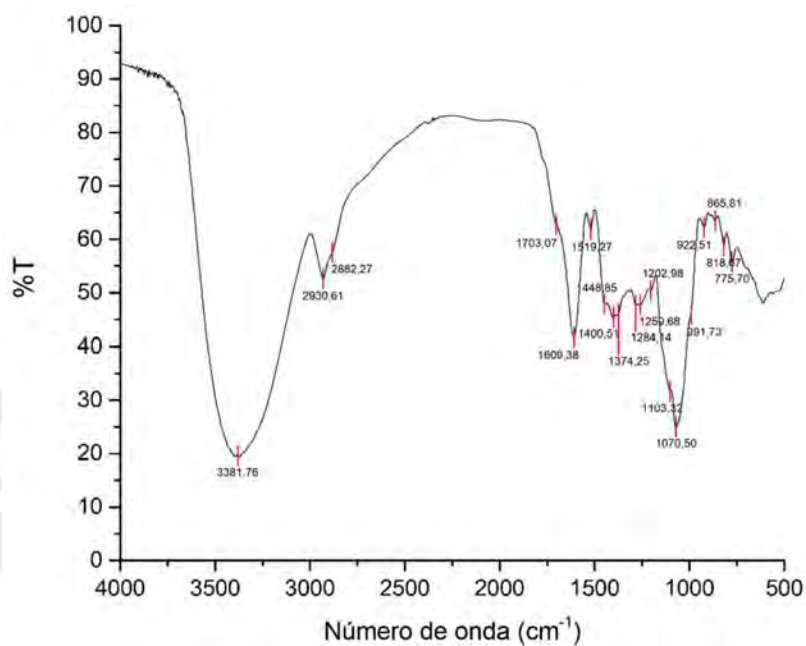


Figura 22. Espectro FT-IR del extracto de uña de gato (obtenido por transmisión con pastilla de KBr).

Los grupos funcionales caracterizados son los esperados de acuerdo a los compuestos que, por bibliografía, se saben que forman parte de la UT. La presencia de grupos OH a $3381,76\text{ cm}^{-1}$, por ejemplo, puede ser atribuida a los polifenoles abundantes en la UT. La señal del carbonilo en $1703,07\text{ cm}^{-1}$, proviene de los diversos ésteres, así como flavonoles¹⁰³ presentes en la uña de gato e, incluso, podría vincularse con el carbonilo de los alcaloides oxindólicos. En el caso de las señales de $1259,68$; $1202,98$; $1103,32$ y $1070,50\text{ cm}^{-1}$, se las asocia con estiramiento del enlace CO.¹⁰² Dichos enlaces CO están presentes en epicatequinas

y proantocianidinas. Para 1259,68 cm^{-1} , otra posible explicación es que se produce esa señal por el grupo carboxilo del ácido gálico y de otros residuos de carbohidratos.¹⁰³ Por último, la señal en 818,67 cm^{-1} corresponde a doblamiento fuera del plano del CH; mientras que la señal a 775,7 cm^{-1} corresponde al mismo tipo de doblamiento, pero del CH perteneciente al anillo de flavonoides.¹⁰³

Tabla 7. Identificación de señales en el espectro de FT-IR del UT.^{102,103}

Número de onda (cm^{-1})	Vibración asociada
3381,76	Estiramiento (v) del OH
2930,61 (2882,27 ^h)	Estiramiento (v) del CH alifático
1703,07 ^h	Estiramiento (v) del C=O
1609,38; 1519,27 y 1448,85 ^h	Estiramiento (v) del C=C aromático
1448,85	Combinación: Doblamiento de los CH aromático, estiramiento (v) de CO y deformación de C-OH
1259,68	Estiramiento (v) de COO ⁻ *
1259,68; 1202,98; 1103,32 ^h y 1070,50	Estiramiento (v) de CO
840-750: señales en 818,67 y 775,70	Doblamiento fuera del plano del CH aromático.

^h Señal correspondiente a un hombro en el espectro; * Posible interpretación¹⁰³

4.1.3.2. Determinación del contenido total de fenoles

La curva de calibración de ácido gálico se muestra en la figura 23. En ella podemos apreciar una tendencia lineal con un alto coeficiente de regresión ($R^2=0.9931$) que nos permite establecer, con confianza, un valor del contenido total de fenoles en la muestra en equivalentes de ácido gálico. Cada punto de la curva de calibración representa el promedio de cinco mediciones ($n=5$) y las barras de error representan la desviación estándar. Los valores en base a los que se estableció la curva se muestran en la tabla A6 de anexos.

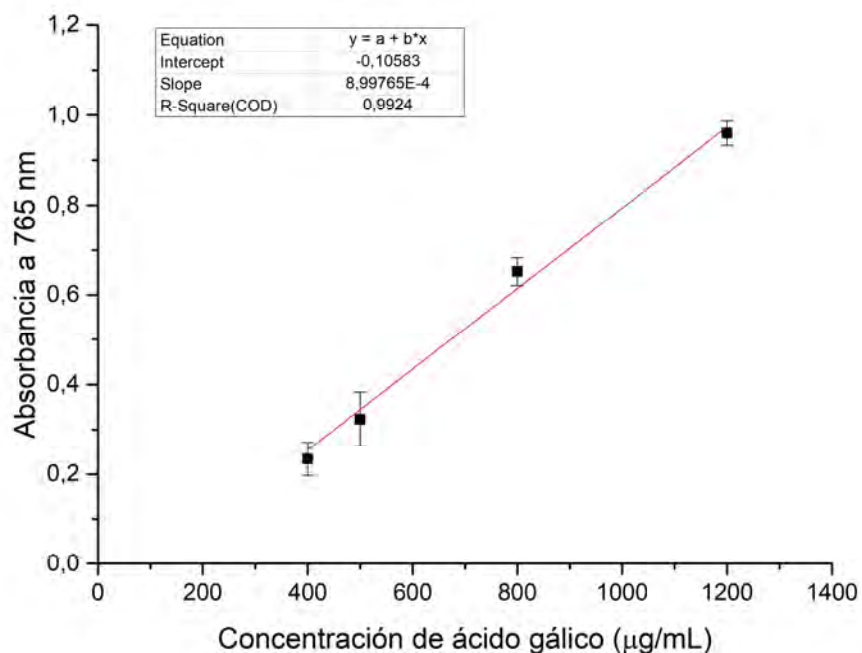


Figura 23. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación total de compuestos fenólicos por medio de FC. Medición por quintuplicado (n=5).

Al realizar la prueba de FC sobre la solución del extracto de UT, se observó la gradual aparición del color azulado que implica la presencia de los compuestos fenólicos. En la tabla 8 se presenta los valores de absorbancia obtenidos para la medición de la solución del extracto (medición por triplicado, n=3) así como el valor en equivalente de ácido gálico (GAE).

Tabla 8. Contenido total de compuestos fenólicos en una solución de concentración 3 mg/mL del extracto de UT.

	Valores medidos			Promedio	Desviación
	1era	2da	3ra		
UT (absorbancia)	0,411	0,406	0,431	0,416	0,013
Contenido fenólico (µg/mg) ¹				185,48	

¹ Medido en GAE que se expresa en µg de ácido gálico por mg de muestra.

Del valor obtenido de GAE se interpreta que 1 mg del extracto de UT tiene un contenido total de compuestos fenólicos equivalente a 185,48 μg de ácido gálico. Este valor es cercano al valor reportado en la literatura¹⁰⁴ sobre UT proveniente de la Amazonía brasileña, donde se establece un GAE de 153,51 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y, la pequeña diferencia que existe puede deberse a factores de ubicación geográfica y clima; pero, principalmente, a las diferencias en la metodología seguida (el solvente de extracción fue distinto), lo que genera variaciones del perfil químico de las muestras.

4.1.4. Elaboración y caracterización de las esponjas de alginato

4.1.4.1. Métodos para la elaboración de esponjas

Todos los métodos seguidos produjeron esponjas con características claramente diferentes entre ellas. En la tabla 9 se presenta para cada método, imágenes de las esponjas en distintas fases de su elaboración. Las fases presentadas son 3: antes del entrecruzamiento, después del entrecruzamiento y la esponja final (después del secado).

Como ya se estableció en la sección de metodología y como se observa en la tabla 9, sólo en los métodos A y B se entrecruzan las esponjas en estado sólido (cadenas del polímero inmovilizadas); en el primero, debido a que se ha liofilizado la muestra, y en el segundo, porque se realiza el entrecruzamiento con la solución congelada. Para los métodos C y D el entrecruzamiento se realiza sobre la solución directamente (por diálisis), por lo que no hay imágenes para la etapa previa al entrecruzamiento.

La información de la tabla 9 nos permite analizar las diferentes características que cada uno de los métodos ofrece para poder decidir cuál de todos produce la esponja final más adecuada en términos de tamaño, integridad, sensación al tacto, entre otras propiedades. Otras características importantes para la elección del método óptimo de elaboración de la esponja de alginato como, por ejemplo, la capacidad de absorción o la capacidad antioxidante, no son

analizadas en esta sección, sino más adelante como parte de las pruebas de hinchamiento y las pruebas de TEAC.

En lo que respecta a las dimensiones de las esponjas producidas, en las imágenes presentadas en la tabla 9 se puede apreciar que, para todos los métodos, ocurre una contracción del volumen de la esponja como consecuencia del proceso de secado —el tamaño de la esponja después del entrecruzamiento es mayor que el de la esponja final—. Sin embargo, a partir de las imágenes, tanto las esponjas finales A como C, presentan un tamaño significativamente mayor que el de las esponjas finales B y D, cuya contracción fue notable tanto en diámetro (d) como en altura (h). Además, parece ser que a través del método C se obtuvieron las esponjas de mayor tamaño, en lo que se refiere al diámetro y la altura.

Por dicho motivo, se decidió medir estas dimensiones para las esponjas A y C, para poder determinar con mayor precisión diferencias en los tamaños de estas dos muestras (decidimos centrarnos en las de mayor tamaño, por lo que no se consideró necesario medir las dimensiones de las esponjas B y D). También, se calculó un volumen aproximado para la esponja a partir de los valores promedio de altura y diámetro (se aproximó el volumen al de un cilindro). En la tabla 10 se presentan los valores promedio (a partir de 6 muestras, $n=6$) de diámetro y altura, así como el valor calculado del volumen (V).

Tabla 9. Imágenes de las esponjas elaboradas por medio de los métodos A-D en 3 etapas del proceso: antes del entrecruzamiento, después del entrecruzamiento y la esponja final (después del secado). Para el producto final se incluye una foto lateral de la esponja.

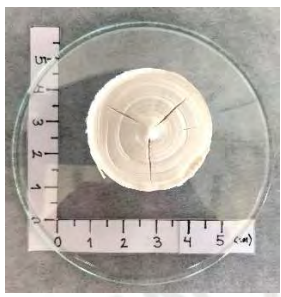

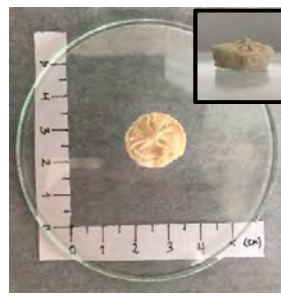
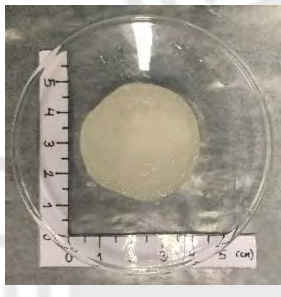
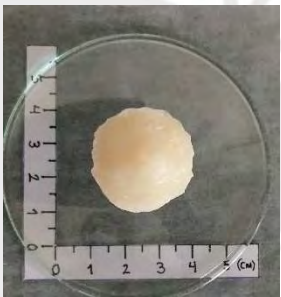
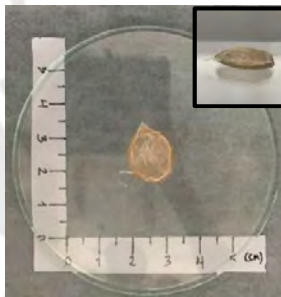
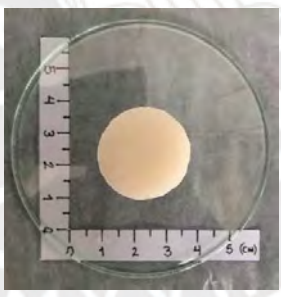
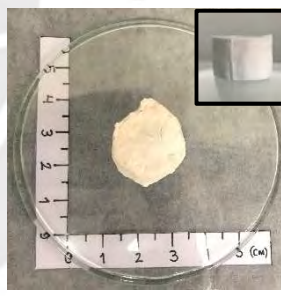
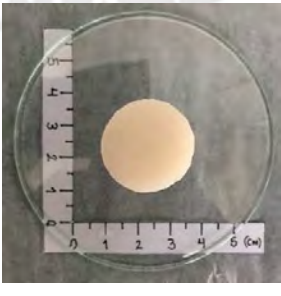
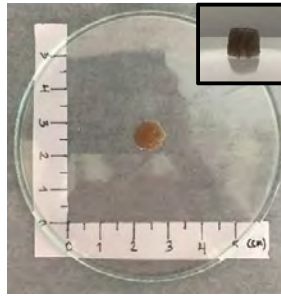
Método	Antes de entrecruzamiento	Después del entrecruzamiento	Esponja final (después del secado)
A (Liofilización → Entrecruz. a T.A.)			
B (Congelado - → Entrecruz. a 1°C)			
C (Diálisis → Liofilización)	-		
D (Diálisis → Secado a T.A.)	-		

Tabla 10. Dimensiones promedio (n=6) y volumen aproximado de las esponjas de los métodos A y C. Los valores diámetro (d) y la altura (h) fueron medidos y el volumen (V) fue calculado a partir de éstos.

Método	Concentración %ALG	Diámetro promedio (d) (mm)	Altura promedio (h) (mm)	Volumen promedio (V) (cm³)
A	1,5%	14,74 ± 1,18	6,22 ± 0,62	1,06 ± 0,18
	3%	16,23 ± 1,31	6,20 ± 0,48	1,28 ± 0,22
C	1,5%	20,09 ± 0,81	12,98 ± 0,54	4,11 ± 0,34
	3%	21,54 ± 0,82	13,39 ± 0,41	4,88 ± 0,38

A partir de los valores de volumen calculados, podemos confirmar que el método C ofrece esponjas cuyo volumen final es mayor que las del método A, como ya se había intuido a partir de las imágenes de la tabla 9. Asimismo, podemos aseverar que las esponjas obtenidas por medio del método C son más homogéneas, en término de dimensiones, que las del método A, como lo indica el menor valor de la incertidumbre reportada. Se debe señalar que, dentro de cada método, las diferencias de las dimensiones de la esponja de 1,5%ALG y 3%ALG son prácticamente nulas.

Tomando como referencia las medidas de las membranas del método A, definimos como “buen volumen” a un volumen con un valor mayor o igual a 1,06 cm³, valor que le corresponde a la esponja A 1,5%ALG. Se fija dicho valor como referencia porque las esponjas finales del método A presentan un volumen que consideramos suficientemente bueno como para que cumpla con las condiciones requeridas para el apósito que deseamos elaborar —un mayor volumen de esponja permite que pueda existir un mayor número de poros o, poros de un mayor volumen—. Evidentemente, las esponjas del método C, al tener un mayor volumen que las

esponjas A, poseen un “buen volumen”, mientras que las esponjas B y D no poseen un “buen volumen”.

