



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias de Materiales Poliméricos

“Biocompatibilidad de membranas de mezclas de PVA/PAMPS de superficie microporosa”

Tesis que presenta

ARELLY PAULINA VARGUEZ CATZIM

En opción al título de

**MAESTRO DE CIENCIAS
(MATERIALES POLIMERICOS)**

Mérida, Yucatán, México, Mayo 2020

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS MATERIALES POLIMÉRICOS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de ARELLY PAULINA VARGUEZ CATZIM titulado “Biocompatibilidad de membranas de mezclas de PVA/PAMPS de superficie microporosa” fue realizado en la Unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. María Ortencia González Díaz y codirección de la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, y pertenece al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente.



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 11 de mayo de 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C (CICY) por brindarme sus instalaciones para el desarrollo profesional de la presente tesis, específicamente a la Unidad de Materiales poliméricos, así como al laboratorio de membranas y biomateriales por permitir el desarrollo experimental de la presente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante mis estudios de maestría con numero de beca 886926 y al proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT No. **286973** por el financiamiento del proyecto.

A mi directora de tesis, Dra. María Ortencia González Díaz y codirectora de tesis, Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes mi más amplio agradecimiento por haberme recibido en su grupo de investigación, por su valioso tiempo y conocimientos brindados.

Agradezco a los miembros del comité tutorial, conformado por el Dr. Manuel Aguilar Vega, la Dra. Vanessa Martínez Cornejo, el Dr. Manuel Aguilar Vega, el Dr. Emmanuel Hernández Nuñez y el Dr. Manuel Cervantes Uc, por su apoyo y contribución para mejorar este proyecto.

A los técnicos MC. María Isabel Loria Bastarrachea, por su apoyo en diversas actividades realizadas en el laboratorio de membranas, al MC. Santiago Duarte Aranda por su apoyo técnico en el análisis SEM y EDX, a la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argaez y a la Q.B.B. Mirbella del Rosario Cáceres Farfan por su apoyo técnico en la caracterización microbiológica, a la Dra. Rita del Rosario Sulub Sulub por su apoyo técnico en las pruebas de FTIR y permeabilidad de gases.

Al Laboratorio Nacional de Nano y Bio materiales (LANNBIO) del CINVESTAV unidad Mérida por el apoyo brindado para las pruebas de XPS.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de membranas, biomateriales y de la maestría en general por su apoyo incondicional.

Finalmente, muchas gracias a todos por permitirme finalizar exitosamente este proyecto importante de superación académica y personal.

ÍNDICE

LISTADO DE TABLAS.....	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS	4
CAPITULO I.ANTECEDENTES	5
<i>1.1 La piel.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2 Requisitos que debe cumplir un material con aplicación en la reparación o curación de tejido cutáneo</i>	<i>10</i>
<i>1.3 Membranas poliméricas.....</i>	<i>11</i>
1.3.1 Importancia morfológica de la membrana.....	12
1.3.2 Morfología según su estructura	13
1.3.3 Métodos de elaboración.....	14
1.3.4 Inversión de fases	15
<i>1.4 Materiales poliméricos.....</i>	<i>17</i>
1.4.1 Poli-(alcohol vinílico) PVA.....	18
1.4.2 Poli(ácido 2-acriloamido-2-metilpropanosulfónico, PAMPS	18
<i>1.5 Antecedentes del PVA y PAMPS.....</i>	<i>19</i>
<i>1.6 Biocompatibilidad.....</i>	<i>21</i>
<i>1.7 Actividad antimicrobiana.....</i>	<i>21</i>
<i>1.8 Agentes de entrecruzamiento</i>	<i>25</i>
CAPITULO II.METODOLOGÍA.....	26
2.1 Materiales y solventes	26
2.2 Preparación de mezclas	26
2.3 Elaboración de membrana porosa por inversión de fase	26

2.4 Entrecruzamiento químico de la membrana con SA	28
2.5 Caracterización de la membrana	29
2.5.1 Caracterización morfológica y funcional de la membrana	29
2.5.2 Caracterización biológica de la membrana	33
CAPITULO III.RESULTADOS	41
3.1 Elaboración de membranas de PVA, PAMPS y mezclas de PVA/PAMPS	41
3.2 Caracterización morfológica de las membranas asimétricas	42
3.2.1 Membranas de PVA	42
3.2.2 Membranas de PVA/PAMPS	45
3.3 Capacidad de intercambio Iónico (IEC por sus siglas en inglés)	47
3.5 Caracterización morfológica de las membranas asimétricas	48
3.5.1 Membranas de PVA	48
3.5.2 Membranas de PVA/PAMPS	49
3.5.3 Distribución de tamaño de poros en las membranas asimétricas de PVA y PVA/PAMPS	51
3.6 Capacidad de intercambio Iónico (IEC)	53
3.7 Análisis de la estructura química por medio de FTIR de las membranas de PVA y PVA/PAMPS	55
3.8 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)	56
3.9 Dispersión de energía de rayos-X (EDX)	59
3.10 Pruebas de hinchamiento	60
3.11 Pruebas de pérdida de masa y degradación	64
3.12 Caracterización mecánica	65
3.13 Proliferación celular	69
3.14 Ensayos de actividad antimicrobiana	72
3.14.1 Ensayo por diluciones en cajas Petri	72
3.14. Ensayo por microdiluciones y sus réplicas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC)	73
CONCLUSIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	82

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Composición de la piel y daño por quemaduras de primer hasta tercer grado [21]	7
Figura 1.2 a) Representación esquemática de la estructura de la piel y b) diseño de una membrana ideal para vendajes [17].....	11
Figura 1.3 Esquema del transporte selectivo de las membranas poliméricas [26].....	12
Figura 1.4 Diferencia morfológica y funcional que presentan las membranas densas y porosas.....	14
Figura 1.5 Estructura química del PVA	18
Figura 1.6 Estructura química del PAMPS	19
Figura 1.7 Estructura química del SA	25
Figura 2.1 Proceso de formación de las membranas por el método de inversión fases A) preparación de la soluciones poliméricas y sistema de coagulado atemperado, B) razado de la solución polimérica y c) introducción de la solución en el sistema de coagulado para iniciar la inversión de fases.	27
Figura 2.2 Estructura química general de las membranas de PVA/PAMPS entrecruzadas con SA.....	28
Figura 2.3 Microscopio electrónico - JEOL-JSM-6360LV	30
Figura 2.4 Especímetro y vernier digital de la marca Mitutoyo.....	32
Figura 2.5 Esquema general de la cámara de Neubauer utilizada para el conteo celular [72]	36
Figura 2.6 Diseño experimental del ensayo	39
Figura 3.1 Membranas de PVA evaluada en diferentes baños de coagulado analizadas en sus áreas transversal y superficial, respectivamente A) y B) membrana formada con el baño 1-propanol, C) y D) membrana formada con el baño etanol/2-propanol (50/50), E) y F) membrana formada con etanol/2-propanol	44
Figura 3.2 Membrana evaluada en diferentes baños de coagulado analizadas en sus áreas transversal y superficial, respectivamente. A) y B) membrana formada con el baño 1-	

propanol, C) y D) membrana formada con el baño Etanol/2-Propanol (50/50 %v/v), E) y F) membrana formada con el baño Etanol/2-Propanol (90/10/40 °C).	46
Figura 3.3 Micrografías de la membrana de PVA A) vista transversal, B) vista superficial; preparadas con el baño de coagulado etanol/ 2-propanol (90/10 % v/v) a 40°C.....	49
Figura 3.4 Micrografías de las membranas A) sección transversal y B) sección superficial (membrana PVA/PAMPS 95/5) C) sección transversal y D) sección superficial (membrana PVA/PAMPS 90/10) E) sección transversal y F) sección superficial (membrana PVA/PAMPS 85/15)	50
Figura 3.5 Distribución de tamaño de poros en la superficie de las membranas asimétricas obtenidas por el baño de coagulado etanol/2-propanol; A) membrana de PVA, B) membrana PVA/PAMPS (95/5), C) membrana PVA/PAMPS (90/10), D) membrana PVA/PAMPS (85/15)	52
Figura 3.6 (A) Estructura de la piel y (B) estructura biomimética propuesta para membranas de PVA/PAMPS	53
Figura 3.7 Gráfica comparativa de los valores de IEC experimental y teórico para las membranas PVA/PAMPS modificadas a diferentes concentraciones.	54
Figura 3.8 Espectros FTIR de las membranas de PVA sin entrecruzar Y PVA/ PAMPS entrecruzadas	56
Figura 3.9 Análisis elemental por XPS en la capa densa de las membranas	59
Figura 3.10 Pruebas de hinchamiento	62
Figura 3.11 Absorción de PBS de las membranas	63
Figura 3.12 Ensayo de biodegradación para las membranas PVA y PVA/PAMPS entrecruzadas	65
Figura 3.13 Cinética de proliferación celular de la estructura porosa de la membrana siendo PVA el material sin modificar con PAMPS y 95/5, 90/10 y 85/15 las membranas modificadas a diferentes concentraciones de PAMPS.	71
Figura 3.14 Cinética de proliferación celular de la estructura densa de la membrana siendo PVA el material sin modificar con PAMPS y 95/5, 90/10 y 85/15 las membranas modificadas a diferentes concentraciones de PAMPS.	72

Figura 3.15 Diseño experimental en caja Petri replicado para cada bacteria.....	74
Figura 3.16 Diseño experimental en caja Petri replicado para cada bacteria.....	75
Figura 3.17 Placa y réplica en caja Petri del ensayo para E. coli.....	76
Figura 3.18 Placa y réplica del ensayo para S. aureus	77
Figura 3.19 Placa y réplica del ensayo para P. aureuginosa	78
Figura 3.20 Placa y réplica del ensayo para C. albicans	79

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Materiales Poliméricos para apósitos de heridas actualmente disponibles [15]	9
Tabla 1.3 Agentes de control bacteriano [53].....	23
Tabla 2.1 Disolventes y no-solventes reportados para la preparación de membranas porosas de PVA	28
Tabla 3. 1 Porcentaje de concentraciones en baños de coagulado para membranas de PVA y PVA/PAMPS	41
*Se realizó una prueba controlando la temperatura del baño de coagulación a 40 °C	42
Tabla 3.2 Resultados de IEC para las membranas de PVA/PAMPS (80/20).....	47
Tabla 3.3 Resultados de IEC para las membranas de PVA/PAMPS.....	54
Tabla 3.4 Porcentaje atómico de los elementos cuantificados por XPS para la estructura porosa de las membranas de PVA y PVA/PAMPS	57
Tabla 3.5 Porcentaje atómico de los elementos cuantificados por XPS para la estructura densa de las membranas de PVA/PAMPS	58
Tabla 3.6 Composición elemental obtenida por EDX de las membranas PVA y PVA/PAMPS	60
Tabla 3.7 Porcentaje de absorción en PBS de las membranas entrecruzadas	63
Tabla 3.8 Pérdida de masa registrada para las membranas de PVA y PVA/ PAMPS entrecruzadas	64
Tabla 3.9 Resultados de las pruebas a tensión de las membranas secas	66
Tabla 3.10 Propiedades mecánicas de la piel humana.....	66
Tabla 3.11 Resultados de las pruebas a tensión de las membranas húmedas.....	68
Tabla 3.12 Ensayos microbiológicos por diluciones a 24 horas.....	73
Tabla 3.13 Resultados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para E. coli	76
Tabla 3.14 Resultados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para S.aureus	77

Tabla 3.15 Resultados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para <i>P. aureuginosa</i>	78
Tabla 3.16 Resultados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para <i>C. albicans</i>	79

RESUMEN

La biomedicina regenerativa ha revolucionado la curación de heridas y regeneración de la piel. Diversos materiales como colágeno, quitosano, fibrina, polisacáridos, poli (ácido láctico) , poliuretanos, policaprolactona y poli-(alcohol vinílico) (PVA) han sido investigados para su aplicación como apósitos o vendajes poliméricos en la curación de tejido cutáneo. Sin embargo, esta área aún sigue siendo un reto clínico, y se requieren desarrollar nuevos materiales biocompatibles y con actividad antimicrobiana que eviten su contaminación por diferentes microorganismos presentes en el medio ambiente y en particular por bacterias. En este proyecto se desarrollaron membranas de PVA modificadas con diferentes concentraciones de poli (ácido 2-acriloamido-2-metilpropanosulfónico) (PAMPS) para su aplicación como apósitos poliméricos en la reparación de tejido cutáneo. Se reporta la metodología de preparación por el método de inversión de fases, obteniendo membranas microporosas y entrecruzadas con ácido succínico (SA) con estructura biomimética similar a la piel. Estas membranas presentan estabilidad mecánica, biocompatibilidad y actividad antimicrobiana, debido a las características que en conjunto presentan estos polímeros mezclados y entrecruzados.