Al evaluar la integridad y sensación al tacto de las esponjas obtenidas por los métodos A-D, identificamos que por el método A, la esponja obtenida luego de la liofilización presenta rajaduras radiales. Esta característica es inevitable para el método seguido, pues las rajaduras se generan por la rápida expansión que se produce cuando el agua de la solución se congela en nitrógeno líquido. Este hecho se verificó al reemplazar la solución de alginato por agua y observar que el hielo obtenido presentaba las mismas rajaduras. Se podría intentar cambiar el material del contenedor por uno que no se torne rígido a la temperatura de N₂ líquido, de manera que permita la expansión natural de la solución, pero no se encontró uno que pudiera ser utilizado (se probó un molde de silicona que no solucionó el problema). También se observa que el proceso de entrecruzamiento altera la forma de la esponja A, además de que ensancha las rajaduras de ésta. La esponja final reduce su volumen de manera considerable, probablemente porque a pesar de estar entrecruzadas, segmentos de las cadenas húmedas de alginato pueden moverse durante el lento proceso de secado a temperatura ambiente. Aun así, el producto final conserva la forma inicial y un “buen volumen”, de acuerdo a lo definido previamente. En lo que refiere a la sensación al tacto, la esponja final es dura y rígida.

En el caso del método B, no hay ninguna observación para la etapa previa al entrecruzamiento; sin embargo, en la esponja entrecruzada se observaron dos características particulares que diferían mucho de la esponja del método A: a) una textura estriada de la superficie de ésta y, b) una consistencia más suave y endeble. Para estudiar mejor las diferencias presentadas por la esponja B, se decidió tomar una de las esponjas sin entrecruzar (congeladas) y liofilizarla. La esponja liofilizada presentaba, por sectores, “planos” de alginato orientados en paralelo y perpendiculares al plano de la base, lo que generaba un patrón similar a las hojas de un libro. Esta orientación explica la textura estriada observada en la esponja B

entrecruzada, así como la consistencia endeble, pues entre los “planos” de alginato se crean espacios que facilitan la compresión de la membrana. En la figura 24 se muestra la esponja B liofilizada, así como el patrón de “planos” que se forma en ella.

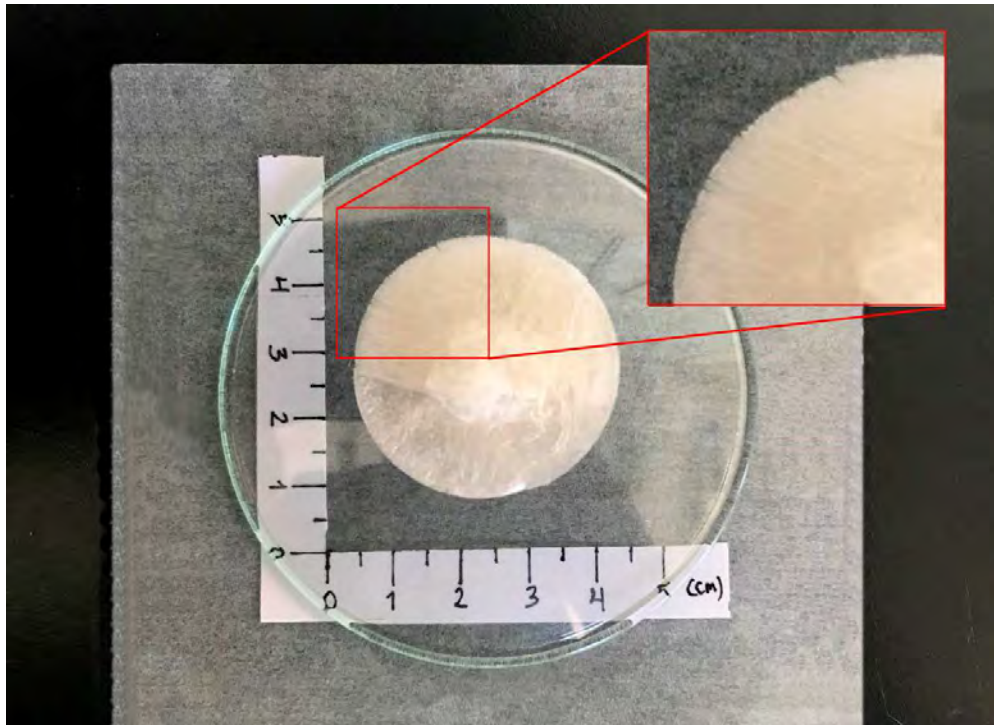


Figura 24. Esponja B liofilizada. Se presenta un acercamiento sobre un sector en el que se presenta el patrón de “planos” paralelos.

Se cree que la formación de los “planos” paralelos de alginato se debe al proceso de congelamiento lento que ocurre para el método B. Mientras que en el método A, el congelamiento es muy rápido (por el nitrógeno líquido) y las cadenas de alginato conservan la distribución aleatoria que mostraban en solución, para el método B, el congelamiento lento permite la formación de cristales de agua que reordenan las cadenas. El patrón estriado se generaría luego de la eliminación de agua durante el proceso de secado.

Al dejar secar la esponja B entrecruzada a temperatura ambiente, se observa que ésta colapsa completamente. Por ello, la esponja B final se muestra completamente plana (ver foto

lateral en tabla 9) y no muestra el “buen volumen” previamente nombrado. Es evidente que la esponja obtenida por este método no es apropiada para su uso como apósito de heridas, algo que se confirmará luego, con la prueba de hinchamiento.

Para los métodos C y D, la esponja obtenida luego del entrecruzamiento, aún con agua, es idéntica, pues se produce siguiendo el mismo procedimiento (la diálisis de la solución de alginato en la solución de entrecruzamiento). Esta esponja húmeda se caracteriza por su textura lisa y consistencia gelatinosa, que presenta elasticidad sin ser endeble. Además, como la esponja A, ésta es opaca. En la tabla 9 se puede observar que la esponja entrecruzada no posee rajaduras, lo cual ofrece una ventaja en términos de la integridad de la membrana para su eventual uso como apósito. La liofilización permite que la esponja final del método C apenas muestre cambios con respecto a la obtenida al terminar la diálisis, es decir, no presenta rajaduras ni una reducción considerable en el volumen. En contraste, la esponja final del método D, presenta una reducción extrema de volumen, además de una elevada dureza y rigidez (es la membrana más dura de todas las obtenidas).

En la tabla 11 se muestran las masas promedio (a partir de 6 muestras, $n=6$) de las esponjas elaboradas por los diferentes métodos, acompañadas de las respectivas desviaciones estándar. En esta tabla, se han incluido los valores tanto para las esponjas de concentración 1,5%ALG como las de 3%ALG. En la tabla 9 se presentan imágenes de las esponjas para las dos concentraciones estudiadas, puesto que visualmente son muy similares.

Tabla 11. Masas promedio y desviación estándar de las esponjas finales de los métodos A-D. Para cada método y concentración de alginato (1,5%ALG y 3%ALG) se midieron 6 muestras (n=6).

Métodos	[Alg] = 1,5%	[Alg] = 3%
A	0,1588 ± 0,0067 g	0,3003 ± 0,0138 g
B	0,1478 ± 0,0074 g	0,3016 ± 0,0117 g
C	0,1570 ± 0,0091 g	0,2737 ± 0,0097 g
D	0,1577 ± 0,0084 g	0,2699 ± 0,0071 g

De acuerdo a las características presentadas por las esponjas y en base a un análisis centrado en el concepto de “buen volumen” y en la integridad, se concluye que los mejores candidatos para su uso como apósitos son las esponjas A y C. Los métodos B y D se propusieron porque se deseaba determinar si era posible elaborar esponjas sin necesidad de liofilizar las muestras, algo que permitiría ahorrar recursos y haría que el método sea más accesible al no requerirse el equipo de liofilización; sin embargo, en ambos casos los resultados no fueron los esperados. Entre los dos métodos A y C, el segundo parece presentar la ventaja en términos de integridad, al no presentar rajaduras y además de presentar una mayor conservación del volumen.

Las razones por las que las esponjas A y C son las mejores candidatas para la elaboración de apósitos es que, en su presentación final, conservan un “buen volumen” con respecto a su versión entrecruzada; además de que presentan una buena consistencia e integridad. La conservación de volumen puede sugerir a su vez, una mejor conservación de la estructura porosa de las esponjas, algo que se evalúa en este trabajo, de manera indirecta, con la prueba de hinchamiento. También podría evaluarse la estructura porosa, de una manera más directa, por medio de la microscopia SEM.

Otras propiedades como la sensación al tacto, dureza, la resistencia a ser quebrado o deformado, aspectos que hasta ahora se han abordado de forma subjetiva (por ejemplo, cuando se señala que la muestra es dura o suave, elástica o rígida, etc.), podrían evaluarse de manera objetiva mediante diversas pruebas mecánicas. Así, la dureza o suavidad de las esponjas podría medirse a través de pruebas de indentación por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés)¹⁰⁵ o mediante un equipo analizador de texturas, que además de dureza, permite evaluar la resistencia a la deformación, la rigidez, la adhesión, entre otras propiedades.¹⁰⁶ La resistencia a la deformación también se puede medir mediante una máquina universal (denominada en inglés como Universal Test Machine), que realiza ensayos de tracción y compresión.¹⁰⁷ Todas estas mediciones, que no se realizan en este estudio, ayudarían a tener un mejor concepto de la fortaleza de los apósitos producidos.

Los valores de las mediciones a partir de las que se obtuvieron los promedios de masa de la tabla 11, así como los promedios de diámetro y altura de la tabla 10, se incluyen en el anexo (en las tablas A7 y A8, respectivamente).

4.1.4.2. Caracterización de las esponjas

4.1.4.2.3. Prueba de hinchamiento de las esponjas a pH 5,5

Si bien el análisis realizado sobre las características observables de la esponja —como su volumen, su integridad y su sensación al tacto— y el análisis de los poros en su interior son de gran importancia para caracterizar la esponja; el comportamiento que ésta muestra al contacto con fluidos es igual de necesario para caracterizar adecuadamente al apósito. Se debe considerar que toda herida produce un exudado, por lo que la esponja estará en contacto con fluidos por periodos prolongados. Además, como se estableció previamente, es importante que un apósito pueda retirar el exceso de exudado para promover la curación de la herida, algo que precisamente se evalúa por medio del hinchamiento de la esponja.

En la figura 25, mostrada a continuación, se presentan las curvas de porcentaje de hinchamiento de las esponjas en una simulación de un medio sin herida (es decir, de piel sana), medio representado por el buffer de pH 5,5. En el anexo (Tabla A9) se presenta una tabla con los valores de porcentaje de hinchamiento para cada esponja en los diferentes tiempos.

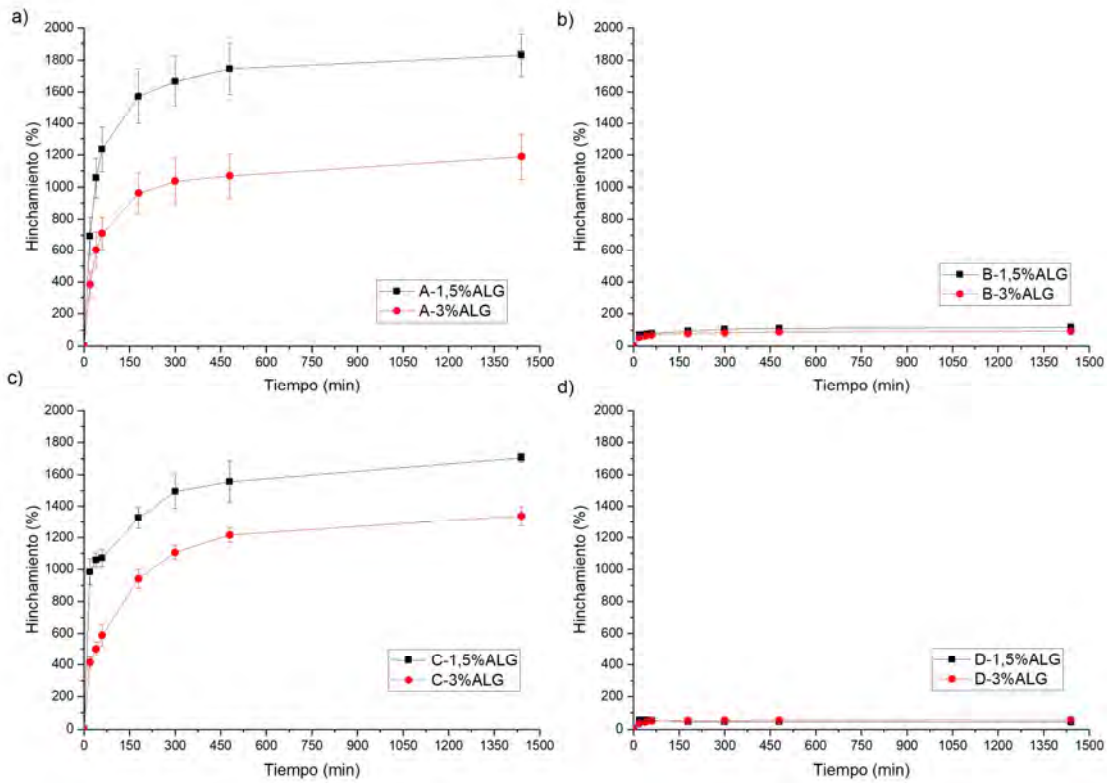


Figura 25. Curvas de porcentaje de hinchamiento de las esponjas obtenidas por el método A-D (mostradas en a) - d), respectivamente) en un medio de pH 5,5. Cada punto corresponde al promedio de 3 muestras (n=3).

Antes de analizar el caso de cada esponja por separado, hay algunas tendencias generales que se pueden establecer para las curvas presentadas. En primer lugar, se puede observar que, para un mismo método, los porcentajes de hinchamiento de las esponjas de 1,5%ALG muestran, por regla general, un mayor hinchamiento que las muestras de 3%ALG. Esto se debe a que, dado que todas las esponjas se elaboraron en base al mismo volumen de solución, las de

mayor concentración serán más densas que las de 3% de concentración. En consecuencia, al eliminar el solvente (por liofilización o por secado a temperatura ambiente) las esponjas menos densas presentarán un mayor volumen total de poros en su interior, que a su vez puede contener un mayor volumen de líquido. Una segunda observación general es que el porcentaje de hinchamiento aumenta rápidamente al inicio de la prueba y continúa aumentando con el transcurrir del tiempo, pero a un ritmo cada vez más lento, mostrando un comportamiento asintótico. La explicación radica en que la entrada de la solución en la esponja en un inicio es rápida porque, además de que el alginato es hidrofílico, todos los poros de la esponja están disponibles para contener el fluido, pero a medida que estos son llenados, la entrada de la solución es más lenta porque hay menos espacios disponibles en el interior de la membrana. La asíntota que muestra la curva se debe a que la esponja tiene una capacidad máxima de absorción. El único caso que no cumple con estas observaciones es el método D, en el que se observa que el porcentaje de hinchamiento de la esponja 3%ALG es mayor que la de 1,5%ALG a partir del minuto 180 en adelante: además de que, en partes de la curva, el hinchamiento disminuye. Posiblemente, la explicación de estas anomalías se relacione con la elevada densidad de las esponjas D, que parecen presentar pocos poros por la gran disminución de volumen que ocurrió en la etapa de secado.

Luego de haber analizado las tendencias generales presentadas en las curvas de porcentaje de hinchamiento, pasamos a comparar los resultados de los diferentes métodos. Como se observa en las curvas de porcentaje de hinchamiento, las esponjas A y C son las que poseen una mayor capacidad para absorber la solución usada en la prueba, pues presentan porcentajes de hinchamiento en el rango de 1200% a 1800%. En contraste, las esponjas B y D presentan un porcentaje de hinchamiento de más de un orden de magnitud inferior, en el rango 60-120%. Estos resultados apoyan lo establecido en base a las fotos de las esponjas presentadas en la tabla 9, en las que se observó que las esponjas elaboradas por los métodos B y D (secadas

a temperatura ambiente) presentaban una gran reducción de volumen luego de secarse, lo que afecta el tamaño y la cantidad total de poros. Por esta razón, el hinchamiento presentado por estos dos métodos es bajo.

Las esponjas A y C presentan una capacidad de absorción similar entre sí, puesto que sus valores de porcentaje de hinchamiento son muy cercanos. Si bien el método A presenta curvas levemente por encima de las curvas del método C, las barras de error no permiten establecer con certeza que las esponjas del método A absorben mejor la solución de la prueba. En todo caso, lo que se puede establecer es que ambos métodos poseen una capacidad de absorción elevada y similar. Diferente es el caso de las esponjas B y D, donde se puede discernir claramente que las segundas absorben menos. Como ya se dijo, probablemente se deba a la alta densidad de las esponjas D, que no se compara con ninguna de las otras muestras.

Una última observación importante se relaciona con la integridad mostrada por las esponjas durante la prueba. El estado hinchado de las esponjas las hace más endebles, salvo en el caso de la esponja D, en el que no se observó diferencias por su bajo grado de hinchamiento. Las esponjas del método B fueron las más afectadas por el proceso de hinchamiento, seguidas por las esponjas A. En el caso de las esponjas B, esto se debe a la estructura de “planos” paralelos, discutida previamente, que hacía que sean menos resistentes a la compresión, incluso en su estado liofilizado. Para las esponjas A, el principal riesgo provenía de las grietas que presentan.

4.1.4.2.4. Prueba de hinchamiento de las esponjas en simulación de un medio con herida

El resultado de la prueba de hinchamiento de las esponjas en el medio sin herida nos permite elegir a las esponjas del método C como las indicadas para evaluar la absorción de fluido, pero esta vez en la situación simulada en la que hay una herida. Esta prueba es de suma importancia, pues es la situación en la que se le daría más uso al potencial apósito. Se elige la esponja C sobre la A porque las dos mostraron una elevada capacidad de absorción de fluido,

pero las esponjas C representan, no solo el método más novedoso, sino las membranas con menos fisuras.

En la figura 26 se observa la curva de porcentaje de hinchamiento de las esponjas de concentraciones 1,5%ALG y 3%ALG del método C en la SWF de pH 7,5. También se incluye en dicha imagen las curvas del método C, pero a pH 5,5 (en gris claro). Al igual que para el caso simulado del medio de piel sana, observamos que la esponja de concentración 1,5%ALG presenta un porcentaje de hinchamiento superior en comparación con la esponja 3%ALG. Como ya se señaló, la posible explicación es la menor densidad de las esponjas de menor concentración. Comparando las curvas de hinchamiento con las de la figura 25 c), podemos notar que los valores de porcentaje de hinchamiento mostrados para el pH de 7,5 son bastantes cercanos a los presentados para el pH de 5,5 hasta los 300 min, pero después de ese tiempo, el hinchamiento mostrado en el SWF es un poco menor que para la simulación de la piel sana. Por ejemplo, si comparamos el valor máximo alcanzado (minuto 1440), observamos que el valor promedio a pH 7,5 de porcentaje de hinchamiento para las esponjas 1,5%ALG y 3%ALG son, respectivamente, 1415% y 1183%, mientras que, para el pH de 5,5, dichos valores son de 1705% y 1338%. Esta disminución en el porcentaje de hinchamiento para tiempos avanzados de la prueba podría deberse a una degradación de las esponjas frente a la prolongada exposición al SWF, aunque también podría deberse a la naturaleza de la solución usada, pues el SWF contiene albúmina. Esta proteína podría alojarse en los poros internos de la membrana y, a medida que avanza la medición, obstruir la entrada de fluido adicional a la esponja, por lo que se estaría alcanzando una saturación de la capacidad de hinchamiento de la esponja. Esta explicación explicaría por qué las curvas de la figura 26 parecen alcanzar valores asintota, a diferencia de las curvas de la figura 25 c).

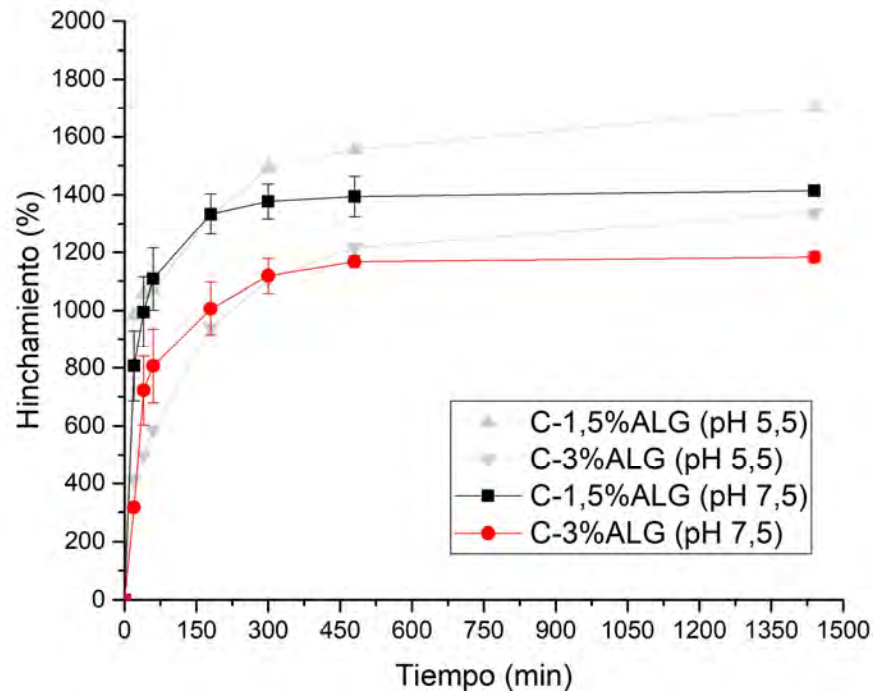


Figura 26. Curva de porcentaje de hinchamiento de las esponjas obtenidas por el método C en el SWF de pH 7,5. En gris claro se muestran las curvas de las esponjas del método C, pero a pH 5,5. Cada punto corresponde al promedio de 3 muestras (n=3).

No se pudo determinar cuál es el motivo por el que, para la simulación del caso de la herida, se presentan porcentajes de hinchamiento menores para los tiempos de 480 y 1440 minutos. En todo caso, las esponjas del método C muestran una capacidad de absorción elevada en el caso de la presencia de una herida, que supera el 1000% de hinchamiento, lo que las califica como potenciales apósitos que puedan absorber adecuadamente el exudado de una herida. En la tabla A10 del anexo se presentan los valores con los que se obtuvo la figura 26.

4.1.5. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) del extracto de UT y evaluación de la capacidad antioxidante de la esponja cargada con el extracto

4.1.5.1. Obtención de la curva de calibración de trolox

A partir de los porcentajes de inhibición promedio (medición por triplicado, n=3) medidos para los estándares de trolox (valores incluidos en la tabla A11 del anexo), se generó

un gráfico que permitió monitorear el efecto inhibitor del trolox a diferentes concentraciones en un lapso de 60 minutos, como se muestra en la figura 27. A partir de dicha figura se observa que el trolox alcanza su porcentaje de inhibición máximo de manera rápida, por lo que, luego del minuto de iniciada la medición, el valor se mantiene constante para todas las concentraciones del estándar. Además, se observa que las mediciones son precisas, como lo muestra las barras de error (deviación estándar).

Para cada tiempo —del minuto 1 en adelante— se elaboró una curva de calibración de trolox, las cuales se incluyen en el anexo (Figura A2). Como se deduce de la figura 27, las curvas de calibración obtenidas para cada tiempo fueron prácticamente idénticas. En la figura 28 se presenta como ejemplo la curva de calibración del estándar para el minuto 30, en la que se observa que el ajuste lineal presenta un R^2 de 0,9954. La curva es similar a la reportada en el artículo usado como referencia para la realización de la medición.⁸⁸

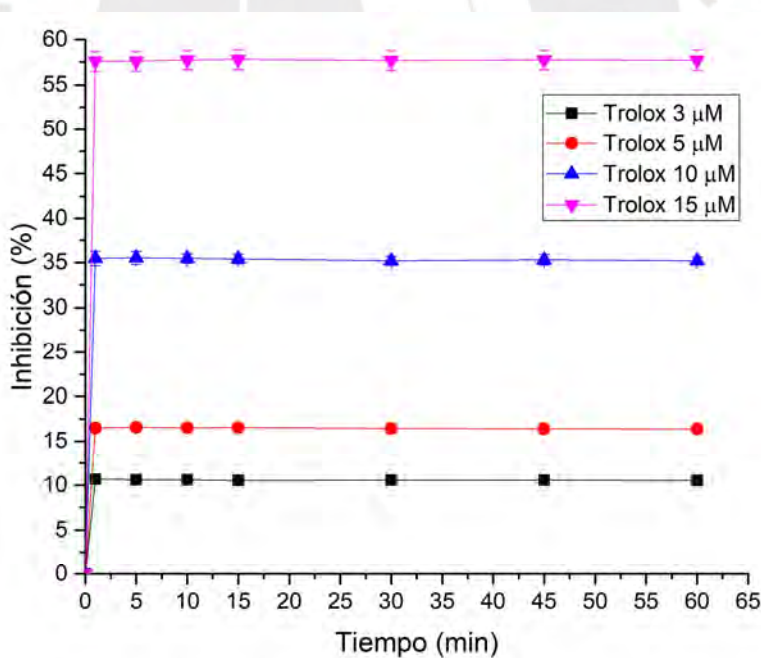


Figura 27. Curva de porcentaje de inhibición promedio (medición por triplicado, $n=3$) de los estándares de trolox en el tiempo.

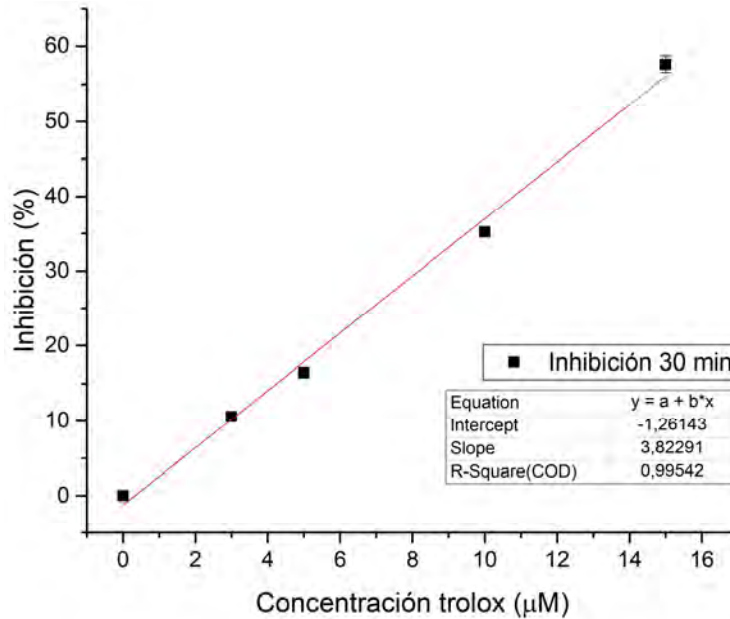


Figura 28. Curva de calibración de trolox a los 30 min de medición. Cada punto representa el promedio de 3 soluciones independientes. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.1.5.2. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) del extracto de UT

El comportamiento cinético del extracto de UT es muy diferente al del trolox. Si comparamos el porcentaje de inhibición del extracto en función del tiempo con el del estándar, podemos observar que el extracto no alcanza un valor máximo y constante de inhibición luego del minuto de medición, pero aumenta en el tiempo, como lo muestra la figura 29, elaborada a partir de la tabla A12 del anexo. Además, parece que la tasa de aumento de la inhibición, depende de la concentración del extracto: el extracto de UT de concentración 0,5 mg/mL presenta un incremento del % inhibición menor que el extracto de UT de 1,5 mg/mL. Por ejemplo, entre del minuto 1-5, la muestra de menor concentración muestra un incremento de aproximadamente 2,5% de inhibición, mientras que la de mayor concentración, un aumento de más del 5%.

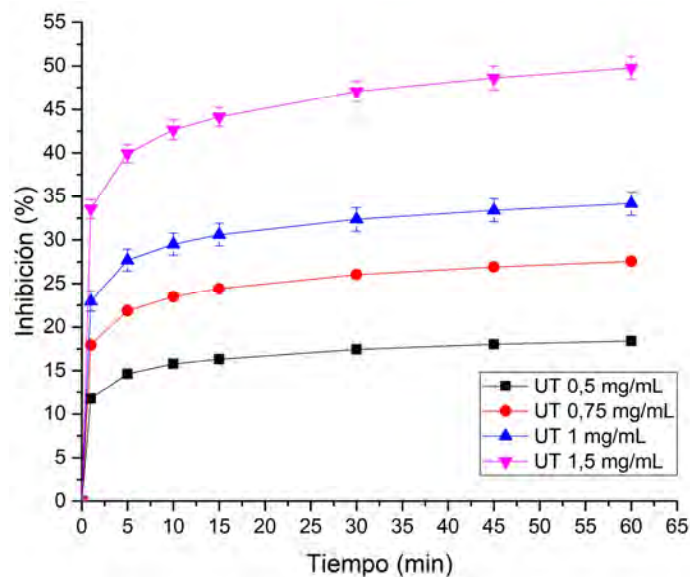


Figura 29. Curva de porcentaje de inhibición de las soluciones del extracto de UT en el tiempo.

Como se puede interpretar de la anterior figura, si se elaboran curvas del % inhibición vs concentración de la muestra para cada uno de los tiempos de medición, estas curvas serán diferentes entre ellas, pues el porcentaje inhibición incrementa en el tiempo de acuerdo a la gráfica. Esto difiere mucho del caso del trolox, para el que, las curvas para los distintos tiempos eran prácticamente idénticas. Esta diferencia de comportamiento cinético entre el trolox (estándar) y el extracto de UT, genera que la TEAC determinada por medio de ABTS sea dependiente del tiempo, algo común para muestras ricas en polifenoles.¹⁰⁸ La dependencia del TEAC con el tiempo es la razón por la que más adelante, se presentará un valor de capacidad antioxidante distinto para cada uno de los tiempos de medición (ver tabla 12).

Para poder observar la dependencia del tiempo de las curvas de % inhibición del extracto de UT de manera más clara, en la figura 30 se presentan curvas de inhibición vs concentración de UT para cada uno de los tiempos, así como un gráfico del mismo tipo, pero con todas las curvas superpuestas. En los gráficos de la figura 30, cada punto es la inhibición promedio obtenida de 3 mediciones (n=3). Asimismo, las barras de error son la desviación estándar.