Los resultados exhibieron una membrana de estructura bicapa; la capa densa está compuesta de PAMPS y la capa porosa de PVA/PAMPS, lo cual se confirmó por microscopia electrónica de barrido y análisis elemental de las membranas. Las membranas de PVA/PAMPS presentaron valores de modulo elástico (E) entre 0.44 y 0.86 MPa valores cercanos a lo reportado para la piel (0.64 MPa). La introducción de PAMPS en las membranas fue altamente efectiva para mejorar las propiedades de hinchamiento y la proliferación celular de fibroblastos. Además, las membranas de PVA/PAMPS exhibieron inhibición a 4 cepas bacterianas; *E. coli*, *P. aureuginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*, siendo el PAMPS el agente activo que proporciona actividad bacteriostática o bactericida a las membranas.

ABSTRACT

Regenerative biomedicine has revolutionized wound healing and skin regeneration. Several materials such as collagen, chitosan, fibrin, polysaccharides, polylactic acid, polyurethanes, polycaprolactone and polyvinyl alcohol (PVA) have been investigated for their application as dressings or polymeric bandages in the healing of skin tissue. However, this area remains as clinical challenge, and new biocompatible materials with antimicrobial activity need to be developed to avoid contamination by different microorganisms present in the environment and, in particular by bacteria.

In this project, PVA membranes blended with different concentrations of poly-2-acryloamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (PAMPS) were developed for their application as wound dressings in the repair of skin tissue. The elaboration methodology by the phase inversion method is reported, obtaining microporous membranes crosslinked with succinic acid (SA) with biomimetic structure that simulates the skin. These membranes present mechanical stability, biocompatibility, and antimicrobial activity, due to the characteristics of these blended and crosslinked polymers.

The results showed a bilayer membrane structure, where the dense layer is composed by PAMPS and the porous layer of PVA/PAMPS blends, which was confirmed from scanning electron microscopy and elemental analysis of the membranes. The PVA/PAMPS membranes presented elastic modulus (E) values between 0.44 and 0.86 MPa, which is close to the values reported for skin (0.64 MPa). The introduction of PAMPS into the membranes was highly effective for improving the swelling properties and fibroblasts cell proliferation. In addition, PVA/PAMPS membranes exhibited inhibition of 4 bacterial strains *E. coli*, *P. aureuginosa*, *S. aureus* and *C. albicans*, being PAMPS the active agent that provides bacteriostatic or bactericidal activity to the membranes.

INTRODUCCIÓN

La biocompatibilidad es una de las características más importantes de un material polimérico cuya superficie se requiere para interactuar con un sistema biológico. Dado que los materiales interactúan con el entorno a través de sus interfaces, se considera que el tipo y fuerza de tales interacciones dependen en gran medida de las propiedades de la superficie de este tipo de materiales [1]. En este sentido, se ha investigado la biocompatibilidad de un gran número de polímeros naturales y sintéticos, tales como, colágeno, quitosano, fibrina, polisacáridos, poli ácido láctico), poliuretanos, policaprolactona y ácido poliglicólico, así como de materiales cerámicos y metálicos [2, 3, 4].

Dentro de la gama de polímeros sintéticos, el poli-(alcohol vinílico) (PVA) destaca por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, excelentes propiedades mecánicas y elevada estabilidad en un extenso intervalo de condiciones de pH y temperatura; por lo tanto, ha sido ampliamente usado en diferentes áreas del campo biomédico. El PVA tiene la capacidad de formar hidrogeles que retienen gran cantidad de agua dentro de su red tridimensional de cadenas poliméricas [5]. Sin embargo, en condiciones húmedas las propiedades del PVA disminuyen debido a la acción plastificante de las moléculas de agua, creando ambientes difíciles que no son compatibles con células y tejidos [6]. Aunado a ello, el PVA puro tiene poca adhesión celular, debido a su baja afinidad de proteína [7]. Con la finalidad de disminuir tales desventajas, se han considerado algunas modificaciones tales como, mezclado físico con polímeros compatibles, modificación química mediante injertos, desarrollo de redes poliméricas interpenetradas y mediante entrecruzamiento químico [8].

Estudios recientes han demostrado que la mezcla de PVA con algunas biomacromoléculas como quitosano [9], heparina y compuestos con terminaciones sulfonadas, los cuales presentan propiedades biológicas intrínsecas, son benéficas para la adhesión celular y la proliferación [8]. Sin embargo, a pesar de las mejoras que provee la mezcla con estos biopolímeros, las propiedades mecánicas se ven fuertemente afectadas, tal es el caso del quitosano, que a pesar de tener excelentes cualidades para su aplicación biológica ha sido

necesario modificar su uso con ayuda de polímeros sintéticos y entrecruzantes para mantener su estabilidad [10].

Dentro de este contexto, se plantea el desarrollo de membranas de PVA con diferentes concentraciones de poli(ácido 2-acriloamido-2-metilpropanosulfónico) (PAMPS) para su aplicación como apósitos o vendajes poliméricos en la reparación o curación de tejido cutáneo. El PAMPS es un polímero hidrofílico que contiene grupos ácidos sulfónicos como los de la heparina o taurina (compuestos presentes en el cuerpo humano con una función vital) en su estructura química [11]. Además, el PAMPS presenta alta estabilidad térmica, inercia química y resistencia hidrolítica en entornos fisiológicos, y recientemente se ha reportado que presenta excelente actividad antimicrobiana, lo cual es de suma importancia para evitar la contaminación del material por diferentes microorganismos presentes en el medio ambiente y, en particular, el crecimiento de bacterias en el área de proliferación celular [12].

Por lo tanto, el desarrollo de membranas de PVA mezclado con cierta concentración de PAMPS, formando una red polimérica de superficie microporosa, mejorará la biocompatibilidad de las membranas de PVA puro, y proporcionará actividad antimicrobiana. Se propone que las membranas presenten por un lado una superficie densa de PAMPS que sea permeable al oxígeno e impida la infección bacteriana; por otro lado, una cara inferior con superficie microporosa compuesta de PVA/PAMPS que favorezca el crecimiento celular y acelere la regeneración del tejido. Por otra parte, el entrecruzamiento químico es una técnica que se utiliza para mejorar la estabilidad mecánica y térmica en membranas elaboradas a partir de polímeros hidrofílicos [13]. Por lo que, se propone el entrecruzamiento químico de la membrana con ácido succínico (SA), el cual es un agente de entrecruzamiento usado extensamente en el área biológica debido a su biocompatibilidad, el cual permitirá mantener un ambiente húmedo local con alta biocompatibilidad alrededor de la herida.

HIPÓTESIS

La introducción de PAMPS a diferentes concentraciones (5, 10 y 15 % peso) en las membranas de PVA, permitirá mejorar la biocompatibilidad e impartirá actividad antimicrobiana a las membranas microporosas elaboradas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar y caracterizar membranas de mezclas poliméricas de PVA/PAMPS entrecruzadas, evaluar su capacidad de proliferación celular y biocompatibilidad.

Objetivos específicos:

- Optimizar las condiciones de preparación de las membranas de PVA y PVA/PAMPS entrecruzadas, para obtener superficies microporosas.
- Elaborar membranas porosas de PVA y PVA/PAMPS 95/5, 90/10, 85/15 (% m/m) entrecruzadas con ácido succínico (SA) al 10 % (% m/m) con respecto al porcentaje de PVA, utilizando el método de inversión de fases.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las membranas a través de su capacidad de intercambio iónico (IEC), dispersión de energía de rayos-X (EDX), espectroscopia de fotoelectrones de rayos-X (XPS), microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Determinar las propiedades mecánicas a tensión de las membranas y medir su porcentaje de hinchamiento, pérdida de masa y biodegradación.
- Evaluar la biocompatibilidad de las membranas de PVA/PAMPS mediante ensayos *in-vitro* en presencia de fibroblastos de acuerdo con la norma ISO-10993-1-2009.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los polímeros estudiados con al menos tres sepas microbianas adecuadas.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

En los últimos años, la medicina regenerativa ha evolucionado en muchas áreas, tales como la curación de heridas y la regeneración de la piel. A pesar de ello, el tratamiento de las heridas cutáneas agudas y crónicas sigue siendo un reto clínico y una necesidad vital para muchos pacientes. A nivel mundial, en 2004 se reportaron quemaduras y afecciones cutáneas graves en más de 11 millones de pacientes cada año, causado por ataques con ácido, escaldadura, trauma eléctrico o químico, heridas agudas o crónicas, patologías relacionadas con la piel (como úlceras en el pie diabético), fístulas perianales, o comúnmente daños térmicos [14]. En 2016 se reportó que las infecciones por quemaduras fueron la causa más común de morbilidad y mortalidad en la población, con casi el 61% de las muertes causadas por infección [15]. Por otro lado, de acuerdo con Scifinder scholar, de 2016 a la fecha, las publicaciones reportadas en el área de “apósitos poliméricos para heridas”, han aumentado considerablemente, lo cual indica la importancia e interés de la comunidad científica en este enfoque biomédico. Además, en 2019 el costo anual del cuidado de heridas crónicas en Estados Unidos alcanzó un valor de 4.4 billones USD en comparación con 3.1 billones de USD en 2012 [16]. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos importantes para disminuir los costos relacionados al cuidado de las heridas. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos e investigaciones enfocadas al desarrollo de apósitos poliméricos, su comprensión es todavía muy limitada y aún se requieren desarrollar nuevos materiales que cumplan con las características necesarias de regeneración cutánea [17].

1.1 La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, protegiéndolo del medio ambiente contra fuerzas mecánicas, factores químicos, radiaciones, cambios de temperatura y microorganismos que pueden generar infecciones. Manifiesta signos y síntomas de enfermedades sistémicas, previene la pérdida de humedad, y protege al cuerpo de rayos ultravioleta. Además, actúa como receptora sensorial del tacto, temperatura, presión y dolor [18].

Es una “capa protectora” con propiedades únicas: compacta, resistente, pero a la vez elástica, sensible y en continuo cambio. Entre sus funciones se destacan las siguientes:

- 1) Barrera: mantiene el medio interno, oponiéndose a las pérdidas hidroproteicas.
- 2) Protección contra agresiones físicas, químicas y microbiológicas.
- 3) Termorregulación: conserva el calor por vasoconstricción y por la estructura aislante de la hipodermis; y enfría por vasodilatación y evaporación del sudor.
- 4) Protege de los rayos ultravioletas por medio de 2 barreras: la melánica (fabricada por los melanocitos) y la córnea (queratina) fabricada por los queratinocitos, que impiden que los rayos ultravioletas ejerzan su acción dañina sobre el ADN nuclear.
- 5) Percepción múltiple a través de la información captada por millares de terminaciones nerviosas distribuidas sobre su superficie.
- 6) Interviene en el metabolismo de importantes moléculas, como la síntesis de vitamina D.
- 7) Vigilancia inmunológica por medio de las células de Langerhans.
- 8) Se considera como un órgano de expresión, por su capacidad de revelar los estados anímicos muy diversos: vergüenza (rubor), ira (enrojecimiento), temor (palidez), ansiedad (sudor), etc.