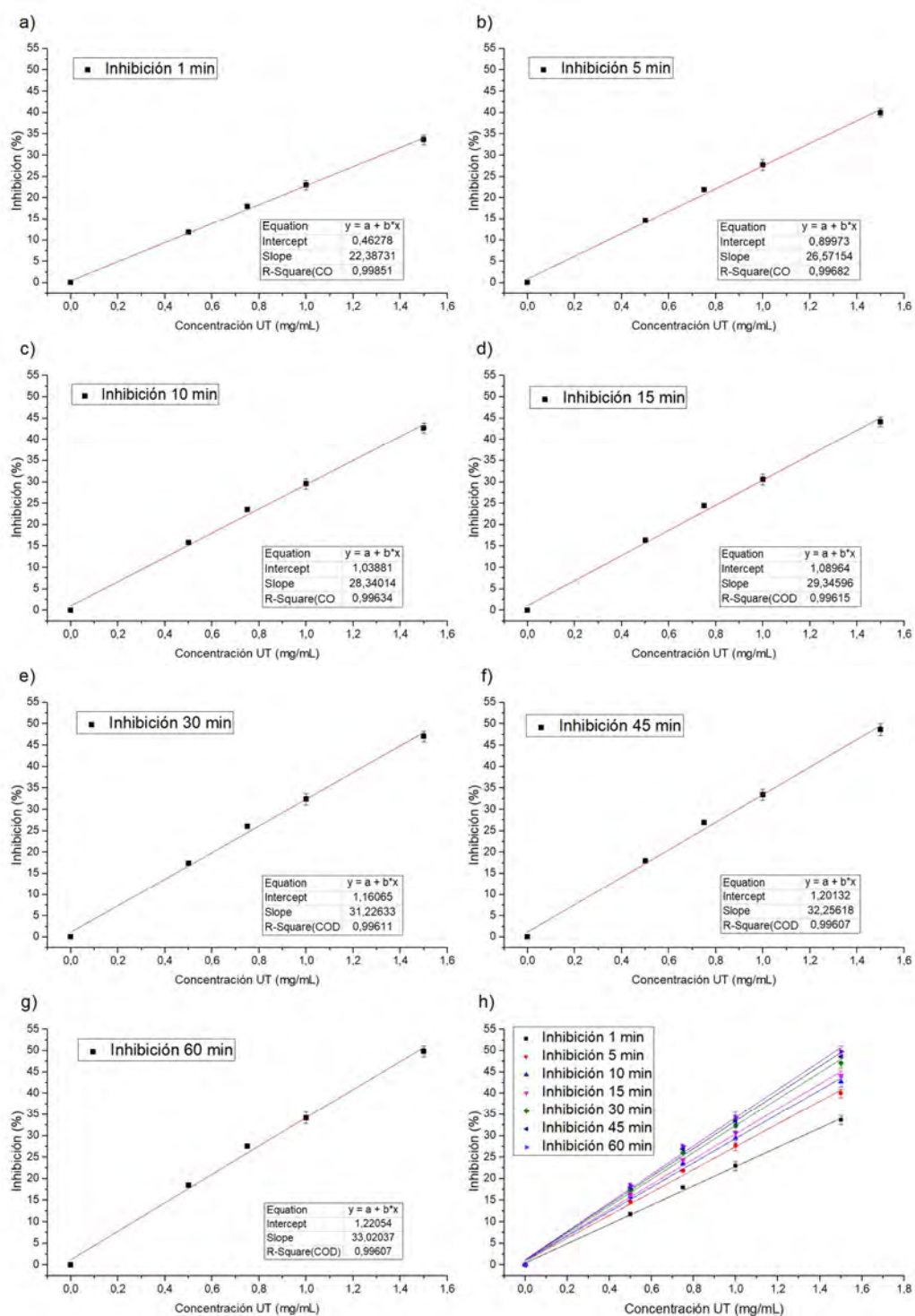


Figura 30. Curvas de % inhibición de diferentes concentraciones de UT para los distintos tiempos de medición: **a)** 1 min, **b)** 5 min, **c)** 10 min, **d)** 15 min, **e)** 30 min, **f)** 45 min y **g)** 60 min. En **h)** se muestran dichas curvas superpuestas. Cada punto es el promedio de 3 mediciones (n=3).

Se observa que, para cada tiempo de medición, se presenta una tendencia lineal diferente y, por ende, valores de porcentaje de inhibición distintos. En todos los casos las regresiones lineales tienen un ajuste con R^2 mayores a 0,996. Además, las mediciones fueron precisas.

A partir de los valores de % de inhibición se determina la TEAC. Ésta se define para compuestos antioxidantes como la concentración de trolox en mM que produce un porcentaje de inhibición del mismo valor que el generado por una concentración 1 mM del compuesto antioxidante. Para mezclas antioxidantes, no es posible determinar la concentración en mM, por lo que se hace el cálculo para una concentración de 1 mg/mL. Además, para el caso del trolox se presentará el valor en μM , pues esa es la concentración para la que se trabajó. En la tabla 12 se presentan los valores de TEAC para los tiempos de 1 a 60 minutos. Se debe considerar para el cálculo, que la concentración de los estándares de trolox se definió para el volumen final en la celda de UV, por lo que debe hacerse la transformación de la concentración de las soluciones de UT, también para el volumen final en la celda.

Tabla 12. Capacidad antioxidante en equivalente de trolox (TEAC) del extracto de UT para diferentes tiempos de medición.

Tiempo (min)	TEAC¹	Desviación estándar
1	637,5657	29,4199
5	762,3633	33,2312
10	810,1905	33,5832
15	839,6702	33,9758
30	888,6628	35,8444
45	914,9771	35,1751
60	936,0543	35,8862

¹Medido en μM de trolox/ mg/mL de extracto de UT

4.1.5.3. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de UT, la esponja de alginato y de la esponja cargada con UT

La determinación de la capacidad antioxidante, completa la evaluación de la esponja de alginato obtenida. En la figura 31 se presenta la curva de porcentaje de inhibición de la esponja 3%ALG obtenida mediante el método C, en la que la medición se realizó por triplicado. Se eligió la del método C para esta determinación porque esta esponja fue la que mejor resultados produjo en términos de conservación de volumen e integridad y capacidad de hinchamiento; además de ser un método novedoso para la elaboración de esponjas de alginato.

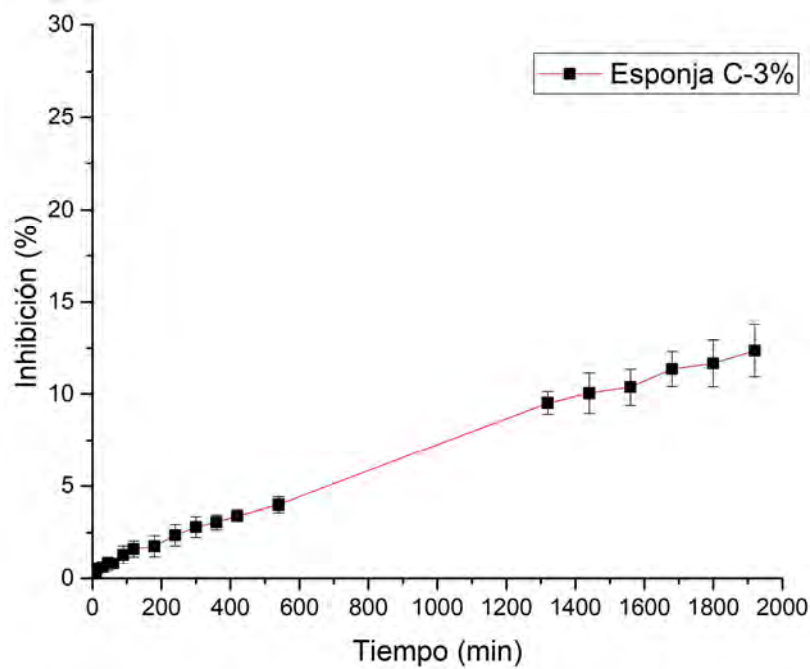


Figura 31. Curva de porcentaje de inhibición de la esponja de alginato 3%ALG obtenida por el método C. Cada punto es el promedio de 3 mediciones ($n=3$) y se muestra la desviación estándar como barra de error.

Como se observa en la gráfica, las esponjas C presentan una capacidad antioxidante aún sin agregar el extracto de UT, pues se alcanza un máximo de 12% de inhibición hacia el final de la prueba. El comportamiento antioxidante se puede describir como lineal y lento, pues el

máximo se alcanza luego de 32 horas, cuando, después de una hora de iniciada la prueba, ni siquiera se había sobrepasado el 1% de inhibición.

La capacidad antioxidante presentada por la esponja de alginato fue, al principio, inesperada pues este polisacárido no muestra dicho comportamiento en pruebas realizadas sobre películas de alginato (se realizó una prueba de manera previa, aunque por un periodo más corto, 60 minutos. Ver figura A3 del anexo). La explicación para la actividad mostrada por la esponja de alginato podría radicar en la elevada área superficial propia de la esponja (debido a su porosidad). Un estudio centrado en el tratamiento térmico de alginato (en su forma sólida) a 140°C, muestra que la actividad antioxidante de éste aumenta a medida que la masa molar promedio del alginato disminuye. Dicha prueba se realizó, al igual que en este trabajo, por medio de ABTS, y explica que el aumento de la actividad antioxidante podría tener relación con la mayor cantidad de grupos reductores que se presentan en los extremos de las cadenas (grupos hidroxilo y carbonilo), que precisamente aumentan a menor masa molar.¹⁰⁹ En nuestro caso, la elevada área superficial podría permitir que una mayor cantidad de extremos de cadenas de alginato reactivos, entren en contacto con la solución de ABTS, lo que hace que se favorezca la reducción del ABTS.

La capacidad antioxidante mostrada a consecuencia de la elevada área superficial propia de la esponja también podría explicar por qué la inhibición de ABTS es lenta, pues la reducción del ABTS requiere que la solución ingrese a la esponja y se transporte a través del sistema de poros de ésta, lo que implica factores de difusión, que son muy diferentes en una película.

Antes de evaluar la capacidad antioxidante de la esponja cargada con UT, es necesario evaluar la capacidad antioxidante del extracto de UT por separado. En la figura 32 se puede observar el porcentaje de inhibición de 125 μ L de la solución 3 mg/mL de la UT. Se puede observar que el comportamiento guarda concordancia con los perfiles de porcentaje de inhibición obtenidos previamente para las soluciones de UT para la determinación de TEAC:

un rápido aumento del porcentaje de inhibición en los primeros minutos de medición, cuya tasa de aumento va disminuyendo a medida que avanza la reacción. La curva parece acercarse a una asíntota, aunque continúa incrementando sutilmente.

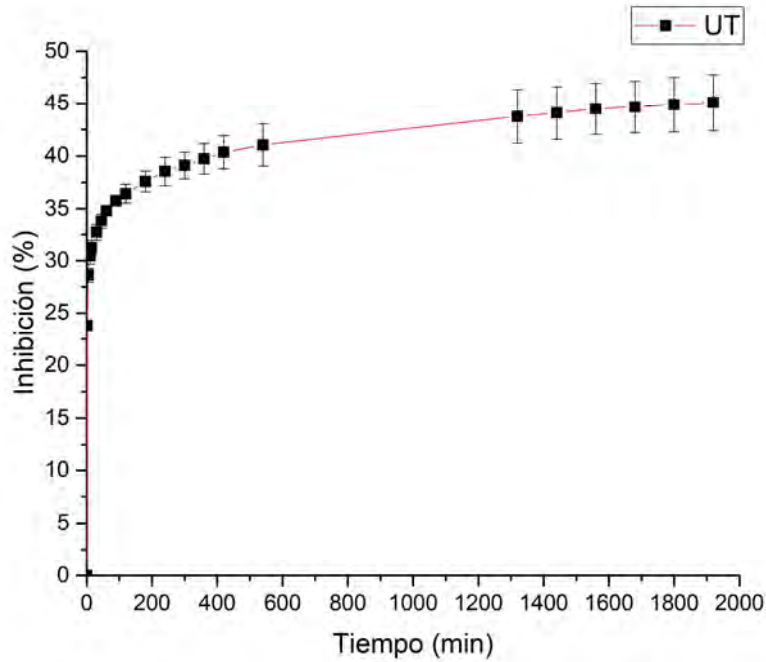


Figura 32. Curva de porcentaje de inhibición para UT. Cada punto es el promedio de 3 mediciones ($n=3$) y se muestra la desviación estándar como barra de error.

Con las curvas de porcentaje de inhibición de la solución de UT y de la esponja de alginato, podemos analizar de manera más completa la capacidad antioxidante de la esponja cargada (figura 33).

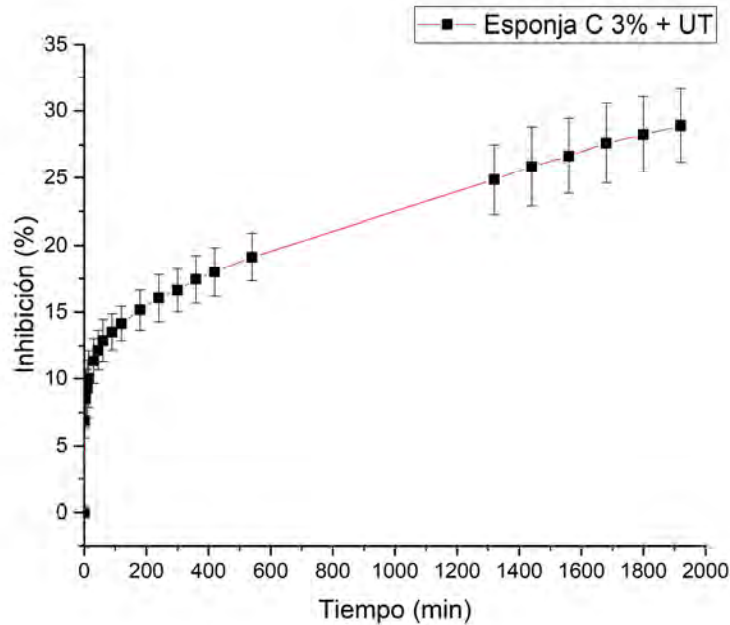


Figura 33. Curva de porcentaje de inhibición de la esponja 3%ALG obtenida por el método C, cargada con 125 µL de una solución 3 mg/mL de UT. Cada punto es el promedio de 3 mediciones (n=3) y se muestra la desviación estándar como barra de error.

La esponja cargada con el extracto de UT muestra una elevada capacidad antioxidante, mucho mayor a la de la esponja sola, pero menor que la mostrada por la solución de UT. Además, la forma de la curva no es lineal, a diferencia de la curva de la esponja, y se asemeja más a la curva de inhibición del extracto de UT de la figura 32, al menos en la actividad inicial, con un aumento elevado y rápido de la inhibición. Así, en los primeros 5 minutos se observa un incremento de aproximadamente 8,5% en la inhibición, un aumento mucho mayor que el presentado por la esponja sin extracto (que no superaba el 0,5% de inhibición). Sin embargo, para tiempos de medición más avanzados (por ejemplo, después de los 60 minutos), la curva de inhibición adquiere características similares a la curva de la figura 30, en la que el incremento es lineal y sostenido.

Con los resultados de la capacidad antioxidante de la esponja cargada con UT, podemos comprobar que la capacidad antioxidante del extracto pudo ser incorporada a la esponja de alginato, potenciando de esta manera, el carácter antioxidante de la membrana. Sin embargo,

el comportamiento de la esponja cargada no puede ser considerado como la suma de las capacidades antioxidantes de los componentes que la conforman. La forma de la curva de la esponja cargada con UT de la figura 33, ciertamente parece ser fruto de la combinación de la curva del extracto de UT y de la recta de la esponja sin extracto; sin embargo, en términos de magnitud, los valores de inhibición mostrados en la gráfica de la figura 33, están claramente por debajo de dicha suma.

Probablemente, la causa de que no se alcancen los valores de porcentaje de inhibición altos mostrados por el extracto de UT sea el mismo proceso de carga del extracto en la esponja. Luego de agregado el extracto, la membrana debe secar para poder realizar la medición. Al inicio se planteó secar la esponja cargada por 24 horas, a temperatura ambiente (propuesta inicial para la carga de la esponja), pero al hacerlo se observó una contracción considerable en términos del volumen de la esponja, situación que se vio reflejada en una actividad antioxidante inusual, menor incluso que la reportada para la esponja sin UT. La contracción observada en la propuesta inicial de carga de la esponja se explica por la presencia de agua en la solución del extracto pues, como se observó durante la elaboración de las esponjas, un proceso de secado prolongado y a temperatura ambiente suele tener ese efecto sobre el volumen de las membranas. Disminuir el tiempo de secado, de las 24 horas a los 30 minutos de la propuesta final, minimiza el efecto perjudicial del proceso de secado sobre el volumen de las esponjas, pero es posible que aún se produzcan leves cambios en la estructura porosa de la membrana, lo que podría influenciar a que la capacidad antioxidante propia de la esponja disminuya.

También se debe considerar que el proceso de carga no es perfecto y, alguna cantidad del extracto puede no haber sido absorbido por la esponja. Incluso, la disminución del porcentaje de inhibición presentado por la esponja cargada podría deberse a una reacción entre el extracto de UT y el alginato de la esponja.

De todas maneras, a pesar de que la capacidad antioxidante de la esponja cargada sea menor que el de la suma de sus componentes, es evidente el gran aumento del potencial antioxidante que presenta por encima de la esponja sin extracto. Además, la esponja cargada presenta un comportamiento antioxidante alto y que se sostiene mejor en el tiempo que, por ejemplo, el extracto de UT solo: mientras que, en el caso del extracto, el % inhibición parece acercarse a una asíntota a medida que el tiempo transcurre, la esponja cargada muestra un % inhibición que sigue creciendo después de las 32 horas. En la figura 34, se muestran las curvas de porcentaje de inhibición de la esponja de alginato, del extracto de UT y de la esponja cargada con el extracto, superpuestas, para que se pueda apreciar de mejor manera las diferencias en las magnitudes de porcentaje de inhibición, así como la combinación de las características de las curvas del extracto de UT y de la esponja de alginato que presenta la esponja cargada.

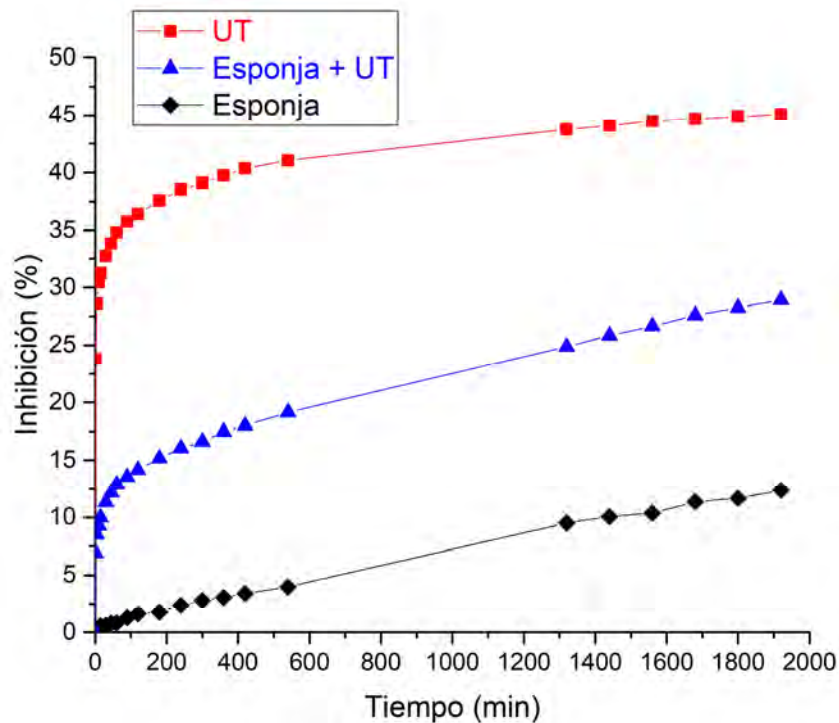


Figura 34. Superposición de las curvas de porcentaje de inhibición del extracto de UT, de la esponja de %3ALG y de la esponja de %3ALG cargada con UT. Cada punto es el promedio de 3 mediciones (n=3)

En el anexo, se presentan las tablas (Tablas A13-A15) con los valores de inhibición promedio con los que se obtuvieron las gráficas de las figuras graficaron las figuras 31, 32 y 33.



5. Conclusiones y recomendaciones

Se logró obtener un extracto de UT, cuya solución de concentración de 3 mg/mL presenta un contenido total de compuestos fenólicos de 185,48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de equivalentes de ácido gálico, un valor cercano al reportado en la literatura.

También se evaluó la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) del extracto de UT en el tiempo, por medio de la prueba de ABTS. El extracto, al ser una mezcla compleja de compuestos, muestra una capacidad antioxidante que aumenta con el tiempo (cada compuesto diferente puede tener una diferente cinética de reacción con el ABTS). Los valores obtenidos para tiempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos fueron, respectivamente, de $637,5657 \pm 29,4199$; $762,3633 \pm 33,2312$; $810,1905 \pm 33,5832$; $839,6702 \pm 33,9758$; $888,6628 \pm 35,8444$; $914,9771 \pm 35,1751$ y $936,0543 \pm 35,8862$ μM de trolox/ mg/mL del extracto de UT.

Se estudiaron 4 métodos (A-D) diferentes para la elaboración de esponjas de alginato de concentraciones de 1,5% y 3% w/v de alginato (identificadas como 1,5%ALG y 3%ALG, respectivamente). El método A se basó en una patente,⁹³ mientras que los métodos B-D fueron propuestas originales con diferencias en el proceso de enfriamiento, entrecruzamiento y secado. Para las esponjas producidas por estos 4 métodos se logró evaluar su capacidad de absorción de fluidos, así como analizar su aplicabilidad como apósitos considerando aspectos de volumen e integridad. En términos de volumen, sólo las esponjas A y C presentaron un volumen elevado, pues las esponjas B y D se contrajeron demasiado durante el secado. En términos de integridad, la esponja A presentó rajaduras, la esponja B colapsó, quedando completamente plana, y la esponja D, se tornó rígida, dura y compacta. La esponja C presentó buena integridad.

La capacidad de absorción de fluidos se evaluó mediante la medición del % hinchamiento de las esponjas en un medio de pH 5,5, que simulaba la situación de una piel sana. Para todos

los casos, el % hinchamiento registrado para las esponjas de concentración 3%ALG fue menor al registrado para su versión de 1,5%ALG, esto debido a la mayor densidad de las primeras, que dejaba menos volumen disponible para la absorción del fluido. Entre los métodos evaluados, tanto la esponja A como la C presentaron % de hinchamiento elevados, que permiten su uso como apósitos. Las esponjas A de 1,5%ALG y 3%ALG presentaron porcentajes de hinchamiento máximo promedio de 1800% y 1200% aproximadamente; mientras que las esponjas C, de 1700% y 1300%, respectivamente.

También se evaluó la capacidad de absorción (nuevamente por medio del porcentaje de hinchamiento) de las esponjas de concentración 1,5%ALG y 3%ALG del método C, pero para la simulación de un ambiente de herida a pH de 7,5. Los porcentajes de hinchamiento medidos fueron muy cercanos a los del caso de pH 5,5, aunque para tiempos de medición avanzados, el porcentaje de hinchamiento fueron menores que en el caso del ambiente de piel sana. Las esponjas C de 1,5%ALG y 3%ALG presentaron porcentajes de hinchamiento máximos promedio de 1415% y 1183%, aproximadamente. Se concluye que las esponjas C muestran una buena capacidad de absorción de exudado de heridas.

Por tanto, de los 4 métodos estudiados para la elaboración de esponjas, sólo dos de ellos (métodos A y C) produjeron membranas aplicables para su uso como apósitos. A pesar de eso, todos los métodos generaron esponjas con características visuales y propiedades estructurales diferentes entre ellas, lo que le da valor a su estudio como una evaluación de las diversas posibilidades para la obtención de materiales con características particulares.

Como parte de este estudio, también se evaluó la capacidad antioxidante de la esponja C de concentración 3%, sin y con extracto de UT, así como la del extracto solo. El porcentaje de inhibición de la esponja sin carga aumenta linealmente con el tiempo, alcanzando un valor máximo de alrededor de 12,5% luego de 32 horas. En el caso de la esponja cargada con UT, su capacidad antioxidante combina el aporte del extracto de UT (inhibición rápida) y de la esponja

(sostenida en el tiempo). La forma de la curva del porcentaje de inhibición en este caso, es semejante a una combinación de la curva del % inhibición del extracto de UT y de la esponja sin carga.

Este estudio permitió realizar un avance en el camino por obtener un apósito de heridas en base de una esponja de alginato que contenga las propiedades antioxidantes de la UT. Se sugiere continuar su desarrollo con la realización de pruebas adicionales, en especial, pruebas mecánicas y biológicas de las esponjas, así como un análisis por SEM, que permita evaluar mejor las características porosas de las esponjas obtenidas.



6. Bibliografia

1. Ebling, J. G. Integument. *Enciclopædia Britannica* (2017). Disponible en: <https://www.britannica.com/science/integument>. (Accedido: 17.^a octubre 2019)
2. OpenStax. The Integumentary System. en *Anatomy & Physiology* 181-214 (2016).
3. Montagna, W. & Parakkal, P. *The Structure and Function of Skin*. (Academic Press, 1974).
4. Gerald, S., Lazarus, Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G. & Robson, M. C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair Regen.* **2**, 165-170 (1994).
5. Percival, J. Classification of wounds and their management. *Surgery* **20**, 114–117 (2002).
6. Harding, K. G. B. M. J., Morris, H. L. & Patel, G. K. Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. *Br. Med. J.* **324**, 160-163 (2002).
7. Yager, R., Diegelmann, R. F., Cohen, I. K. & Nwomeh, B. C. The Non-Healing Wound : Mechanisms and Dressings. en 64-75 (2001).
8. Tejiram, S., Kavalucas, L., Shupp, J. & Barbul, A. Wound Healing. en *Wound Healing Biomaterials, Volume 1: Therapies and Regeneration* (ed. Ågren, M.) 3-40 (Woodhead Publishing, 2016).
9. Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E. & Eccleston, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J. Pharm. Sci.* **97**, 2892-2923 (2008).
10. Borda, L. J., Macquhae, F. E. & Kirsner, R. S. Wound Dressings: A Comprehensive Review. *Curr. Dermatol. Rep.* **5**, 287-297 (2016).
11. Dhivya, S., Padma, V. V. & Santhini, E. Wound dressings - a review. *Biomedicine* **5**, 24-28 (2015).
12. Murray, R. Z., West, Z. E., Cowin, A. J. & Farrugia, B. L. Development and use of

- biomaterials as wound healing therapies. *Burn. Trauma* **7**, (2019).
13. Dabiri, G., Damstetter, E. & Phillips, T. Choosing a Wound Dressing Based on Common Wound Characteristics. *Adv. Wound Care* **5**, 32-41 (2014).
 14. Rehm, B. H. A. *Alginates: Biology and Applications*. (Springer, 2009).
 15. Sehgal, R., Mehta, A. & Gupta, R. Alginates: General Introduction and Properties. en *Alginates: Applications in the Biomedical and Food Industries*. (ed. Ahmed, S.) 3-20 (Scrivener Publishing LLC, 2019).
 16. Skjak-Braek, G., Grasdalen, H. & Larsen, B. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr. Res.* **15**, 239-250 (1986).
 17. Kidambi, S. P., Sundin, G. W., Palmer, D. A., Chakrabarty, A. M. & Bender, C. L. Copper as a signal for alginate synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Env. Microbiol* **61**, 2172-2179 (1995).
 18. Sabra, W. A., Zeng, A. P., Lünsdorf, H. & Deckwer, W. D. Effect of Oxygen on Formation and Structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and Its Role in Protecting Nitrogenase. *Appl. Env. Microbiol* **66**, 4037-4044 (2000).
 19. Stanford, E. C. C. A New Substance Obtained from Some of the Commoner Species of Marine Algae. *Am. J. Pharm.* **55**, (1883).
 20. Jensen, A. Present and future needs for algae and algal polysaccharides. *Hydrobiologia* **260**, 15 – 23 (1993).
 21. Şanlı, O. & Solak, E. K. Controlled release of naproxen from sodium alginate and poly(vinyl alcohol)/sodium alginate blend beads crosslinked with glutaraldehyde. *J. Appl. Polym. Sci* **112**, 2057-2065 (2009).
 22. Cao, Y., Shen, X. C., Chen, Y., Guo, J., Chen, Q. & Jiang, X. Q. pH-Induced self-assembly and capsules of sodium alginate. *Biomacromolecules* **6**, 2189–2196 (2005).
 23. Antil, R., Hooda, R., Sharm, M. & Dahiya, P. Alginate-Based Biomaterials for Bio-

- Medical Applications. en *Alginates: Applications in the Biomedical and Food Industries*. (ed. Ahmed, S.) 179-204 (Scrivener Publishing LLC, 2019).
24. Aderibigbe, B. & Buyana, B. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics* **10**, 42 (2018).
 25. Wiegand, C., Heinze, T. & Hipler, U. C. Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate. *Wound Repair Regen* **17**, 511-521 (2009).
 26. Koehler, J., Brandl, F. P. & Goepferich, A. M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *Eur. Polym. J.* **100**, 1-11 (2018).
 27. Segal, H. C., Hunt, B. J. & Gilding, K. The effects of alginate and non-alginate wound dressings on blood coagulation and platelet activation. *J. Biomater. Appl.* **12**, 249-257 (1998).
 28. Balakrishnan, B., Mohanty, M., Fernandez, A. C., Mohanan, P. V. & Jayakrishnan, A. Evaluation of the effect of incorporation of dibutyl cyclic adenosine monophosphate in an in situ-forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* **27**, 1355-1361 (2006).
 29. Brownlee, I. A., Seal, C. J., Wilcox, M., Dettmar, P. W. & Pearson, J. P. Applications of Alginates in Food. en *Alginates: Biology and Applications* (ed. Rehm, B. H. A.) 211-228 (Springer, 2009).
 30. Grasdalen, H., Larsen, B. & Smidrod, O. A P.M.R Study of the Composition and Sequence of Uronate residues in Alginate. *Carbohydr. Res.* **68**, 23-31 (1979).
 31. Knudsen, N. R., Ale, M. T., Fatemeh, A. & Meyer, A. S. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp. *Food Hydrocoll* **71**, 236-244 (2017).