En resumen, la piel, a través de todas estas funciones asegura el mantenimiento de la integridad y de la homeostasis del organismo. La piel tiene una superficie aproximada de 2 m², su espesor promedio es de 2 mm, su peso representa el 30% del peso total de un adulto y sus vasos sanguíneos pueden llegar a contener 1800 mL de sangre[19, 20].

La piel es una estructura bilaminar y está compuesta por las capas de epidermis, dermis e hipodermis, como se muestra en la figura 1.1, cada una con diferentes funciones y composición.

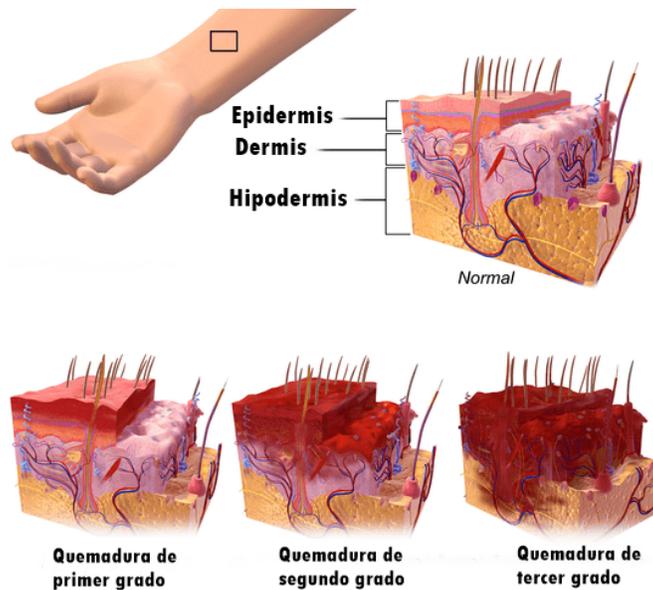


Figura 1.1 Composición de la piel y daño por quemaduras de primer hasta tercer grado [21]

La epidermis, que se encuentra en la superficie, es la capa más delgada. Carece de vasos sanguíneos y está compuesta por melanocitos, queratinocitos, y células Merkel que son un tipo de receptores sensoriales. Los queratinocitos sintetizan la queratina, la cual actúa como una barrera contra el agua, mientras que las células funcionan como una barrera contra las infecciones. El grosor varía de 0.5 mm (en los párpados) hasta 1.5 mm en las palmas de las manos y en las plantas de los pies [21].

La dermis, la capa más gruesa e interna de la piel, contiene a las glándulas sudoríparas, folículos de vello y vasos sanguíneos. Se comunica con la epidermis mediante la membrana basal. Las proteínas que la conforman son laminina y colágeno IV y VII las cuales son sintetizadas por los fibroblastos. Los fibroblastos, además de secretar los componentes de la matriz extracelular, sintetizan factores de crecimiento que auxilian en el proceso de sanación y de angiogénesis. Su grosor es de 0.6 mm en los párpados hasta 3 mm en la espalda, palmas de las manos y en la planta de los pies. La hipodermis es una capa rica en grasa ubicada debajo de la dermis y la separa de la subyacente fascia muscular [21]. Cuando la piel ha estado gravemente dañada por enfermedades, accidentes, traumatismos, cirugías extensas o quemaduras, el cuerpo no puede actuar lo suficientemente rápido para fabricar las células de

reemplazo necesarias, por lo que resulta difícil de tratar, debido al alto riesgo de infección en el área afectada y el daño potencial de las capas más profundas de la piel, incluida la dermis.

Actualmente en la práctica clínica, se tiene como objetivo restaurar la barrera utilizando la piel del paciente, sin embargo, la disponibilidad de tejido donante sano a menudo es limitada en pacientes que sufren traumas graves. En respuesta a estas limitaciones, se proponen sustitutos de piel diseñados a partir de materiales poliméricos naturales o sintéticos ofreciendo enfoques terapéuticos alternativos.

Los sustitutos artificiales de piel están diseñados principalmente para actuar como una barrera para prevenir la pérdida de fluidos e infecciones, además de promover la proliferación celular y reconstrucción de la piel. Se elaboran principalmente con diversos biomateriales como mallas de colágeno, o materiales sintéticos como silicona o nylon, pero también hay algunos sustitutos que se componen de dermis de cadáver [22]. En la práctica clínica ya se emplean diferentes sustitutos de la piel acelular, algunos comercialmente disponibles como Integra, que se compone de una membrana de silicona y una capa de colágeno bovino y 6-sulfato de condroitina. Dicho material sirve para preparar el lecho de la herida para el trasplante y es ampliamente utilizado para tratar diferentes patologías, como defectos cutáneos y heridas parcialmente profundas. Desafortunadamente, los sustitutos de la piel acelular muestran algunas limitaciones, como una función de barrera deficiente y una vida útil corta.

Como se describe en la tabla 1.1, diversos materiales poliméricos se han usado en forma de membranas, espumas o hidrogeles [15]. La forma más utilizada para su aplicación como apósitos es como hidrogel, sin embargo, la desventaja que presentan es su baja estabilidad mecánica en estado hinchado. Esta desventaja se ha solucionado mediante el uso de “membranas de hidrogel compuestas o híbridas” que consisten en más de un polímero en la composición del apósito. Además, las membranas poliméricas funcionan como una barrera de protección y permiten que las células especializadas tales como los fibroblastos periodontales o las células óseas migren y regeneren correctamente los tejidos óseos.

Tabla 1.1 Materiales Poliméricos para apósitos de heridas actualmente disponibles [15]

<u>Tipo de apósitos</u> <i>Materiales para vendaje artificial</i>	<u>Nombres de marca</u>	<u>Descripción</u>	<u>Aplicación</u>	<u>Tasa de utilidad global (%)</u>
Películas poliméricas	<i>Tegaderm, Blister, Poly skin II, Silon-TSR, Opsite, Aluderm</i>	Películas sintetizadas a partir de poliuretano o algún otro material polimérico	Heridas superficiales y causadas por láser Sitios de defectos de cirugía Lesiones cutáneas laceradas	8
Espumas poliméricas	<i>Flexzan, Biopatch, Crafoams, Biatain, Cutinova, Reston, Lyofoam</i>	Apósitos sintetizados a partir de espumas hidrófilas y soporte hidrofóbico o semipermeables con membranas no absorbentes, por ejemplo, polioxietilenglicol cubierto de poliuretano o silicona / poliéster.	Heridas crónicas Quemaduras Cirugía de Mohs Heridas por rejuvenecimiento con láser	5
Hidrogeles poliméricos	<i>Cultinova Gel, Biolex, TegaGel, Carrasyn, NuGel, 2nd Skin Flexderm, Exu Dry Dressing, CarraSorb, Gel para heridas</i>	Hidrogeles sintetizados a partir de polímeros hidrofílicos entrecruzados, tales como, poli-(alcohol vinílico), poli (pirrolidona de vinilo) u óxido de poli (óxido de etileno).	Exfoliación por quimioterapia Úlceras Heridas de espesor medio Sitios de donantes de injertos y heridas de órganos artificiales.	43
Alginatos poliméricos	<i>AlgiSite, AlgiDerm, Sorbsan, Kaltostat, Omiderm.</i>	Hidrogeles de alginato sintetizados a partir del entrecruzamiento químico de alginato de sodio (extraído de algas) con soluciones salinas de Ca, Mg o Zn.	Quemaduras Heridas quirúrgicas y de alto exudado. Úlceras crónicas	20

Hidrocoloides poliméricos	<i>Iodosorb (Cadexomer), Debrisan (Dextranomer), Sorbex, Duoderm (Mezcla de polímeros)</i>	Hidrocoloides sintetizados por inmovilización de yodo en almidón modificado soluble en agua a base de perlas de cadexomeriodina. El gel se forma por intercambio de yodo entre el material polimérico y los exudados de la herida.	Úlceras crónicas Quemaduras Heridas de espesor medio. Sitios de injerto de donantes	24
----------------------------------	--	--	--	----

1.2 Requisitos que debe cumplir un material con aplicación en la reparación o curación de tejido cutáneo

De acuerdo con lo reportado por Kamoun et. al [17], un material aplicado como apósito para heridas debe cumplir las siguientes características:

- a) Mantener un ambiente húmedo local alrededor de la herida, lo cual significa que el material debe poseer un alto grado de hinchamiento en agua.
- b) Poseer elevada permeabilidad a los gases, en particular al oxígeno, lo cual permita la ventilación de la herida.
- c) Remover el exceso de exudados generado por la herida, sin alcanzar la saturación en la superficie externa de la herida.
- d) Que funcione como una barrera de protección de la herida contra microorganismos, infecciones o contaminaciones.
- e) Estimular el factor de crecimiento celular.
- f) Poseer buenas propiedades mecánicas
- g) Ser fáciles y cómodos de remover. Biocompatibles, biodegradables no tóxicos, elásticos y fácil de esterilizar
- h) Comerciablemente aceptable y costeable. Además de fáciles de esterilizar

La figura 1.2 ilustra la estructura normal de la piel y el diseño ideal que debe contener el material aplicado como apósito o membrana para regeneración de heridas de la piel.

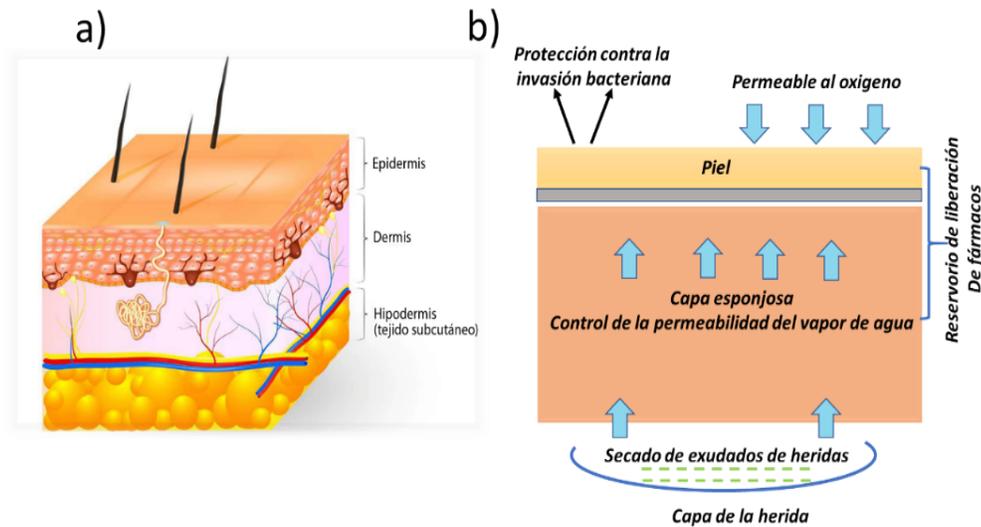


Figura 1.2 a) Representación esquemática de la estructura de la piel y b) diseño de una membrana ideal para vendajes [17].

1.3 Membranas poliméricas

En la actualidad, la tecnología de membranas poliméricas es de cuantiosa importancia debido a sus diferentes aplicaciones en el sector industrial y en el área biomédica. Dentro de las aplicaciones biomédicas encontramos, por ejemplo, su uso en implantes quirúrgicos, como membranas protectoras y membranas de hemodiálisis usadas como terapia clínica vital para los pacientes con enfermedad renal terminal, membranas para implantes de órganos, curación de heridas, formación ósea y regeneración de piel, generalmente conocidas en esta última aplicación como andamios [17-19]. En la regeneración de piel, se ha utilizado, por ejemplo, poliuretano para la elaboración de membranas poliméricas, las cuales presentan propiedades y ventajas como flexibilidad, transparencia, adhesión, buena permeabilidad a los gases, impermeable a las bacterias y fluidos, así como fácil control de la herida a través de la película. Sin embargo, presenta dificultad al manejo y no es absorbente lo que conlleva a la acumulación de los exudados de la herida y fácil invasión bacteriana e infección [17].