32. Kupper, F. C., Kloareg, B., Guern, J. & Potin, P. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol* **125**, 278-291 (2001).
33. Smidsrød, O., Glover, R. M. & Whittington, S. G. The relative extension of alginates having different chemical composition. *Carbohyd Res* **27**, 107-118 (1973).
34. Haug, A. Dissociation of Alginic Acid. *Acta Chem Scand* **15**, 950-952 (1961).
35. Orive, G., Carcaboso, A. M., Hernandez, R. M., Gascon, A. R. & Pedraz, J. L. Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. *Biomacromolecules* **6**, 927-931 (2005).
36. Andersen, T., Strand, B. L., Formo, K., Alsberg, E. & Christensen, B. E. Alginates as biomaterials in tissue engineering. en *Carbohydrate Chemistry* (eds. Rauter, A. P. & Lindhorst, T.) 227-258 (The Royal Society of Chemistry, 2011).
37. Smidsrød, O. & Skjak-Bræk, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* **8**, 71-78 (1990).
38. Haug, A. & Smidsrod, O. Effect of divalent metals on properties of alginate solutions. II. Comparison of different metal ions. *Acta Chem. Scand.* **19**, 341-351 (1965).
39. Draget, K. I. Alginates. en *Handbook of Hydrocolloids* (eds. Phillips, G. O. & Williams, P. A.) 807-828 (Woodhead Publishing, 2009).
40. Haug, A. & Smidsrød, O. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. *Acta Chem Scand* **24**, 843-854 (1970).
41. Haug, A. Affinity of some divalent metals to different types of alginates. *Acta Chem. Scand* **15**, 1794-1795 (1961).
42. Donati, I. & Paoletti, S. Material Properties of Alginates. en *Alginates: Biology and Applications* (ed. Rehm, B. H. A.) 1-53 (Springer, 2009).
43. Becker, T. A. & Kipke, D. R. Flow properties of liquid calcium alginate polymer injected through medical microcatheters for endovascular embolization. *J. Biomed.*

- Mater. Res.* **61**, 533-540 (2002).
44. Kong, H. J., Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Decoupling the dependence of rheological/mechanical properties of hydrogels from solids concentration. *Polymer (Guildf)*. **43**, 6239-6246 (2002).
 45. Kashima, K. & Masanao, I. Advanced membrane material from marine biological polymer and sensitive molecular-size recognition for promising separation technology. *en Advancing Desalination* (ed. Ning, R. Y.) 3-36 (InTech, 2012).
 46. Reakasame, S. & Boccaccini, A. R. Oxidized Alginate-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* **19**, 3-21 (2018).
 47. Lee, K. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* **37**, 106-126 (2012).
 48. Rogalsky, A. D., Kwon, H. J. & Lee-Sullivan, P. Compressive Stress–Strain Response of Covalently Crosslinked Oxidized-Alginate/N-Succinyl-Chitosan Hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **99A**, 367-375 (2011).
 49. Li, X., Xu, A., Xie, H., Yu, W., Xie, W. & Ma, X. Preparation of Low Molecular Weight Alginate by Hydrogen Peroxide Depolymerization for Tissue Engineering. *Carbohydr. Polym.* **79**, 660-664 (2010).
 50. Rowley, J. A., Madlambayan, G. & Mooney, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* **20**, 45-53 (1999).
 51. Sun, J. & Tan, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials (Basel)*. **6**, 1285-1309 (2013).
 52. ASTM International. Standard Test Method for Determining the Chemical Composition and Sequence in Alginate by Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR). *ASTM 1-5* (2012). doi:10.1520/F2259-10R12E01. Copyright
 53. Filippov, M. P. & Kohn, R. Determination of composition of alginates by infrared

- spectroscopic method. *Chem. Zvesti* **28**, 817-819 (1974).
54. Salomonsen, T., Jensen, H. M., Stenbæk, D. & Engelsen, S. B. Rapid determination of alginate monomer composition using Raman spectroscopy and chemometrics. en *Gums and Stabilisers for the Food Industry* (eds. Williams, P. A. & Phillips, G. O.) 543-551 (The Royal Society of Chemistry, 2008).
55. Young, R. & Lovell, P. Frictional Properties of Polymers in Solution. en *Introduction to Polymers* 299-308 (CRC Press, 2011).
56. Shapiro, L. & Cohen, S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* **18**, 583-590 (1997).
57. Rabbany, S. Y., Pastore, J., Yamamoto, M., Miller, T., Rafii, S., Aras, R. & Penn, M. Continuous delivery of stromal cell-derived factor-1 from alginate scaffolds accelerates wound healing. *Cell Transplant.* **19**, 399-408 (2010).
58. Zhang, J., Yang, Z., Li, C., Dou, Y., Li, Y., Thote, T., Wang, D. A. & Ge, Z. Cells behave distinctly within sponges and hydrogels due to differences of internal structure. *Tissue Eng Part A* **19**, 2166-2175 (2013).
59. Risdale, C. E. A revision of *Mitragyna* and *Uncaria* (Rubiaceae). *Blumea* **24**, 43-100 (1978).
60. Heitzman, M. E., Neto, C. C., Winiarz, E., Vaisberg, A. J. & Hammond, G. B. Ethnobotany , phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* **66**, 5-29 (2005).
61. Navarro-hoyos, M., Alvarado-Corella, D. & Moreira-Gonzalez, I. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts from *Uncaria tomentosa* Bark and Leaves. *Antioxidants* **7**, (2018).
62. Lock, O. & Callo, N. La «uña de gato»: su estudio científico. *Rev. Química* **5**, 47-53 (1991).

63. Gomes, I., Bertoni, B. & Soares, A. *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* an agronomic history to be written. *Ciência Rural* **46**, 1401-1410 (2016).
64. Keplinger, K., Laus, G., Wurm, M., Dierich, M. P. & Teppner, H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 23-34 (1999).
65. De Jong, W., Melnyk, M., Lozano, L. A., Rosales, M. & Garcia, M. Uña de gato: fate and future of a Peruvian forest resource. *Cent. Int. For. Res.* 1-14 (1999).
66. Goncalves, C., Dinis, T. & Batista, M. T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* **66**, 89-98 (2005).
67. Sandoval, M., Okuhama, N. N., Zhang, X. J., Condezo, L. A., Lao, J., Angeles, F. M., Musah, R. A., Bobrowski, P. & Miller, M. J. S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* **9**, 325-337 (2002).
68. Valadeau, C., Alban, J., Sauvain, M. & Francis, A. The rainbow hurts my skin : Medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *J. Ethnopharmacol* **127**, 175-192 (2010).
69. Laus, G., Brossner, D. & Keplinger, K. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* **45**, 855-860 (1997).
70. Condori, E., Kaiser, S., de Resende, P., Pittol, V., Ramos, A. & González, G. Chemical composition variability in the *Uncaria tomentosa* (cat's claw) wild population. *Quim. Nov.* **38**, 378-386 (2015).
71. Aquino, R., De Feo, V., De Simone, F., Pizza, C. & Cirino, G. Plant metabolites. New compounds and anti- inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J. Nat. Prod.* **54**, 453-459 (1991).

72. Kitajima, M., Hashimoto, K., Yokoya, M., Takayama, H., Sandoval, M. & Aimi, N. Two new nor-triterpene glycosides from peruvian “Uña de Gato” (*Uncaria tomentosa*). *J. Nat. Prod.* **66**, 320-323 (2003).
73. Dewick, P. The Shikimate pathway: Aromatic amino acids and phenylpropanoids. en *Medicinal natural products: a biosynthetic approach* 137-186 (John Wiley & Sons, 2009).
74. Morabito, G., Miglio, C., Peluso, I. & Serafini, M. Fruit Polyphenols and Postprandial Inflammatory Stress. en *Polyphenols in Human Health and Disease* (eds. Watson, R., Preedy, V. & Zibadi, S.) 1107-1126 (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-398456-2.00085-2
75. Murkovic, M. Phenolic Compounds. en *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (ed. Caballero, B.) 4507-4514 (2003). doi:10.1201/b17244-10
76. Navarro, M., Sánchez-Patán, F., Murillo, R., Martín-Álvarez, P., Zamora, W., Monagas, M. & Bartolomé, B. Phenolic assesment of *Uncaria tomentosa* L. (cat’s claw): Leaves, stem, bark and wood extracts. *Molecules* **20**, 22703-22717 (2015).
77. Falkiewicz, B. & Łukasiak, J. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel.]—a review of published scientific literature. *Case Rep. Clin. Pract. Rev.* **2**, 305– 316 (2001).
78. Sheng, Y., Pero, R. W., Amiri, A. & Bryngelsson, C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Res.* **18**, 3363–3368 (1998).
79. Aguilar, J. L., Rojas, P., Marcelo, A., Plaza, A., Bauer, R., Reininger, E., Klaas, C. A. & Merfort, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol* **81**, 271–276 (2002).
80. Shahidi, F., Janitha, P. K. & Wanasundara, P. D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev.*

- Food Sci. Nutr.* **32**, 67–103 (1992).
81. Navarro, M., Zamora, W., Quesada, S., Azofeifa, G., Alvarado, D. & Monagas, M. Fractioning of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa*. Composition and structure-bioactivity relationship. *Antioxidants* **6**, (2017).
 82. Aquino, R., De Simone, F., Pizza, C., Conti, C. & Stein, M. L. Plant metabolites. Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda plattipoda*. *J. Nat. Prod.* **52**, 679–685 (1989).
 83. Dietrich, F., Kaiser, S., Rockenbach, L., Figueiró, F., Bergamin, L. S., Cunha, F. M. da, Morrone, F. B., Ortega, G. G. & Battastini, A. M. O. Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line. *Food Chem. Toxicol.* **67**, 222-229 (2014).
 84. Yano, S., Horiuchi, H., Horie, S., Aimi, N., Sakai, S. & Watanabe, K. Ca²⁺ Channel Blocking Effects of Hirsutine, an Indole Alkaloid from *Uncaria* Genus, in the Isolated Rat Aorta. *Planta Med.* **57**, 403-405 (1991).
 85. Wu, L. X., Gu, X. F., Zhu, Y. C. & Zhu, Y. Z. Protective effects of novel single compound, Hirsutine on hypoxic neonatal rat cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **650**, 290-297 (2011).
 86. Huang, D., Boxin, O. U. & Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841-1856 (2005).
 87. Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L. & Jacobo-Velázquez, D. A. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **5**, 5990-5999 (2013).
 88. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* **26**, 1231-1237 (1999).

89. Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Zanetti, F. & Paoletti, S. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydr. Polym.* **15**, 171-193 (1991).
90. ASTM International. Standard Test Method for Determining the Molar Mass of Sodium Alginate by Size Exclusion Chromatography with Multi-angle Light Scattering Detection (SEC-MALS) 1. *ASTM 1-6* (2008). doi:10.1520/F2605-08E01.2
91. Alvarenga-Venutolo, S., Rosales-López, C., Chinchilla, L. S., Arrieta, R. M. & Cascante, F. A. Seasonality effect on the composition of oxindole alkaloids from distinct organs of *Uncaria tomentosa* from the Caribbean region of Costa Rica. *Phytochemistry* **151**, 26-31 (2018).
92. Waterhouse, A. Determination of Total Phenolics. en *Handbook of Food Analytical Chemistry, Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components* (eds. Wrolstad, R. et al.) **2**, 463-470 (John Wiley & Sons, 2004).
93. Han, S.-M., Kim, I.-S. & Han, N.-K. Alginate Sponge and Preparation Method Thereof. *17* (2004).
94. Rippke, F., Schreiner, V. & Schwanitz, H. J. The Acidic Milieu of the Horny Layer: New Findings on the Physiology and Pathophysiology of Skin pH. *Am. J. Clin. Dermatol.* **3**, 261-272 (2002).
95. Schneider, L. A., Korber, A., Grabbe, S. & Dissemond, J. Influence of pH on Wound-Healing: A New Perspective for Wound-Therapy? *Arch. Dermatol. Res.* **298**, 413-420 (2007).
96. Greener, B., Hughes, A. A., Bannister, N. P. & Douglass, J. Proteases and pH in Chronic Wounds. *J. Wound Care* **14**, 59-61 (2005).
97. Boateng, J. S., Pawar, H. V. & Tetteh, J. Polyox and Carrageenan Based Composite Film Dressing Containing Anti-microbial and Anti-inflammatory Drugs for Effective

- Wound Healing. *Int. J. Pharm.* **441**, 181-191 (2013).
98. Grasdalen, H. High-field, ¹H-N.M.R. Spectroscopy of Alginate: Sequential Structure and Linkage Conformations. *Carbohyd Res* **118**, 255-260 (1983).
99. Leal, D., Matsuhira, B., Rossi, M. & Caruso, F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* **343**, 308-316 (2008).
100. Sartori, C., Finch, D. S., Ralph, B. & Gilding, K. Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy. *Polymer (Guildf)*. **38**, 43-51 (1997).
101. Ayarza León, J. L. Extracción y caracterización de alginato de sodio procedente del alga parda *Macrocystis* sp. (Pontificia Universidad Católica del Perú, 2015).
102. Kaiser, S., Carvalho, Â. R., Pittol, V., Peñaloza, E. M., de Resende, P. E., Soares, F. L. F. & Ortega, G. G. Chemical differentiation between *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* by LC-PDA, FT-IR and UV methods coupled to multivariate analysis: A reliable tool for adulteration recognition. *Microchem. J.* **152**, 104346 (2020).
103. Konai, N., Raidandi, D., Pizzi, A. & Meva'a, L. Characterization of *Ficus sycomorus* tannin using ATR-FT MIR, MALDI-TOF MS and ¹³C NMR methods. *Eur. J. Wood Wood Prod.* **75**, 807-815 (2017).
104. Azevedo, B. C., Roxo, M., Borges, M. C., Peixoto, H., Crevelin, E. J., Bertoni, B. W., Contini, S. H. T., Lopes, A. A., França, S. C., Pereira, A. M. S. & Wink, M. Antioxidant Activity of an Aqueous Leaf Extract from *Uncaria tomentosa* and Its Major Alkaloids Mitraphylline and Isomitraphylline in *Caenorhabditis elegans*. *Molec* **24**, 3299 (2019).
105. Brandl, F., Sommer, F. & Goepferich, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials* **28**, 134-146 (2007).
106. Schmitt, A., Rödel, P., Anamur, C., Seeliger, C., Imhoff, A. B., Herbst, E., Vogt, S.,

- Van Griensven, M., Winter, G. & Engert, J. Calcium alginate gels as stem cell matrix - making paracrine stem cell activity available for enhanced healing after surgery. *PLoS One* **10**, 1-18 (2015).
107. Ma, R., Wang, Y., Qi, H., Shi, C., Wei, G., Xiao, L., Huang, Z., Liu, S., Yu, H., Teng, C., Liu, H., Murugadoss, V., Zhang, J., Wang, Y. & Guo, Z. Nanocomposite sponges of sodium alginate/graphene oxide/polyvinyl alcohol as potential wound dressing: In vitro and in vivo evaluation. *Compos. Part B Eng.* **167**, 396-405 (2019).
108. Magalhães, L. M., Barreiros, L., Reis, S. & Segundo, M. A. Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high-throughput determination of total antioxidant capacity of food products. *J. Food Compos. Anal.* **33**, 187-194 (2014).
109. Habibi-Kelishomi, Z., Goliaei, B., Mahdavi, H., Nikoofar, A., Rahimi, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Mamashli, F. & Bigdeli, B. Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment. *Food Chem.* **196**, 897-902 (2016).

7. Anexos

Tabla A1. Lista de compuestos presentes en la *Uncaria tomentosa* y clasificación que les corresponde. La tabla se elaboró en base a la información recopilada de Heitzman: 2004, salvo donde se indique lo contrario.