Una membrana es una interfase entre dos fases adyacentes que actúan como una barrera selectiva, es decir: “la región que actúa como barrera entre dos fluidos restringiendo o

favoreciendo el movimiento de uno o más componentes, de uno o ambos fluidos a través de la misma”, como se muestra en la figura 1.3 [24]. El transporte a través de las membranas ocurre como consecuencia de una fuerza impulsora; es decir, una diferencia en el potencial químico por un gradiente a través de la membrana, por ejemplo, concentración o presión, o por un campo eléctrico.

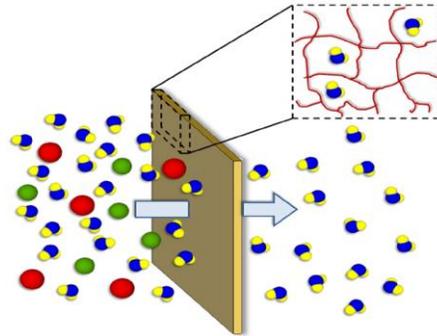


Figura 1.3 Esquema del transporte selectivo de las membranas poliméricas [26]

1.3.1 Importancia morfológica de la membrana

La morfología de la membrana es de vital importancia para su aplicación final, ya que factores como la permeabilidad, selectividad o biocompatibilidad superficial para interactuar con un sistema biológico, determinan la eficiencia y desempeño de la membrana. Para aplicaciones biomédicas dirigidas a la regeneración tisular es necesario obtener una morfología asimétrica, con tamaños de poro delimitados, esto debido a su interacción con células que presentan tamaños definidos. Por lo tanto, es de vital importancia el estudio de la estructura morfológica de las membranas y las técnicas a utilizar para su fabricación, así como el control de la topografía, rugosidad de la superficie, porosidad, forma y tamaño de poro [25].

Como dicta la literatura, según su la aplicación de la membrana, es importante tomar en cuenta ciertos aspectos para la fabricación de la membrana, los cuales se mencionan a continuación [24]:

- Materiales.
- Sección transversal de la membrana: simétrica o asimétrica, multicapa, bicapa, capa delgada o compuesto de matriz mixta.
- Método de preparación
- Forma de la membrana

1.3.2 Morfología según su estructura

Las membranas poliméricas se dividen en dos grupos haciendo referencia a su estructura interna, porosas y no porosas (densas), como se muestra en la figura 1.4. Se considera que una membrana es porosa si tiene poros con un diámetro superior a 2 nm. Por el contrario, si no existe evidencia de poros de ese tamaño, se considera que la membrana es densa, aunque se admite que puede contener huecos con diámetros comprendidos entre 1 y 2 nm, que están más relacionados a las distancias entre cadenas poliméricas [24].

En el caso de membranas porosas, su selectividad está determinada principalmente por el tamaño y la dispersión de tamaño de los poros, que a su vez se ve afectada por el método de fabricación de la membrana. Sin embargo, la naturaleza del polímero en estas membranas microporosas afectará a propiedades como la adsorción física o química y la estabilidad (química, mecánica y térmica) [26].

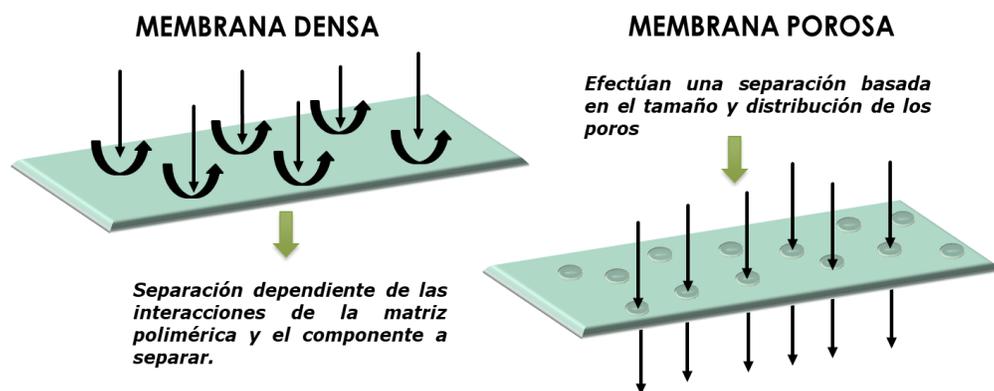


Figura 1.4 Diferencia morfológica y funcional que presentan las membranas densas y porosas

1.3.3 Métodos de elaboración

La selección de una técnica para la fabricación de membranas de polímeros depende de la elección del polímero y la estructura deseada de la membrana. Los tres métodos más utilizados para la preparación de membranas son:

a) Precipitación por evaporación de disolvente

Esta técnica consiste en verter una disolución polimérica sobre un soporte, ya sea de vidrio, metal o aluminio y dejar evaporar el disolvente, controlando la temperatura y la atmósfera del medio para obtener una membrana densa y homogénea [27].

b) Evaporación controlada

También conocido como el proceso por vía seca; esta técnica consiste en disolver el polímero en una mezcla de un par disolvente/ no-solvente. [27].

c) Precipitación por inmersión.

En este método de preparación, la modulación de un parámetro termodinámico (por ejemplo, el parámetro de solubilidad o la temperatura) puede inducir la separación de fases de una solución polimérica homogénea en una fase rica en polímero y una fase pobre de polímero, dando lugar a la formación de la estructura porosa algunas veces asimétrica de la membrana.

La morfología y la porosidad de la membrana final se consolidan después de la mezcla por cristalización, gelificación o mecanismos de vitrificación de la fase rica en polímero [28].

El método de fabricación de membranas porosas influye en el tamaño de poro y morfología [28]. Las técnicas más utilizadas para la preparación de membranas poliméricas porosas incluyen: inversión de fase, polimerización interfacial, estiramiento, grabado y electro spinning.

1.3.4 Inversión de fases

El proceso de inversión de fase es el más empleado y versátil en la fabricación de membranas asimétricas. Se ha convertido en una técnica estándar debido a su accesibilidad y posible control del proceso, permitiendo predecir la morfología de la membrana polimérica. Cuando una capa delgada de solución polimérica entra en contacto con un no disolvente del polímero, éste solidifica y forma una membrana asimétrica [29].

Al menos tres componentes están involucrados en este proceso: el polímero (que forma la membrana), el disolvente (que disuelve el polímero para formar una solución polimérica de concentración deseable), y el no solvente (el cual precipita el polímero, pero es miscible*) en todas las proporciones con el disolvente. La estructura de la membrana se ve afectada por las propiedades físicas y químicas de estos tres componentes. La estructura comúnmente observada es una capa superior densa sostenida por una capa porosa fina que contiene poros de tamaños similares, o una capa superior delgada soportada por una capa muy porosa que contiene en su mayoría grandes poros [30].

Es así como se puede describir la inversión de fase, como un proceso de mezcla mediante el cual la solución polimérica inicialmente homogénea se transforma de manera controlada de un estado líquido a un estado sólido. Esta transformación se puede lograr de varias maneras:

**Miscible: capacidad de constituir una solución homogénea más allá de las proporciones implicadas*

(a) Precipitación por inmersión.

La solución polimérica se sumerge en un baño de coagulación sin disolvente (típicamente agua). La mezcla y la precipitación se producen debido al intercambio de disolvente (de la solución del polímero) y no solvente (del baño de coagulación), es decir, el disolvente y el no solvente deben ser miscibles.

(b) Separación de fase inducida térmicamente.

Este método se basa en un fenómeno donde la calidad del disolvente generalmente disminuye cuando la temperatura disminuye. Después de que se induce la mezcla, el disolvente se elimina por extracción, evaporación o liofilización.

(c) Separación de fase inducida por evaporación.

La solución polimérica se prepara en una mezcla de un disolvente y un no solvente volátil. Al evaporarse el disolvente se lleva a cabo la precipitación de la membrana.

(d) Separación de fase inducida por vapor.

La transformación se logra exponiendo la solución polimérica a una atmósfera que contiene un no solvente (agua por lo general); el vapor de agua en el aire húmedo es atraído hacia el material fundido y, por lo tanto, provoca la separación de fases (VIPS). En particular, cuando el disolvente polimérico utilizado posee una baja volatilidad, pero una alta afinidad por el agua en la etapa seca, la entrada de vapor de agua podría prevalecer sobre la evaporación del disolvente [31].

De las técnicas mencionadas, la precipitación por inmersión y la separación de fase inducida térmicamente son los métodos más comúnmente utilizados en la fabricación de membranas microporosas; sin embargo, más de un factor influye en la morfología y formación de las membranas, por lo que es necesario tener en cuenta todos los materiales involucrados durante su desarrollo, siendo los polímeros seleccionados para su elaboración los que otorgan parte fundamental de sus características finales.

1.4 Materiales poliméricos

Existe una variedad de polímeros biocompatibles adecuados para aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, los polímeros derivados de monómeros acrílicos como el poli-(acrilonitrilo-*co*-cloruro de vinilo) y polilisina han sido investigados para encapsulación de células e inmunoaislamiento. La policaprolactona (PCL) ha sido investigada como dispositivo de administración controlada de medicamentos. Algunos poliésteres y politetrafluoroetileno (PTFE) son usados como reemplazos de tejido vascular; los poliuretanos se utilizan como recubrimientos para el aislamiento de plomo en los marcapasos y para la reconstrucción del menisco. Algunos otros materiales poliméricos que podemos mencionar son, polianhídridos, polimetacrilato de metilo, polifosfacenos y policarbonatos, entre otros [20,21].

Sin embargo, algunos materiales poliméricos presentan limitaciones como son pobres propiedades mecánicas, por lo que requieren ser copolimerizados o entrecruzados [9, 33] o bien, presentan limitada biocompatibilidad y bajo crecimiento celular. Además, un tema importante en el uso de materiales poliméricos para aplicaciones biomédicas que ya ha sido mencionado anteriormente, es el relacionado con la contaminación e infección del material por diferentes microorganismos presentes en el medio ambiente, en particular por bacterias [34].

Por lo tanto, para el desarrollo de membranas para aplicaciones biomédicas y en particular para aplicaciones como apósitos para heridas exudativas, se requieren materiales poliméricos biocompatibles, que promuevan el crecimiento celular y eviten graves infecciones producidas por microorganismos durante el crecimiento del tejido. Además, se requiere que presenten adecuadas propiedades mecánicas y una estructura morfológica porosa adecuada de la membrana polimérica.

1.4.1 Poli-(alcohol vinílico) PVA

El PVA es un polímero termoplástico sintético, biocompatible, no tóxico, biodegradable y con buenas propiedades mecánicas. El PVA se ha utilizado en mezclas y compuestos con polímeros naturales ya que su carácter hidrófilo y con capacidad de formación de película, le confiere cierto grado de compatibilidad con materiales poliméricos naturales. Por lo tanto, tiene una amplia variedad de aplicaciones en el área biomédica, como lentes de contacto, reparación de tendones, administración de fármacos y, como andamios de huesos, cartílagos y válvulas cardíacas [35].

En general, el PVA se procesa en películas, fibras o geles mediante la tecnología de fundición a partir de una solución acuosa. La característica más atractiva del uso del PVA es la abundancia de grupos “hidroxilos” colgantes a lo largo de la cadena principal como se muestra en la figura 1.5, que le permiten llevar a cabo diversas modificaciones químicas tales como entrecruzamientos o la introducción de moléculas biológicas como la colágena [36].