Nombre del compuesto	Tipo de compuesto
Mitrafilina	POA
isomitrafilina	POA
Pteropodina (Uncarina C)	POA
Especiofilina (Uncarina D)	POA
Isopteropodina (Uncarine E)	POA
Uncarina F	POA (Sandoval, pilarski, condori, Laus-kep1997)
Uncarina F N-óxido	POA
Rinchofilina	TOA
Rinchofilina N-óxido	TOA
Isorinchofilina	TOA
Isorinchofilina N-óxido	TOA
Rotundifolina	TOA
Isorotundifolina	TOA
Corinoxeina	TOA (keplinger1999)
Isocorinoxeina	TOA (keplinger1999)
Hirsuteina	Alcaloide indólico (Laus-kep1997)
Hirsutina N-óxido	Alcaloide indólico
Hirsutina	Alcaloide indólico (Laus-kep1997)
Rhynchophine	Alcaloide indólico (parece con cinámico)
Estrictosamida	Alcaloide indólico
5 α -carboxiestrictosidina	Alcaloide indólico (glicosilado)
3,4-dehydro-5(S)-5-carboxiestrictosidina	Alcaloide indólico (glicosilado)-kitajima
Akuammigina	Alcaloide indólico (Laus-kep1997)
Tetrahidroalstonina	Alcaloide indólico (Laus-kep1997)
Isoajmalicina	Alcaloide indólico (Laus-kep1997)
Dihidrocorinanteina	Alcaloide indólico (Laus-kep1997)
Corinanteina	Alcaloide indólico (Laus-kep1997)
Vallesiachotamina	Alcaloide indólico
Vincosida lactam	Alcaloide indólico
Ácido C-8-(9)-7-deoxyloganic	Monoterpenoide
7 α -acetoxidihiidromilina	Limonoide (Triterpenoide modificado)
Ácido oleanólico	Triterpenoide (tipo oleanano)
Ácido 3B-hidroxi-27-p-(E)-cumaroiloxi-olean-12-en-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido oleanólico)
Ácido ursólico	Triterpenoide
Ácido 3B-hidroxi-27-(E)-feruloiloxiurs-12-en-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)

Ácido 3B-hidroxi-27-(Z)-feruloiloxiurs-12-en-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 3 β ,19 α -dihidroxi-6-oxo-urs-12-en-23-al-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 3 β ,19 α -dihidroxi-6-oxo-urs-12-en-23-ol-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxi-23-oxo-urs-12-en-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxiurs-12-en-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxiurs-12-en-23-al-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
3 β ,6 β ,19 α -trihidroxiurs-12-en-23,28-dimetilato	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 3 β ,6 β ,19 α ,23-tetrahidroxiurs-12-en-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 3 β -metoxi-16 α -hidroxiursa-12,19 (29)-dien-27,28-dioico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 3-oxo-6 β ,19 α -dihidroxiurs-12-en-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 7-oxo-3 β -dihidroxiurs-12-en-27,28-dioico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
Ácido 23-nor-24-esometilen-3 β ,6 β ,19 α -trihidroxiurs-12-en-28-oico	Triterpenoide (derivado del ácido ursólico)
3 β -O- β -D-quinovopiranosil-(28-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado)
(28-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster)
3 β -O- β -D-fucopiranosil-(28-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado)
3 β -O- β -D-quinovopiranosil-(28-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado)
3 β -O- β -D-fucopiranosil-(27-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado)
3 β -O- β -D-glucopiranosil-(1-3)- β -D-fucopiranosil-(27-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado)
3 β -O- β -D-glucopiranosil-(1-3)- β -D-fucopiranosil-(28-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado)

3 β -O- β -D-glucopiranosil-(1-3)- β -D-fucopiranosido de ácido quinóvico	Triterpenoide (glicosilado)
3 β -O- α -L-rhamnopiranosido de ácido quinóvico	Triterpenoide (glicosilado)
3 β -O- α -L-rhamnopiranosil-(3-1)- β -D-glucopiranosido de ácido quinóvico	Triterpenoide (glicosilado)
3 β -O- β -D-quinovopiranosil-(3-1)- β -D-glucopiranosido de ácido quinóvico	Triterpenoide (glicosilado)
3 β -O- β -D-quinovopiranosil-(3-1)- β -D-galactopiranosido de ácido quinóvico	Triterpenoide (glicosilado)
3 β -O- α -L-rhamnopiranosil-(3-1)- β -D-glucopiranosil-(27-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado)
(27-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster)
3 β -O- β -D-quinovopiranosil-(27-1)- β -D-glucopiranosil éster de ácido quinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado)
Tomentosida A 3 β -O- β -D-glucopiranosil-(1-4)- β -D-fucopiranosil-28-O- β -D-glucopiranosil éster de ácido piroquinóvico	Triterpenoide (éster glicosilado) (Kitajima-2003)
Tomentosida B 3 β -O- β -D-glucopiranosil-(1-4)- β -D-fucopiranosil-28-O- β -D-glucopiranosil éster de ácido pirocinchólico	Triterpenoide (éster glicosilado) (Kitajima-2003)

Tabla A2. Ecuaciones para la determinación de fracciones de monómeros, diadas y triadas en alginato por RMN.¹

	Ecuaciones
Monómeros	$G = 0,5 * [A + C + 0,5 * (B1 + B2 + B3)]$ $M = B4 + 0,5 * (B1 + B2 + B3)$ $F_G = \frac{G}{G + M}$ $F_M = \frac{M}{G + M}$
Diadas	$GG = 0,5 * [A + C - 0,5 * (B1 + B2 + B3)]$ $MG = GM = 0,5 * (B1 + B2 + B3)$ $MM = B4$ $F_{GG} = \frac{GG}{G + M}$ $F_{MG} = F_{GM} = \frac{GM}{G + M}$ $F_{MM} = \frac{MM}{G + M}$
Triadas	$GGM = MGG = \frac{B1 * 0,5 * (B1 + B2 + B3)}{B1 + B2}$ $MGM = \frac{B2 * 0,5 * (B1 + B2 + B3)}{B1 + B2}$ $GGG = GG - GGM$ $F_{GGM} = F_{MGG} = \frac{MGG}{G + M}$ $F_{MGM} = \frac{MGM}{G + M}$ $F_{GGG} = \frac{GGG}{G + M}$

¹ ASTM International. Standard Test Method for Determining the Chemical Composition and Sequence in Alginate by Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR). *ASTM* 1–5 (2012) doi:10.1520/F2259-10R12E01.

Tabla A3. Ecuaciones para la determinación del ratio M/G y las longitudes promedio de bloques G y M.²

Parámetro calculado	Ecuación
Ratio M/G	$Ratio \frac{M}{G} = \frac{M}{G} = \frac{F_M}{F_G}$
Longitud promedio de bloque G	$N_G = \frac{F_G}{F_{GM}}$
Longitud promedio de bloque M	$N_M = \frac{F_M}{F_{MG}}$
Longitud promedio de bloque G (excluye bloques de longitud 1)	$N_{G>1} = \frac{F_G - F_{MGM}}{F_{GGM}}$

Tabla A4 Masas molares promedio e índice de polidispersión de los estándares de pululano, de acuerdo a la información otorgada por el productor.

Estándar	M_n (kDa)	M_p (kDa)	M_w (kDa)	PDI
Pul-6k	5,9	6,1	6,2	1,05
Pul-50k	45,5	47,1	48,8	1,07
Pul-110k	100	107	113	1,13
Pul-200k	184	194	200	1,09
Pul-400k	310	337	400	1,12

Tabla A5 Porcentaje de rendimiento promedio de la extracción de UT. El número de lotes implica cuantos lotes de 800 mg de materia prima se juntaron en una determinada extracción

Masa hilachas (mg)	# lotes	Masa extracto (mg)	% rendimiento
1601,87	2	137,8	8,60
1602,30	2	141,6	8,84
1603,80	2	135,4	8,44
3213,90	4	261,4	8,13
3204,20	4	280,0	8,74

² ASTM International. Standard Test Method for Determining the Chemical Composition and Sequence in Alginate by Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR). *ASTM* 1–5 (2012) doi:10.1520/F2259-10R12E01.

Figura A1. Espectro FT-IR del tanino de la corteza de la especie *Ficus sycomorus*.³ Su gran similitud con el espectro de FT-IR del extracto de UT podría ser indicativo del contenido de taninos en nuestra muestra.

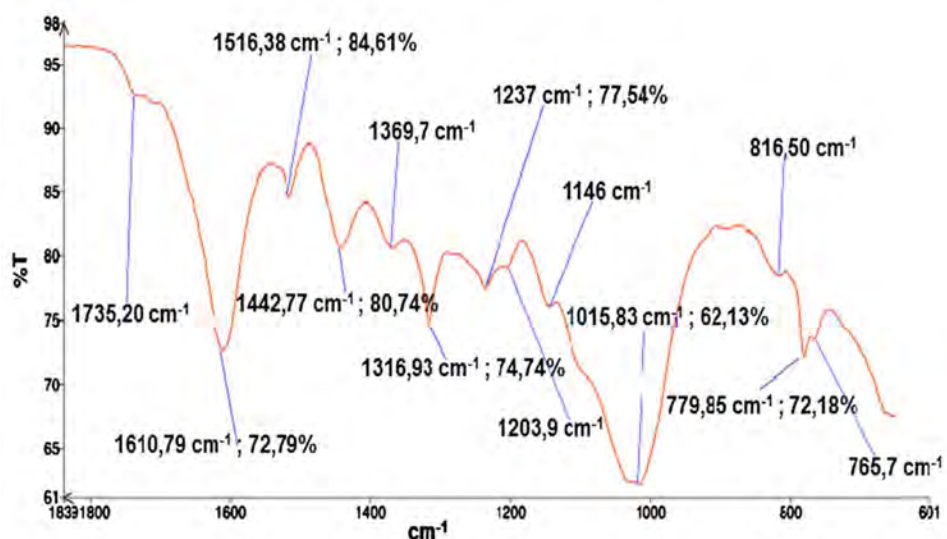


Tabla A6. Tabla con valores de absorbancia para las soluciones del estándar (ácido gálico) para la elaboración de la curva de calibración de la determinación del contenido total de compuestos fenólicos.

Concentración (µg/mL)		400	500	800	1200
Número de medición	1	0,199	0,268	0,648	0,920
	2	0,201	0,253	0,616	0,957
	3	0,224	0,339	0,648	0,980
	4	0,279	0,383	0,648	0,956
	5	0,267	0,373	0,702	0,989
Promedio		0,234	0,323	0,652	0,960
Desviación estándar		0,037	0,060	0,031	0,027

³ Konai, N., Raidandi, D., Pizzi, A. & Meva'a, L. Characterization of *Ficus sycomorus* tannin using ATR-FT MIR, MALDI-TOF MS and ¹³C NMR methods. *Eur. J. Wood Wood Prod.* **75**, 807–815 (2017).

Tabla A7. Valores de masa de las esponjas de alginato. Para cada método se realizaron 6 mediciones de masa para cada concentración de alginato.

Concentración de alginato	# Medición	Masa de esponjas (g)			
		Método A	Método B	Método C	Método D
1,5 %	1	0,1551	0,1404	0,1492	0,1605
	2	0,1655	0,1560	0,1465	0,1581
	3	0,1506	0,1553	0,1529	0,1668
	4	0,153	0,1392	0,1643	0,1503
	5	0,1628	0,1447	0,1593	0,1649
	6	0,1656	0,1509	0,1700	0,1454
3%	1	0,3092	0,3058	0,2707	0,2700
	2	0,2843	0,3128	0,2617	0,2708
	3	0,3142	0,3123	0,2633	0,2765
	4	0,2871	0,3005	0,2821	0,2623
	5	0,3142	0,2964	0,2833	0,2611
	6	0,2925	0,2815	0,2810	0,2786

Tabla A8. Dimensiones de las esponjas de alginato producidas por medio de los métodos A y C. Para los diámetros de las esponjas A, se reportan en muchos casos un valor promedio por la asimetría que posee la muestra.

Concentración de alginato	# Medición	Diámetro d (mm)		Altura h (mm)	
		Método A	Método C	Método A	Método C
1,5 %	1	13,18	19,82	6,14	12,18
	2	14,91	18,8	5,48	12,48
	3	15,72	-	6,88	13,08
	4	13,57	20,44	5,62	13,26
	5	16,22	20,56	6,22	13,60
	6	14,85	20,84	6,98	13,28
3%	1	18,40	20,76	5,34	13,62
	2	15,80	20,94	6,30	13,72
	3	16,41	20,78	6,18	13,38
	4	14,76	21,83	6,34	13,74
	5	15,15	22,42	6,22	12,66
	6	16,84	22,52	6,80	13,24

Tabla A9. Porcentaje de hinchamiento medido para cada esponja de los métodos A-D, a pH 5,5.⁴

Esponja	Hinchamiento (%)						
	20 min	40 min	60 min	180 min	300 min	480 min	1440 min
A1,5%-1	-	-	-	-	-	-	-
A1,5%-2	604,26	968,79	1135,93	1449,65	1555,79	1631,68	1739,48
A1,5%-3	777,01	1142,07	1333,79	1695,17	1781,15	1858,62	1923,68
A3%-1	470,31	731,02	826,44	1105,61	1199,26	1226,29	1351,26
A3%-2	371,00	568,40	669,08	891,24	964,16	997,54	1136,80
A3%-3	310,75	504,19	632,54	889,11	939,39	980,59	1077,65
B1,5%-1	71,92	76,38	77,43	91,60	105,25	109,71	117,06
B1,5%-2	69,57	79,89	85,05	100,27	111,68	120,38	126,09
B1,5%-3	64,81	69,58	78,04	89,15	100,79	105,82	111,90
B3%-1	56,64	64,76	72,43	81,46	83,98	91,08	95,42
B3%-2	49,81	57,98	64,75	77,78	84,04	88,12	95,53
B3%-3	54,32	63,88	68,79	76,10	81,67	86,19	89,38
C1,5%-1	1077,52	1105,96	1129,36	1397,71	1603,21	1699,08	1734,40
C1,5%-2	938,33	1045,42	1060,83	1263,75	1386,25	1435,42	1682,92
C1,5%-3	934,51	1019,91	1019,47	1316,37	1493,36	1534,51	1697,35
C3%-1	278,74	283,99	327,56	493,96	606,04	759,58	935,43
C3%-2	390,65	467,27	538,96	897,40	1074,55	1182,34	1293,77
C3%-3	436,57	531,30	637,40	982,55	1136,57	1248,75	1382,55
D1,5%-1	54,29	52,32	51,96	44,29	45,18	47,14	44,29
D1,5%-2	50,88	52,47	52,31	42,90	42,58	42,26	40,99
D1,5%-3	53,29	54,30	50,76	41,82	43,68	41,48	41,15
D3%-1	34,77	43,01	47,55	48,86	51,61	53,52	53,41
D3%-2	36,23	43,51	48,70	51,43	54,55	54,16	54,42
D3%-3	33,83	42,00	46,88	48,69	50,06	51,65	53,35

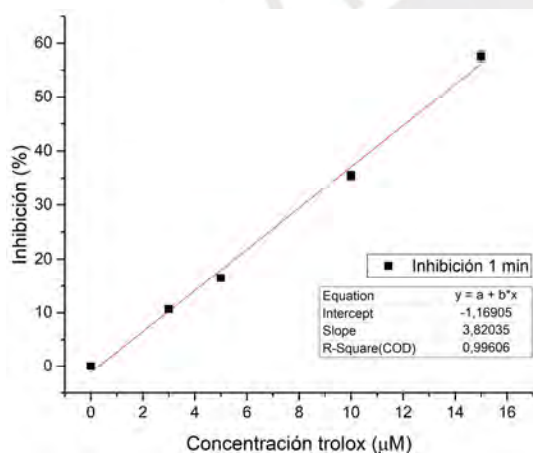
Tabla A10. Porcentaje de hinchamiento medido para las esponjas del método C, a pH 7,5.⁴

Esponja	Hinchamiento (%)						
	20 min	40 min	60 min	180 min	300 min	480 min	1440 min
C1,5%-1	848,86	1070,32	1182,19	1402,74	1446,12	1473,06	1425,57
C1,5%-2	902,13	1057,02	1157,87	1335,74	1334,47	1337,87	1403,40
C1,5%-3	670,09	854,67	985,51	1263,55	1351,40	1373,83	1415,89
C3%-1	309,19	584,98	658,52	915,25	1049,33	1144,39	1167,26
C3%-2	320,80	790,98	873,93	1097,24	1146,37	1172,68	1203,01
C3%-3	319,75	790,62	888,15	1004,69	1160,00	1185,43	1178,52

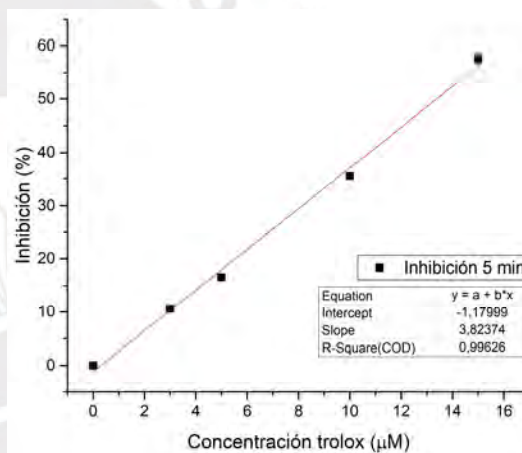
⁴ En la tabla A9 y A10, el código de esponja se lee de la siguiente manera: MétodoConcentración-muestra. Por ejemplo, D3%-1 hace referencia a la primera muestra de la esponja D de concentración 3%. Las muestras van de 1 a 3 porque se hizo la medición por triplicado.

Tabla A11. Porcentajes de inhibición promedio (a partir de 3 mediciones (n=3) en cada tiempo de medición para los estándares de trolox. Se incluyen las desviaciones estándar.

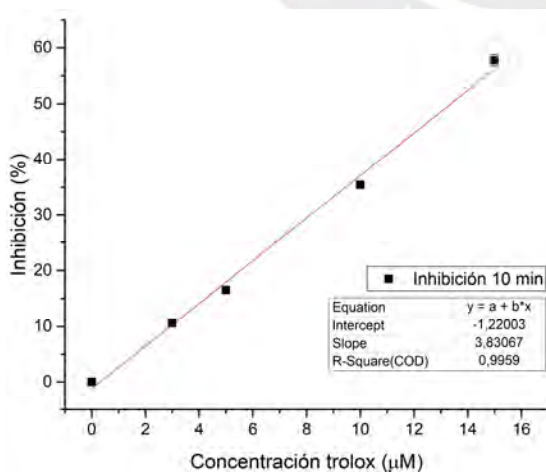
t (min)	Trolox 3 μM		Trolox 5 μM		Trolox 10 μM		Trolox 15 μM	
	Inhibición (%)	Desv	Inhibición (%)	Desv	Inhibición (%)	Desv	Inhibición (%)	Desv
0	0	-	0	-	0	-	0	-
1	10,6819	0,0698	16,4991	0,4106	35,4587	0,8093	57,5865	1,0677
5	10,6016	0,1281	16,5632	0,3572	35,5237	0,7117	57,5951	1,0573
10	10,6067	0,1284	16,5227	0,2679	35,4447	0,5398	57,7380	1,0564
15	10,5212	0,1529	16,5308	0,2811	35,3826	0,5510	57,7860	1,1142
30	10,5638	0,2027	16,4262	0,4270	35,1817	0,5195	57,6773	1,0981
45	10,5741	0,0741	16,4089	0,0966	35,2952	0,5886	57,7325	1,0459
60	10,5312	0,1485	16,3765	0,1577	35,2008	0,3920	57,7122	1,1410



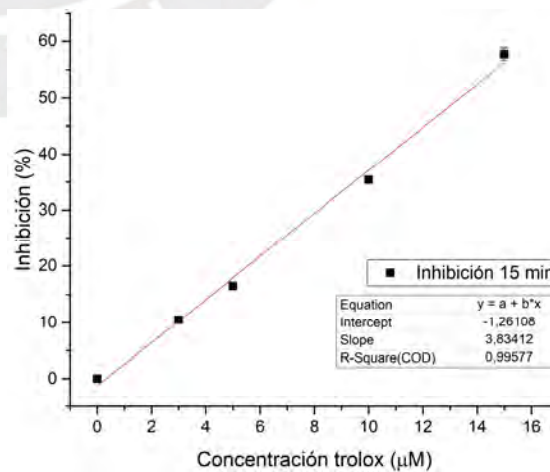
a)



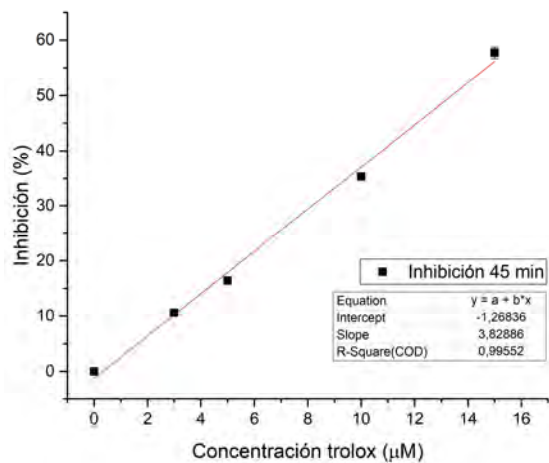
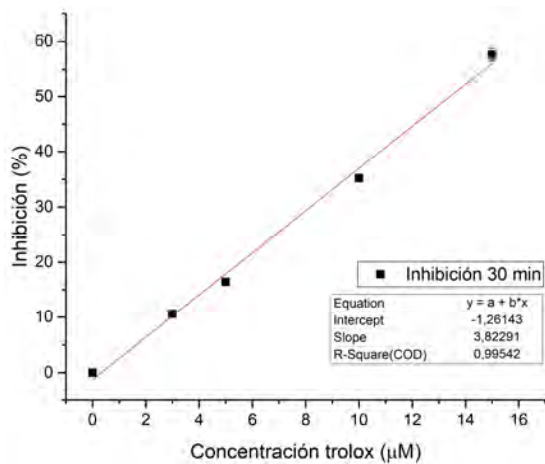
b)



c)

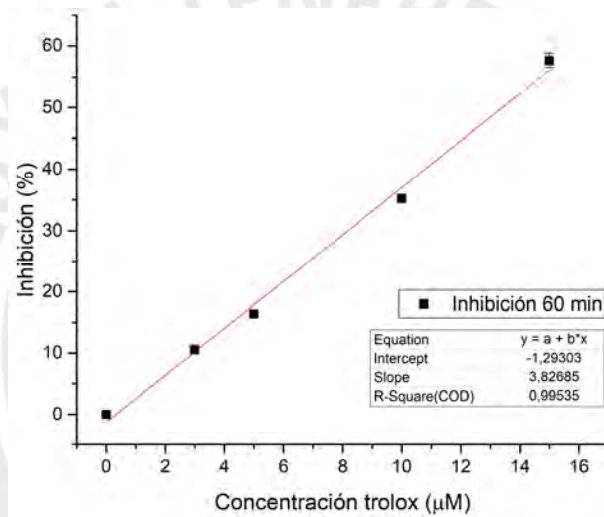


d)



e)

f)



g)

Figura A2. Curvas de calibración de los estándares de trolox para los distintos tiempos de medición: a) 1 min, b) 5 min, c) 10 min, d) 15 min, e) 30 min, f) 45 min y g) 60 min.

Tabla A12. Porcentajes de inhibición promedio en cada tiempo de medición para las soluciones del extracto de UT

t (min)	UT 0,5 mg/mL		UT 0,75 mg/mL		UT 1 mg/mL		UT 1,5 mg/mL	
	Inhibición (%)	Desv	Inhibición (%)	Desv	Inhibición (%)	Desv	Inhibición (%)	Desv
0	0	-	0	-	0	-	0	-
1	11,7762	0,4405	17,9545	0,1517	22,9470	1,1128	33,5886	1,1047
5	14,6484	0,4429	21,8700	0,2109	27,6822	1,2581	39,9413	1,0275
10	15,7973	0,4439	23,5007	0,2106	29,5084	1,2737	42,6632	1,1376
15	16,3318	0,3832	24,4005	0,1472	30,6141	1,2898	44,1492	1,0907
30	17,4333	0,4584	26,0304	0,1748	32,3750	1,3567	47,0633	1,2315
45	18,0166	0,2522	26,9062	0,1824	33,4180	1,3335	48,6265	1,3728
60	18,4175	0,3946	27,5560	0,2175	34,1737	1,3597	49,7819	1,3009

Tabla A13. Porcentajes de inhibición para el extracto de UT. Se presentan los valores de las 3 mediciones y así como el promedio y la desviación estándar del conjunto.

t (min)	Inhibición de la UT (%)			Inhibición promedio (%)	Desv. estándar
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3		
0	0	0	0	0	-
1	23,7822	23,8506	23,7822	23,8050	0,0395
5	28,0000	29,3103	28,5100	28,6068	0,6605
10	29,6137	30,6916	31,0888	30,4647	0,7633
15	30,4721	31,4121	31,8508	31,2450	0,7044
30	31,9027	33,3813	32,8551	32,7130	0,7495
45	33,2382	34,5821	33,6207	33,8137	0,6924
60	34,3795	35,1585	34,9138	34,8173	0,3984
90	35,2354	36,2193	35,8273	35,7607	0,4954
120	35,5714	37,3372	36,4029	36,4372	0,8834
180	37,2493	38,6957	36,8345	37,5932	0,9771
240	38,1089	40,0289	37,4640	38,5339	1,3342
300	38,8809	40,4658	37,9509	39,0992	1,2716
360	39,5415	41,2536	38,3838	39,7263	1,4438
420	40,4864	41,8367	38,7283	40,3505	1,5587
540	41,1765	42,9825	38,9855	41,0481	2,0016
1320	44,1349	46,1194	41,0294	43,7612	2,5655
1440	44,1997	46,5569	41,5317	44,0961	2,5142
1560	44,6244	46,8468	41,9735	44,4816	2,4398
1680	44,7563	47,0677	42,1829	44,6689	2,4436
1800	44,9704	47,4320	42,2452	44,8825	2,5945
1920	45,1039	47,7341	42,3929	45,0770	2,6707

Tabla A14. Porcentajes de inhibición para las esponjas de alginato del método C 3%ALG. Se presentan los valores de las 3 mediciones y así como el promedio y la desviación estándar del conjunto.

t (min)	Inhibición de las esponjas (%)			Inhibición promedio (%)	Desv. estándar
	Muestra 1 (m= 89 mg)	Muestra 2 (m= 88 mg)	Muestra 3 (m= 86 mg)		
0	0	0	0	0	-
1	0,0000	0,2841	0,1433	0,1425	0,1420
5	0,0000	0,4255	0,2865	0,2374	0,2170
10	-0,1429	0,4255	0,4298	0,2375	0,3294
15	0,2853	0,7092	0,7163	0,5703	0,2468
30	0,2853	0,8511	0,7194	0,6186	0,2960
45	0,4292	0,8523	1,1511	0,8108	0,3627
60	0,5714	0,9943	0,8683	0,8114	0,2171
90	0,8559	1,8440	1,1628	1,2876	0,5057
120	1,4286	2,1307	1,3139	1,6244	0,4422
180	1,2894	2,4182	1,6153	1,7743	0,5810
240	1,7241	2,8490	2,5037	2,3589	0,5762
300	2,1583	3,1429	3,1019	2,8010	0,5570
360	2,5937	3,2999	3,2689	3,0542	0,3991
420	3,1609	3,5868	3,4328	3,3935	0,2156
540	3,7464	3,7410	4,4843	3,9906	0,4276
1320	9,5729	8,8889	10,1246	9,5288	0,6190
1440	9,8820	9,0639	11,2150	10,0536	1,0857
1560	10,1770	9,5238	11,4241	10,3750	0,9655
1680	10,9630	10,6825	12,4409	11,3621	0,9447
1800	10,9792	10,8955	13,1329	11,6692	1,2683
1920	11,8871	11,2275	13,9683	12,3610	1,4305

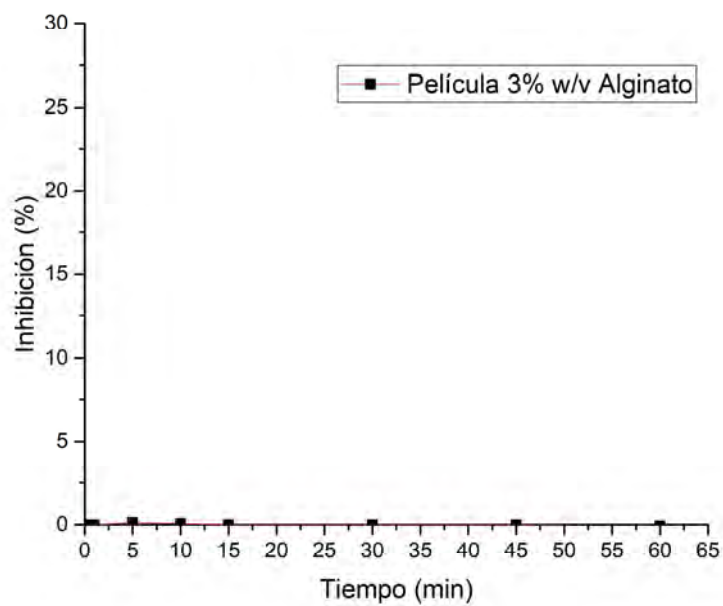


Figura A3. Curvas de porcentaje de inhibición de una película de alginato 3%ALG. Cada punto representa el promedio de dos mediciones (n=2)

Tabla A15. Porcentajes de inhibición para las esponjas cargadas (C 3%ALG) con UT. Se presentan los valores de las 3 mediciones y así como el promedio y la desviación estándar del conjunto.

t (min)	Inhibición de las esponjas cargadas (%)			Inhibición promedio (%)	Desv. estándar
	Muestra 1 (m= 92 mg)	Muestra 2 (m= 92 mg)	Muestra 3 (m= 93 mg)		
0	0	0	0	0	-
1	8,3095	5,7143	6,7047	6,9095	1,3096
5	10,8727	6,7143	8,0000	8,5290	2,1291
10	11,7143	7,5823	8,5837	9,2934	2,1555
15	12,4286	8,2976	9,2725	9,9995	2,1593
30	13,2857	10,1574	10,5714	11,3382	1,6993
45	13,8968	11,4449	11,1748	12,1722	1,4997
60	14,7353	12,0344	11,8911	12,8869	1,6024
90	15,0430	13,0186	12,5000	13,5205	1,3437
120	15,6385	13,3429	13,5252	14,1688	1,2760
180	16,8588	14,5533	14,0784	15,1635	1,4873
240	18,0115	15,5844	14,5773	16,0577	1,7654
300	18,4058	16,2554	15,2269	16,6294	1,6221
360	19,4203	17,0058	15,9357	17,4539	1,7850
420	19,8251	18,0233	16,1765	18,0083	1,8243
540	20,9677	19,0337	17,4041	19,1352	1,7840
1320	27,4924	24,8494	22,2556	24,8658	2,6184
1440	28,6145	26,2048	22,7410	25,8534	2,9525
1560	29,0909	27,2590	23,6006	26,6502	2,7953
1680	30,0000	28,5498	24,2792	27,6097	2,9740
1800	30,4878	29,1982	25,0760	28,2540	2,8268
1920	31,1927	29,6970	25,8752	28,9216	2,7422