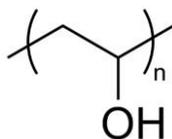


Figura 1.5 Estructura química del PVA

1.4.2 Poli(ácido 2-acriloamido-2-metilpropanosulfónico, PAMPS

El PAMPS es un polímero relativamente ácido, portador de grupos sulfónicos (figura 1.6), posee alta capacidad conductora de protones, alta estabilidad térmica, biocompatibilidad y resistencia hidrolítica al entorno fisiológico. Debido a su carácter altamente hidrofílico (asociado a su carácter iónico) y a su estabilidad hidrolítica, térmica y mecánica, es aplicado como componente activo de fibras acrílicas, adhesivos, películas de embalaje, estabilizadores

de espumas, látex, en el tratamiento de aguas y también en ciertos productos para el cuidado personal como cremas, aceites, etc.[37]

En el área médica, presenta una serie de características que le hacen altamente atractivo debido a que presenta excelente capacidad de absorción de agua (sus derivados pueden considerarse en algún caso como superabsorbentes), lo que lo hace útil en formulaciones de hidrogeles. Además, puede formar complejos con polielectrólitos catiónicos y tiene propiedades lubricantes, adhesivas y es un componente biocompatible [37]. Resaltando en esta área, la propiedad asociada a la naturaleza sulfónica de sus grupos iónicos, la cual es responsable de sus características anticoagulantes por su mimetismo con la heparina (molécula natural con gran actividad antitrombogénica y portadora de grupos sulfónicos).

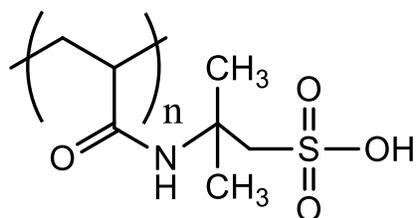


Figura 1.6 Estructura química del PAMPS

1.5 Antecedentes del PVA y PAMPS

Recientemente, Peng y colaboradores (2019) estudiaron las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de hidrogeles de PVA con diferentes concentraciones de quitosano [2]. Estos hidrogeles presentaron alta hidrofiliidad, excelentes propiedades de hinchamiento, propiedades fisicoquímicas y mecánicas estables, así como baja toxicidad y con excelente adhesión y proliferación celular. En el mismo año, Lynda y colaboradores fabricaron un andamio poroso de PVA modificado con ácido cítrico para obtener un polímero biodegradable con subproductos no tóxicos. Los autores reportaron que los andamios de poliéster no presentaban toxicidad y eran biocompatibles con células vasculares de músculo liso, promoviendo su potencial aplicación en el área médica [38].

Jin Jeong y Seungsin Lee en 2019, desarrollaron un apósito de PVA modificado con extractos de *Coptidis Rhizoma*, una planta medicinal que presenta propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antioxidantes y efectos homeostáticos. Los andamios de PVA con 10, 20 y 30% del agente activo exhibieron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus Epidermis*. Estos resultados demostraron que las membranas nanofibrosas de PVA con extractos de *Coptidis Rhizoma* tienen un potencial considerable para ser apósitos antimicrobianos eficaces para curación de heridas [39].

En el 2017, Seda Ceylan y colaboradores utilizaron diferentes concentraciones de PVA con almidón para preparar criogeles. Los criogeles entrecruzados químicamente con glutaraldehído, mostraron alto potencial para ser aplicados como andamios en ingeniería de tejidos [40]. En 2006, Azuma y colaboradores evaluaron las propiedades de biodegradación de 4 hidrogeles obtenidos a partir de PAMPS/poli(N,N'-dimetilacrilamida) y su aplicación como cartílago artificial. Los resultados demostraron que los hidrogeles pueden ser aplicados como cartílagos artificiales debido a la alta tenacidad que presenta el material, su afinidad hacia las células y tejidos y su nula toxicidad [41]. Por otra parte, Shan Jiang y colaboradores (2011), reportaron la elaboración de un hidrogel de PVA para imitar el tejido blando en cirugías miniinvasivas, como la braquiterapia. A través de micrografías se observó que el material desarrollado presentó una microestructura similar a la del tejido porcino, con propiedades de deformación similar al tejido prostático, concluyendo así que el material presenta un gran potencial para esta aplicación [42].

Finalmente cabe recalcar que, a la fecha, a pesar del extenso número de antecedentes, no existen reportes sobre el estudio y desarrollo de membranas de superficie microporosa de mezclas de PVA/PAMPS, por lo tanto, se abre una ventana de posibilidades para ser evaluadas como membranas biocompatibles; así mismo, estudios recientes han evaluado las características antimicrobianas del PAMPS ya que, en los últimos años, ha incrementado el interés en resolver el problema de la contaminación provocada por la interacción entre superficies promotoras de bacterias y los materiales poliméricos, contribuyendo al desarrollo de diferentes microorganismos presentes en el medio ambiente y en particular por bacterias. La estrategia más común para fabricar materiales antimicrobianos se basa en la

inmovilización de sustancias sintéticas con capacidad antimicrobiana en la superficie del material y la modificación química superficial de los materiales poliméricos [34]. Además de la modificación superficial, la topografía y morfología superficial juega un papel importante en las propiedades antibacterianas y antiincrustantes, especialmente a escala micro/nano [43].

1.6 Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para provocar una respuesta biológica apropiada en una aplicación dada en el cuerpo. En general, se logra un alto grado de biocompatibilidad cuando un material interactúa con el cuerpo sin inducir respuestas inaceptables tóxicas, inmunogénicas, trombogénicas y carcinogénicas[45, 46, 47].

Sin embargo, hay factores relevantes que deben considerarse para la evaluación biológica del material, como el hecho de que la biocompatibilidad es altamente dependiente anatómicamente, ya que la reacción del cuerpo al material es diferente dependiendo de la zona que se estudia; es decir, si un material puede causar un efecto adverso en un tipo específico de tejido, no necesariamente provocará la misma respuesta si se usa para un tejido de diferente tipo. Además, las características intrínsecas (características esenciales del polímero, relacionadas y controladas por la estructura molecular) del material no determinarán si es biocompatible o no[46].

Por lo tanto, es necesario corroborar a partir ensayos biológicos el comportamiento del material para evitar futuras complicaciones y así poder determinar de una forma fiable los parámetros de uso y aplicación, a través de crecimiento y cuantificación celular, orientado a las variables que se requieren estudiar para determinar la biocompatibilidad del material estudiado de acuerdo con la norma ISO-10993-1-2009 [47].

1.7 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana puede definirse como un término colectivo para todos los principios activos (agentes) que inhiben el crecimiento de bacterias, evitan la formación de

colonias microbianas y pueden destruir microorganismos. La actividad antimicrobiana se refiere a una situación en la que un agente activo tiene un efecto negativo sobre la vitalidad de este tipo de microorganismos. Si el agente activo solo afecta a bacterias u hongos, esto se conoce como actividad antibacteriana o antimicótica, respectivamente[48].

El grado del efecto se denota por el sufijo suficiente (o letal) donde hay una actividad germicida significativa o el sufijo estático donde el principio activo sirve para inhibir el crecimiento de bacterias. En consecuencia, el término bacteriostático se refiere a un agente, que inhibe temporalmente el crecimiento de una población bacteriana específica sin destruir esta población, o sin poder multiplicarse en un grado significativo [48].

El control de las infecciones de heridas es un desafío importante en el cuidado de las quemaduras y es la causa más común de mortalidad después de la lesión [49]. Los patógenos han evolucionado con el tiempo y el uso de antibióticos es de amplia importancia, sin embargo, los organismos y hongos son resistentes a múltiples fármacos presentando el gran desafío de mejorar la efectividad de los antimicrobianos tópicos y sistémicos, lo cual es primordial para controlar la morbilidad y mortalidad en pacientes con quemaduras y afecciones dermatológicas [50].

Los organismos bacterianos que causan infección por quemaduras pueden clasificarse en dos grupos; *gram-negativos* y *gram-positivos*. Las bacterias *gram-negativas* causan la mayoría de las infecciones de heridas por quemaduras. La infección de las quemaduras por *Pseudomonas aureuginosa*, la neumonía por *Klebsiella* y *Escherichia coli* y el organismo *gram-positivo* *Staphylococcus aureus* son predictores independientes de mortalidad. Además, *Staphylococcus aureus* es la principal causa de infecciones por quemaduras *gram-positivas* a nivel mundial y una causa común de septicemia [52, 53].

En la última década, se han investigado diversos enfoques innovadores y alternativas de tratamiento tópico antimicrobiano para las heridas expuestas que no cicatrizan e inducen a una resistencia mínima a los antibióticos. Algunos de estos tratamientos se resumen en la Tabla 1.3.

Tabla 1.2 Agentes de control bacteriano [53]

Agente antimicrobiano	Sistema de liberación	Organismos probados
Ciprofloxacina	Hidrogel de queratina	<i>Pseudomonas</i>
Curcumina	Encapsulación de nanopartículas	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metacilina, <i>Pseudomonas</i>
LLKKK18	Hidrogel Carbopol	<i>Pseudomonas</i>
Gentamicina	Vendaje para heridas híbrido de doble capa	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Óxido nítrico	Película polimérica	<i>S. aureus</i>
Mupirocina	Liposomas en hidrogel	<i>Pseudomonas</i>
Gentamicina	Malla de poligluconato y matriz PDLGA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metacilina. <i>Pseudomonas</i>
Clorhexidina	Hidrogel bicapa y espuma de quitosano	<i>S. aureus, Pseudomonas</i>
Anfotericina B	Hidrogel de nanopartículas	<i>Candida spp.</i>
Boro / copolímeros plurónicos	Hidrogel a base de carbopol	Bacterias, levaduras, hongos

Las innovaciones generalmente implican nuevos métodos para administrar antibióticos como por ejemplo, antimicrobianos alternativos como la curcumina, nanopartículas metálicas y macromoléculas con propiedades biocidas. Sin embargo, la combinación de medicamentos no siempre muestran un efecto sinérgico, también pueden producir efectos adversos, como estimular resultados negativos o crear resistencia bacteriana, lo que conlleva a la inhibición en la función de los medicamentos [54].

Los pacientes críticamente enfermos que presentan lesiones graves por quemaduras tienen una fisiología sustancialmente alterada, lo que puede disminuir profundamente las concentraciones de antibióticos en el tejido, lo que culmina en el fracaso terapéutico y la

aparición de resistencia bacteriológica. En ocasiones se necesita una terapia combinada para evitar el desarrollo de resistencia en infecciones difíciles de tratar o en infecciones asociadas a biopelículas tratadas con biocidas comunes. La combinación con polímeros o sustancias naturales puede proporcionar sistemas duales que actúen en conjunto para acceder a una nueva generación de polímeros antibacterianos que poseen un bajo riesgo para la salud [54].

Los polímeros con propiedades antimicrobianas, en particular los polímeros catiónicos, han surgido como una alternativa interesante y prometedora. Estos materiales, en comparación con los antibióticos convencionales que tienen un efecto enfocado a procesos biológicos específicos, actúan principalmente por interacciones electrostáticas de sus componentes catiónicos con la membrana bacteriana cargada negativamente, lo que contribuye a la ruptura de la membrana y finalmente la lisis celular [55]. Este mecanismo de acción rápida, dificulta la resistencia bacteriana [56].

Una gran variedad de polímeros catiónicos con grupos colgantes como el amonio cuaternario, imidazolio, piridinio, triazolio o grupos fosfonios, los poli(líquidos iónicos) catiónicos y aniónicos, así como los polímeros sulfonados [55] han sido extensamente investigados como compuestos antimicrobianos, debido a su amplio espectro de actividad y porque no inducen resistencia bacteriana [58, 59].

Yixi Wang y colaboradores (2017), desarrollaron hidrogeles de celulosa cuaternizada (QCE) con injertos de poli(acido acrílico) (PAA) y PVA, los cuales presentaron propiedades antibacterianas y de autocuración [59]. En el mismo año Yadav y colaboradores, sintetizaron polietilenimina lineal conjugada con tetrametilguanidinio y determinaron bioensayos de inhibición antibacteriana, obteniendo como resultado una mejora significativa en la actividad antibacteriana. También, otros polímeros como la poli-(4-vinil piridina) (P4VP) y el poli-(trifluoroacetato de dialilamonio) (PDAATFA) han sido ampliamente estudiados para determinar su efecto antimicrobiano [57]. A pesar de las considerables investigaciones en esta área, aún deben resolverse varios desafíos para continuar mejorando el cuidado actual de las quemaduras; en particular, se debe priorizar la investigación sobre cómo acelerar la

cicatrización de heridas, controlar la infección sistémica y reducir el tiempo total de recuperación funcional [53].

1.8 Agentes de entrecruzamiento

Los agentes de entrecruzamiento químico se usan con la finalidad de evitar parcialmente la solubilidad y pérdida de las propiedades fisiológicas y mecánicas de la membrana, gracias a la limitación de movimiento entre las cadenas poliméricas. El entrecruzamiento y los puntos de ramificación son uniones reales de conexión entre dos o más segmentos de la misma cadena o de diferentes cadenas. La red tridimensional del polímero es estabilizada por el agente entrecruzante, el cual puede presentar enlaces covalentes, cargas complejas, enlaces de hidrógeno, o interacciones hidrófobas [60].

En el caso de los hidrogeles, el grado de entrecruzamiento que éste tenga determina sus propiedades de hinchamiento y, por tanto, su aplicabilidad. Existen diferentes tipos de agentes entrecruzantes como lo son el glutaraldehído, diisocinato de hexametileno (HMDC), cianamida, carbodiimida (EDC), difenil fosforil azida (DPPA), que cumplen con las características necesarias de entrecruzado. Sin embargo, la mayoría son agentes muy poco usados en procesos biológicos debido a su toxicidad o dificultad de uso durante el proceso. El ácido succínico (SA) (figura 1.7), es un agente de entrecruzamiento químico que actualmente ha sido probado en ensayos biológicos con resultados favorables. El SA es un ácido dicarboxílico que se encuentra en la naturaleza en organismos como los hongos y líquenes. Además, este agente es aprobado y verificado como un producto no tóxico para las células, en cantidades menores de uso, además de ser reconocido como seguro por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA) [62, 63].

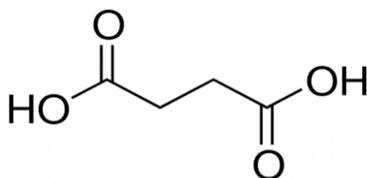


Figura 1.7 Estructura química del SA

CAPITULO II. METODOLOGÍA

2.1 Materiales y solventes

- ✓ Poli-(alcohol vinílico) (PVA) MW:78,000 g/mol (98 mol % hidrolizado)
- ✓ Poli-(2-acrilamido- 2- metil-1-propanosulfónico) (PAMPS) MW:2,000,000 g/mol (15wt. % en H₂O)
- ✓ Acido succínico (SA) MW:118.09 g/mol al (99.0 %)
- ✓ Disolventes: H₂O HPLC, isopropanol, 1-propanol, etanol

* Todos los materiales enlistados con anterioridad se adquirieron en la empresa Sigma-Aldrich

2.2 Preparación de mezclas

Las membranas porosas se elaboraron usando PVA con diferentes concentraciones de PAMPS (0, 5 10 y 15 % en masa respecto al PVA) y se entrecruzaron con ácido succínico (SA) al 10 % en peso (respecto al PVA).

Las mezclas poliméricas se prepararon en una solución al 10 % (peso/volumen) en agua, tomando en cuenta las concentraciones propuestas, de la siguiente manera:

Primero, se disolvió el PVA en agua bidestilada desionizada en un baño de agua a 90 °C por 5 horas con agitación, hasta tener un aspecto homogéneo, transparente y altamente viscoso. Se dejó enfriar la solución, posteriormente se agregó la cantidad adecuada de PAMPS y se disolvió a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, se añadió el agente entrecruzante (SA) y se agitó por 17 horas.

2.3 Elaboración de membrana porosa por inversión de fase

La solución polimérica (30 mL) se vertió y rasó sobre una placa de aluminio, usando una cuchilla para rasado de película graduada con un espesor de 100 µm (Ver figura 2.1 A y B). Posteriormente, se sumergió en un baño de coagulado (400 mL) previamente puesto a

temperatura ambiente (25 °C). Para la elaboración de la membrana de PVA puro se utilizó el baño a 40 °C (Ver figura 2.1 C).

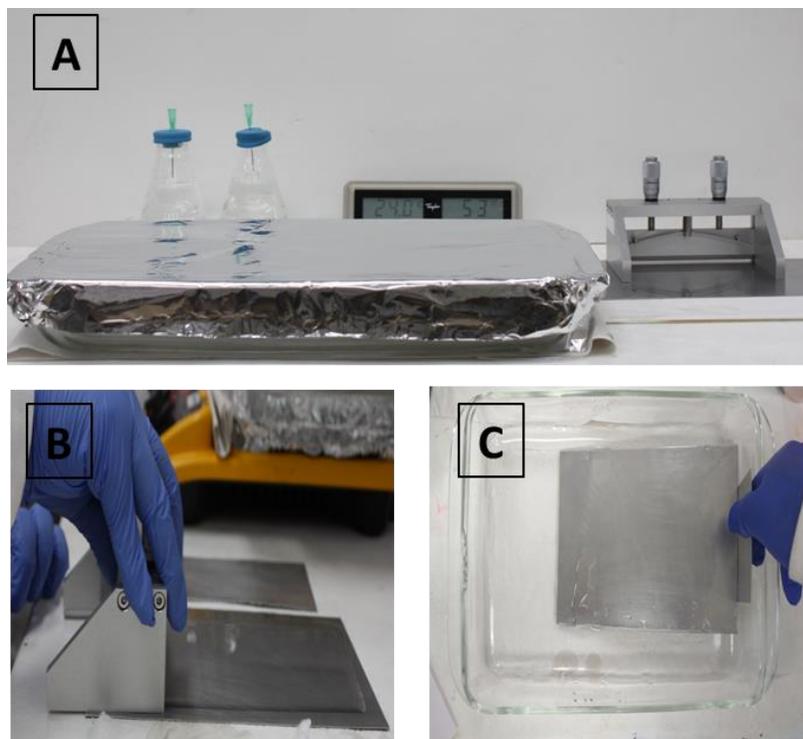


Figura 2.1 Proceso de formación de las membranas por el método de inversión fases A) preparación de la soluciones poliméricas y sistema de coagulado atemperado, B) rizado de la solución polimérica y c) introducción de la solución en el sistema de coagulado para iniciar la inversión de fases.

Se usaron diferentes baños de coagulación como son: etanol, 1-propanol, 2-propanol y mezclas de disolventes según la compatibilidad del PVA con los disolventes y no solventes, reportados con anterioridad en la literatura (Tabla 2.1) [8, 64]. Una vez formada la membrana, se retiró y lavó con agua destilada para eliminar cualquier disolvente residual. Finalmente, la membrana se secó a 60 °C por 24 horas en una estufa de vacío.

Tabla 2.3 Disolventes y no-solventes reportados para la preparación de membranas porosas de PVA

PVA	
<i>Disolvente</i>	<i>No-solvente</i>
<i>Agua</i>	<i>1-Propanol</i>
	<i>2-Propanol</i>
	<i>Etanol</i>

2.4 Entrecruzamiento químico de la membrana con SA

El entrecruzamiento químico con SA se llevó a cabo a 100 °C por 1 hora, por esterificación de los grupos hidroxilos del PVA con el SA, como se muestra en la figura 2.2. Se siguió el protocolo de entrecruzamiento establecido para membranas densas de PVA/PAMPS, de acuerdo con lo reportado por Corzo-González y colaboradores [64].

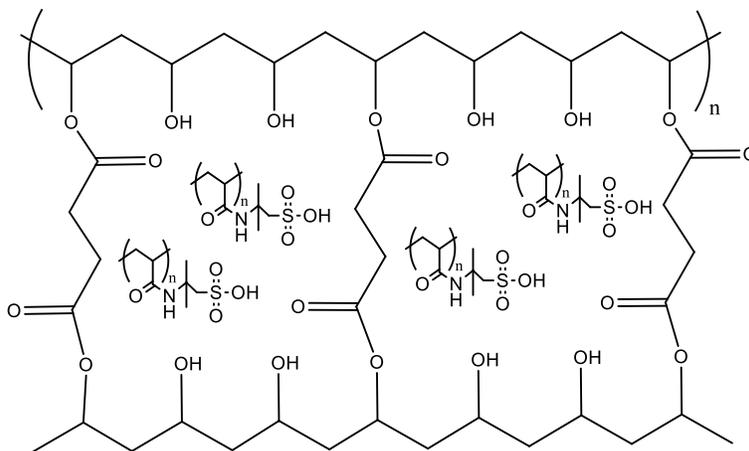


Figura 2.2 Estructura química general de las membranas de PVA/PAMPS entrecruzadas con SA

2.5 Caracterización de la membrana

2.5.1 Caracterización morfológica y funcional de la membrana

La capacidad de intercambio iónico (IEC por sus siglas en inglés) se determinó mediante una titulación ácido / base.

La morfología superficial y transversal de las membranas se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM). La espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS) y de dispersión de energía rayos-X (EDX) se utilizaron para cuantificar la composición de azufre presente en la sección superficial y transversal de las membranas, respectivamente.

Las pruebas mecánicas de tensión, hinchamiento y pérdida de masa se llevaron a cabo para determinar la resistencia de las membranas y corroborar su entrecruzamiento. A continuación, se describen a detalle cada una de las técnicas de caracterización empleadas.

- Determinación de grupos sulfónicos por capacidad de intercambio iónico (IEC)

La IEC indica el número de equivalentes de iones $[H^+]$ de los grupos sulfónicos por gramo de membrana. En este trabajo la titulación ácido-base se presenta como alternativa para su cálculo.

Una titulación ácido-base procede mediante una reacción de neutralización, en la que se hace reaccionar un ácido con una cantidad equivalente de base. Mediante la construcción de una curva de titulación se detecta el punto de equivalencia de la reacción [65].

Para determinarlo, las membranas se secaron en un horno de vacío a 60 °C por 24 horas; después se cortaron muestras de membrana de 3 x 3 cm, se pesaron y se sumergieron en 5 mL de una solución de cloruro de sodio (NaCl) 1M por 24 horas. Posteriormente, las membranas se retiraron de la solución de NaCl y a esta solución se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con una solución de NaOH 0.01 N, la cual se agregó de a 0.5 mL con ayuda de una micropipeta, mientras se toma lectura del pH con un potenciómetro, hasta llegar al equilibrio. Con los datos obtenidos, se realizó una curva de pH (primera o segunda

derivada) obtenidos en cada lectura *vs* el volumen de NaOH gastado, para observar el punto de inflexión. Finalmente, se calculó el IEC con la ecuación (1).

$$IEC = \frac{C_{NaOH} \times V_{NaOH}}{ms} Ec(1)$$

Donde C_{NaOH} es la concentración de la solución de NaOH, V_{NaOH} es el volumen de solución de NaOH gastado y ms es la masa de la membrana seca.

- Caracterización por Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Para confirmar el entrecruzamiento químico, las membranas se caracterizaron por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , con el equipo correspondiente (espectrofotómetro Nicolet 8700 FTIR-Thermo Scientific). Se hicieron comparaciones de los espectros de las membranas antes y después de entrecruzar mediante un análisis en modo absorbancia.

- Caracterización por microscopia electrónica de barrido (SEM)

La caracterización morfológica se realizó con un microscopio electrónico marca JEOL-JSM-6360LV (figura 2.3), usando una fracción de membrana de 0.5 cm de diámetro para la vista superficial y para la vista transversal se usó una muestra de membrana previamente fracturada en nitrógeno líquido. Estas muestras se cubrieron con una capa de oro como paso previo a la prueba de SEM en el equipo de metalización DENTON VACUUM DESCOPE.



Figura 2.3 Microscopio electrónico - JEOL-JSM-6360LV

- Espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X (XPS)

Este análisis se realizó para determinar la composición superficial de las membranas de mezclas PVA/PAMPS. El análisis se llevó a cabo en el laboratorio Nacional de Bio y Nano Materiales del Cinvestav Unidad Mérida, usando un equipo de espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS) Thermo Scientific K-Alpha, a condiciones de alto vacío con una fuente de rayos X monocromática Al K α con una energía de 1486.6 eV y potencia de 40 W a 12 kV.

- Dispersión de energía de rayos-X (EDX).

La espectrometría de dispersión de rayos X es una técnica de análisis elemental asociada a la microscopía electrónica de barrido, basada en la generación de radiografías características que revela la presencia de elementos presentes en las muestras. Este análisis se realizó con la finalidad de corroborar la composición elemental en el área transversal de la membrana, utilizando un espectrómetro de dispersión R-X (EDX) acoplado al microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM-6360LV.

Determinación del grado de absorción e hinchamiento de la membrana

Para determinar el porcentaje de absorción por gravimetría, se sumergieron muestras de membranas de peso conocido en una solución de buffer de fosfatos salino (PBS) y se tomaron los pesos de las muestras cada 24 horas por 21 días. Los valores de porcentaje de absorción se obtuvieron por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de absorción (\%)} = \frac{(W_h - W_f) \times 100}{W_0} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde W_0 , es la masa inicial de la muestra seca, W_f es la masa final seca y W_h es la masa de la membrana hinchada.

Además, para conocer el incremento del volumen de la membrana o hinchamiento en el transcurso del tiempo, se midió la longitud y el espesor de las muestras hinchadas cada 24 horas con ayuda de un vernier digital y un especímetro digital mitutoyo (figura 2.4).



Figura 2.4 Especimetro y vernier digital de la marca Mitutoyo

- Determinación de pérdida de masa y degradación de la membrana

Esta prueba se realizó por duplicado a todas las membranas con y sin entrecruzamiento. Para el análisis, se usaron muestras de aproximadamente 1 cm x 1 cm con un espesor entre 150-200 μm , registrando su masa inicial (W_0). Cada muestra se sumergió en 5 mL de PBS con un pH de 7.2 a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 21 días.

Después de 21 días, cada muestra se secó con papel filtro y se secó por 24 horas en un horno a 60 $^{\circ}\text{C}$ en vacío. Finalmente, se registró la masa final (W_f) calculando la pérdida de masa a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de pérdida de masa (\%)} = \frac{(W_0 - W_f) \times 100}{W_0} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde W_0 , es la masa inicial de la muestra seca y W_f es la masa final seca.

Las pruebas de degradación se llevarón a cabo de manera similar al reportado para la determinación de la pérdida de masa, con ciertas modificaciones; por ejemplo, se incrementó la temperatura a 37 $^{\circ}\text{C}$, se mantuvo una humedad relativa del 90% y 5% de CO_2 por 6 semanas, siguiendo las condiciones de incubación celular de acuerdo con lo reportado en la literatura [66].

Análisis estadístico

Para las pruebas de hinchamiento y degradación los experimentos se realizaron por triplicado para cada muestra y repetidos independientemente en dos ocasiones, por tanto, los datos

mostrados son representativos de los ensayos realizados en este estudio. El porcentaje de hinchamiento y degradación fue determinado por análisis de varianza de una vía (ANOVA) tomando en cuenta la concentración del material. La diferencia fue considerada significativa con un valor de $p \leq 0.05$. Los datos se analizaron con el software *Statgraphics Centurion XVI*.

- Caracterización mecánica de la membrana (resistencia a tensión)

Los ensayos de resistencia a tensión se realizaron de acuerdo con la norma ASTM D882-02 usando un equipo de pruebas universales Mini-Shimadzu modelo AGS-X con una celda de carga de 100 N.

Cada ensayo se realizó con 5 repeticiones para cada membrana de PVA/PAMPS (100/0, 95/5, 90/10 Y 85/15 % m/m), usando probetas con dimensiones de 2 mm x 0.5 mm de área de membrana (película) y 300-400 μm en grosor para las membranas secas y húmedas. Las pruebas usando membranas secas y húmedas se realizaron con diferentes velocidades de desplazamiento. Con las membranas previamente secas por 24 horas a 60 °C, el ensayo se realizó a una velocidad de desplazamiento de cabezal de 1 mm/min. El ensayo con las membranas previamente sumergidas por 24 horas en PBS (pH: 7.2); se secaron con papel filtro y para el ensayo fue necesario incrementar la velocidad de desplazamiento a 5 mm/min debido a la elevada elasticidad que presentaron las muestras húmedas.

La importancia de la prueba a condiciones húmedas radica en la necesidad de comparar el comportamiento de los esfuerzos mecánicos de la membrana sintética con respecto a la piel.

2.5.2 Caracterización biológica de la membrana

Para determinar la biocompatibilidad de las membranas se realizaron las pruebas de viabilidad y proliferación celular en presencia de fibroblastos humanos, así como citotoxicidad y actividad antimicrobiana de acuerdo con la norma ISO-10993-5-2009.

La norma ISO 10993-1-2009 tiene como objetivo proteger a los humanos de los posibles riesgos biológicos derivados del uso de dispositivos médicos. Presenta información importante sobre la evaluación biológica de los dispositivos médicos dentro de un proceso de gestión de riesgos [68, 48, 69].

- Obtención de células para el ensayo experimental *in vitro*

Para el ensayo experimental *in vitro*, la primera parte consistió en la obtención de la biopsia de piel humana. La biopsia se obtuvo mediante un sacabocado de 2 mm de diámetro, con el cual se colectó una muestra. La biopsia obtenida se lavó con solución estéril de PBS para eliminar todos los restos de sangre o trazas de materiales o impurezas que pudieran encontrarse adheridos a la muestra. La digestión de la matriz extracelular y la separación de los fibroblastos incluidos en la matriz se llevó a cabo incubando las muestras a 37 °C por 30 minutos en 1.5 mL de tripsina (0.25%). Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 minutos para obtener el cultivo primario de fibroblastos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, y se recuperó el botón celular, el cual se volvió a suspender en 2 mL de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) rico en glucosa (CAISSON D5796) suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina CAISSON A5955) y suero fetal bovino (SBF- CAISSON F9665) al 10%. Enseguida la solución se depositó en un frasco de cultivo de 75 cm² de superficie (BD FalconTM).

Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono, y con 90% de humedad, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo se renovaron cada tres días.

Obtenido el 80% de confluencia celular, el cultivo celular de fibroblastos se lavó con 2 mL de PBS estéril y se incubó en 3 mL de una solución de tripsina a 37 °C durante 10 minutos para obtener células individualizadas o no adheridas a la superficie del frasco de cultivo.

Una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina mediante la adición de 1 mL de medio de cultivo DMEM. La presencia

de abundantes proteínas séricas en el medio de cultivo DMEM es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células ya desprendidas se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 minutos a 4 °C para después retirar el medio por decantación y suspender de nuevo el botón celular con 2 mL de medio DMEM para proceder al conteo celular.

- **Conteo celular**

El conteo celular es un procedimiento en donde se calcula la cantidad de células contenidas en un volumen determinado mediante la toma de una alícuota de la suspensión que se desea analizar. Las células son mezcladas con azul de tripano, un colorante que penetra únicamente las células cuya membrana no se encuentre íntegra, tiñéndolas de azul, diferenciándose de las células vivas que se observan transparentes. Este procedimiento se lleva a cabo mediante el uso de una cámara de Neubauer o hemocitómetro, que es una placa de vidrio y un cubreobjetos especial, que tiene grabada una cuadrícula en su parte central.

Con una micropipeta se tomó una alícuota de 10 µl de células en suspensión colocándolas en Parafilm y mezclándola con 10 µl de azul de tripano al 4%; de esta mezcla se tomaron 10 µl. La alícuota se colocó en una cámara de Neubauer y se procedió a realizar el conteo celular en un microscopio óptico, utilizando los 4 cuadrantes laterales y sacando un promedio. Para la cuantificación las células únicamente se consideraron las células que estuvieran dentro del cuadrante (figura 2.5).

Finalmente, el número de células en 10 µl se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{A+B+C+D}{4} \times 10,000 \times 1\right) = \text{Numero de celulas} \times 10\mu\text{l} \times \text{N}^\circ \text{ de dilusi3n}$$

- En donde *A, B, C, D*: Numero de células por cuadrante de la cámara Neubauer

-Se multiplica por 10,000 ya que es la constante utilizada para la cámara de Neubauer

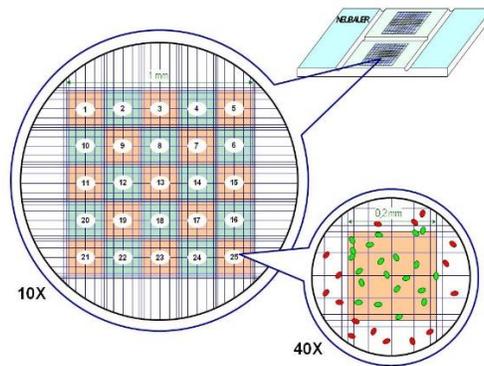


Figura 2.5 Esquema general de la cámara de Neubauer utilizada para el conteo celular [72]

Una vez obtenido el conteo celular final de los fibroblastos se sembraron en cajas de cultivo a una densidad de 3×10^3 células/mL.

- Preparación de membrana para cultivo de células.

Se cortaron discos de membrana con 3 mm de diámetro y 2 mm de espesor y se esterilizaron con UV (ciclos de 30 minutos por cara de la membrana). Posteriormente, los discos estériles se colocaron en una placa de cultivo celular de 24 pocillos.

Los fibroblastos previamente tripsinizados se cultivaron sobre los discos de membrana esterilizados con anticipación a una densidad celular de 3×10^3 células/mL. Los cultivos celulares se incubaron en una atmósfera humidificada, al 5 % de CO_2 a 37°C , con cambio de medio cada tercer día hasta su posterior análisis.

- Ensayo de proliferación y viabilidad celular

Los cultivos celulares se incubaron con un 10% (volumen/volumen) de reactivo alamarBlue (AB) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

El cambio de color AB es un indicador de la proliferación celular y se cuantificará midiendo la absorbancia a 570 nm en un espectrómetro de UV (Cytation 3-Imaging Reader, marca BioTek Instruments). Las mediciones se realizaron inmediatamente después de la adición de AB (0 horas) y cada 24 horas hasta alcanzar los 4 días de cultivo celular [69].

Cultivos celulares con medio de crecimiento y células, pero sin material, fueron considerados como control positivo de proliferación celular, mientras que los pocitos con medio de crecimiento sin células y sin material son considerados como control negativo de proliferación.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, por tanto, los datos mostrados son representativos de los ensayos realizados en este estudio. Los resultados de la proliferación celular se expresan en porcentajes \pm error estándar. Las diferencias en la proliferación celular para cada membrana, fue determinada por análisis de varianza de una vía (ANOVA) tomando en cuenta la concentración del material. La diferencia fue considerada significativa con un valor de $p \leq 0.05$. Los datos se analizaron con el software *Statgraphics Centurion XVI*.

- Ensayos de actividad antimicrobiana

En la actualidad se cuentan con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana; tal como el caso del método de difusión de discos (Kirby Bauer), el método de pozos en agar y el método de dilución en tubos cuya finalidad es establecer la potencia del agente activo y la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos[70].

En esta investigación nos centraremos en los métodos por microdiluciones en pozos para determinar la acción antimicrobiana del material y el agente activo.

Microorganismos utilizados

Para el ensayo de actividad antimicrobiana se utilizaron 4 cepas: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomona. aureuginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Ensayo por diluciones en cajas Petri

Este ensayo se realizó por servicio externo con la empresa IDySA (Investigación y Desarrollo en Salud S.A. de C.V.). En general, el ensayo consiste en poner en contacto a las cepas con el material y hacer diluciones de la cepa, para después sembrar 100 μ l de la solución (dilución de sepa en agar + material) en cajas Petri con medio de cultivo Mueller-Hinton y monitorear

el crecimiento de la cepa (*C. albicans*, *E. coli*, y *S. aureus*) por 24 horas, utilizando la concentración de microorganismos en la superficie del agar a 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL (patrón McFarland) para iniciar el ensayo.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del agente antimicrobiano

La MIC es la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación y puede ser determinada mediante métodos de microdiluciones en caldo [71].

Para llevar a cabo este experimento, se realizó un diseño experimental en cajas de 96 pozos de 100mL c/u como se muestra en la figura 2.6. Para el ensayo se analizaron por triplicado el PVA (pozos 1, 2 y 3), la mezcla de PVA/PAMPS (30 % v/v) (pozos 4, 5 y 6), el PAMPS (pozos 7, 8 y 9), así como las membranas a diferentes concentraciones (filas A, B y C con los pozos 10, 11 y 12). Además, estándares y blancos como el medio de cultivo Mueller-Hinton, medio de cultivo Mueller-Hinton más antibiótico (el correspondiente para cada sepa) y solo antibiótico. Las filas A-H presentan las diferentes diluciones de cada componente estudiado. Las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ$ C por 24 horas.

Posteriormente, las placas se tiñeron con Cloruro de 2,3,5-Trifenil-2H- Tetrazolio (T.T.C); la prueba se basa en la actividad metabólica de las bacterias a un precipitado y coloreado de la solución evaluada, visible a simple vista que se manifiesta con un cambio de coloración en la muestra y que se hace presente cuando las bacterias se encuentran vivas en el medio.

"Diseño experimental del ensayo"												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PVA 30%	PVA 30%	PVA 30%	PVA/ PAMPS 30%	PVA/ PAMPS 30%	PVA/ PAMPS 30%	PAMPS 100%	PAMPS 100%	PAMPS 100%	Material 15% PAMPS	Material 15% PAMPS	Material 15% PAMPS
B	PVA 15%	PVA 15%	PVA 15%	PVA/ PAMPS 15%	PVA/ PAMPS 15%	PVA/ PAMPS 15%	PAMPS 30%	PAMPS 30%	PAMPS 30%	Material 10% PAMPS	Material 10% PAMPS	Material 10% PAMPS
C	PVA 7.5%	PVA 7.5%	PVA 7.5%	PVA/ PAMPS 7.5%	PVA/ PAMPS 7.5%	PVA/ PAMPS 7.5%	PAMPS 15%	PAMPS 15%	PAMPS 15%	Material 5% PAMPS	Material 5% PAMPS	Material 5% PAMPS
D	PVA 3.75%	PVA 3.75%	PVA 3.75%	PVA/ PAMPS 3.75%	PVA/ PAMPS 3.75%	PVA/ PAMPS 3.75%	PAMPS 7.5%	PAMPS 7.5%	PAMPS 7.5%	C- Medio	C- Medio	C- Medio
E	PVA 1.88%	PVA 1.88%	PVA 1.88%	PVA/ PAMPS 1.88%	PVA/ PAMPS 1.88%	PVA/ PAMPS 1.88%	PAMPS 3.75%	PAMPS 3.75%	PAMPS 3.75%	CV Medio+B acteria	CV Medio+B acteria	CV Medio+B acteria
F	PVA 0.93%	PVA 0.93%	PVA 0.93%	PVA/ PAMPS 0.93%	PVA/ PAMPS 0.93%	PVA/ PAMPS 0.93%	PAMPS 1.88%	PAMPS 1.88%	PAMPS 1.88%	C+ antibiotic o	C+ antibiotic o	C+ antibiotic o
G	PVA 0.47%	PVA 0.47%	PVA 0.47%	PVA/ PAMPS 0.47%	PVA/ PAMPS 0.47%	PVA/ PAMPS 0.47%	PAMPS 0.93%	PAMPS 0.93%	PAMPS 0.93%			
H	PVA 0.23%	PVA 0.23%	PVA 0.23%	PVA/ PAMPS 0.23%	PVA/ PAMPS 0.23%	PVA/ PAMPS 0.23%	PAMPS 0.47%	PAMPS 0.47%	PAMPS 0.47%			

Figura 2.6 Diseño experimental del ensayo

Como parámetros de control durante el ensayo se tomaron en cuenta los siguientes datos:

- *Bacterias evaluadas: C. albicans, E. coli, P. aureuginosa y S. aureus.*
- Concentración de microorganismos en la superficie del agar: 1.5×10^8 UF/mL (patrón McFarland).
- pH del medio: 7.2-7.4.
- Medio de crecimiento: agar Mueller-Hinton para el método Kirby-Bauer y medios.
- Condiciones de incubación: 37°C x 24 horas y una atmósfera de 5% CO₂.
- Se utilizó amikacina y anfotericina como antibióticos indicadores de control positivo de inhibición y medio de cultivo con las cepas como control negativo de inhibición.
- Se utilizó Cloruro de 2,3,5-Trifenil-2H- Tetrazolio (T.T.C) como colorante.

- 24 horas antes del ensayo se realizó el frotis de las bacterias sobre cada superficie de los agares Mueller-Hinton para ser activadas.

Replicación

Para determinar si el agente activo es bacteriostático o bactericida, el ensayo fue complementado con la replicación de cada placa. Con ayuda de un cepillo se toma 1µl de la solución y se inocula en una placa Petri con agar Mueller-Hinton previamente gelificado. Si el agente activo es bacteriostático la cepa crecerá, aunque el T.T.C no registre coloración, mientras que, si el agente activo es bactericida la cepa no crecerá en el medio de cultivo. Los ensayos anteriores se realizaron del mismo modo para cada cepa.

CAPITULO III. RESULTADOS

En la primera parte de esta investigación se realizaron estudios preliminares para encontrar las condiciones de elaboración adecuada de las membranas. Se realizaron pruebas para determinar el disolvente o mezcla de disolventes del baño de coagulación, la concentración y las condiciones adecuadas para su preparación por la técnica de inversión de fases, tomando en consideración las condiciones reportadas para membranas microporosas de PVA puro.

3.1 Elaboración de membranas de PVA, PAMPS y mezclas de PVA/PAMPS

La elaboración de membranas asimétricas de PVA puro ya ha sido reportado previamente [8, 58,68,69]; sin embargo; no hay reportes de la elaboración de membranas de mezclas de PVA/PAMPS. Se probaron diferentes baños de coagulación, tales como isopropanol, etanol, 1-propanol y sus mezclas en las concentraciones indicadas en la tabla 3.1, tomando en cuenta lo reportado en la literatura y estudios previos[63, 72]. El tiempo necesario para la formación de las películas de PVA y PVA/PAMPS en los diferentes sistemas fue de alrededor de 4 horas. Además, se probaron disolventes menos polares como tolueno, tetrahidrofurano (THF), hexano y eter etílico; sin embargo, en todos estos sistemas las membranas presentaron una morfología densa.

Tabla 3. 1 Porcentaje de concentraciones en baños de coagulado para membranas de PVA y PVA/PAMPS

MEMBRANAS PVA		Membranas PVA/PAMPS	
<i>Disolventes</i>	<i>Concentración (% v/v)</i>	<i>Disolventes</i>	<i>Concentración (% v/v)</i>
<i>Etanol/2-Propanol</i>	<i>50/50</i>	<i>Etanol/1-Propanol</i>	<i>70/30</i>
<i>Etanol/2-Propanol</i>	<i>70/30</i>	<i>Etanol/2-Propanol</i>	<i>50/50</i>
<i>Etanol/2-Propanol</i>	<i>90/10/40 °C*</i>	<i>Etanol/2-Propanol</i>	<i>90/10 /40°C*</i>
<i>1- Propanol</i>	<i>100</i>	<i>1-Propanol</i>	<i>100</i>

**Se realizó una prueba controlando la temperatura del baño de coagulación a 40 °C*

La estructura asimétrica de la membrana es dependiente del disolvente, no-solvente y el polímero. Por lo tanto, para el caso de la formación de membranas de las mezclas poliméricas propuestas, la presencia de grupos sulfónicos genera cambios en el equilibrio termodinámico de los componentes del sistema. Por ejemplo, en la elaboración de membranas porosas de mezclas poliméricas como polisulfona/polisulfona sulfonada, la introducción de grupos sulfónicos inducen el desplazamiento entre las curvas binodales hacia concentraciones más altas de no solvente en los diagramas de fase ternario, a medida que la sulfonación se incrementa [73]. Esto implica variar los baños de coagulado, con la finalidad de disminuir las interacciones entre el disolvente/no solvente, generar una mayor difusión del no-solvente en la solución polimérica y por ende promover mejoras en la morfología de la membrana.

3.2 Caracterización morfológica de las membranas asimétricas

3.2.1 Membranas de PVA

La caracterización morfológica de las membranas se realizó usando microscopia electrónica de barrido. En la figura 3.1 se presentan las imágenes superficiales y transversales de las distintas membranas asimétricas de PVA elaboradas. La membrana de PVA será tomada como referencia para estudiar el desempeño de las membranas de mezclas poliméricas con PAMPS.

En las figuras 3.1 A) y B) se puede observar la superficie y corte transversal de la membrana de PVA puro, elaborada con 1-propanol como baño de coagulación. La membrana presenta en su superficie microporos con diámetros entre 1-2 μm aproximadamente y algunos poros de mayor tamaño (10 μm). En la sección trasversal se formaron microporos en la parte cercana a la superficie con macroporos en la sección inferior de la membrana. En las figuras 3.1 C) y D) podemos observar la morfología superficial y transversal de la membrana elaborada en un baño de mezcla de disolventes etanol/2-propanol en una relación 50/50 % v/v. En este sistema se obtuvieron membranas densas, con ciertas zonas porosas de entre 3 y 5 μm . En el caso de las membranas preparadas en el baño de coagulado etanol/2-propanol

(70/30 % v/v), éstas presentaron una morfología totalmente densa tanto en la superficie como en la sección transversal, tal como se observa en las figuras 3.1 E) y F).

Finalmente, se probó un baño de etanol/2-propanol en proporción 90/10 % v/v a temperatura ambiente y a 40 °C. La membrana que presentó una morfología asimétrica con poros entre 5-10 μm fue la membrana elaborada a 40 °C. Por lo tanto, se consideran las membranas elaboradas usando el baño de 1-propanol y etanol/2-propanol (90/10) a 40°C como alternativas para este estudio (ver figuras 3.1 G y H). De acuerdo con estudios reportados, en la fabricación de superficies poliméricas porosas biocompatibles y con actividad antimicrobiana, se requieren estructuras microporosas con poros entre 5-10 μm [38]. Este tamaño de poro es favorable en el crecimiento celular en la superficie de la membrana y por otro lado podría facilitar selectivamente el contacto entre la mezcla polimérica antimicrobiana y las bacterias localizadas dentro de los poros, mientras que limita el contacto con las células.

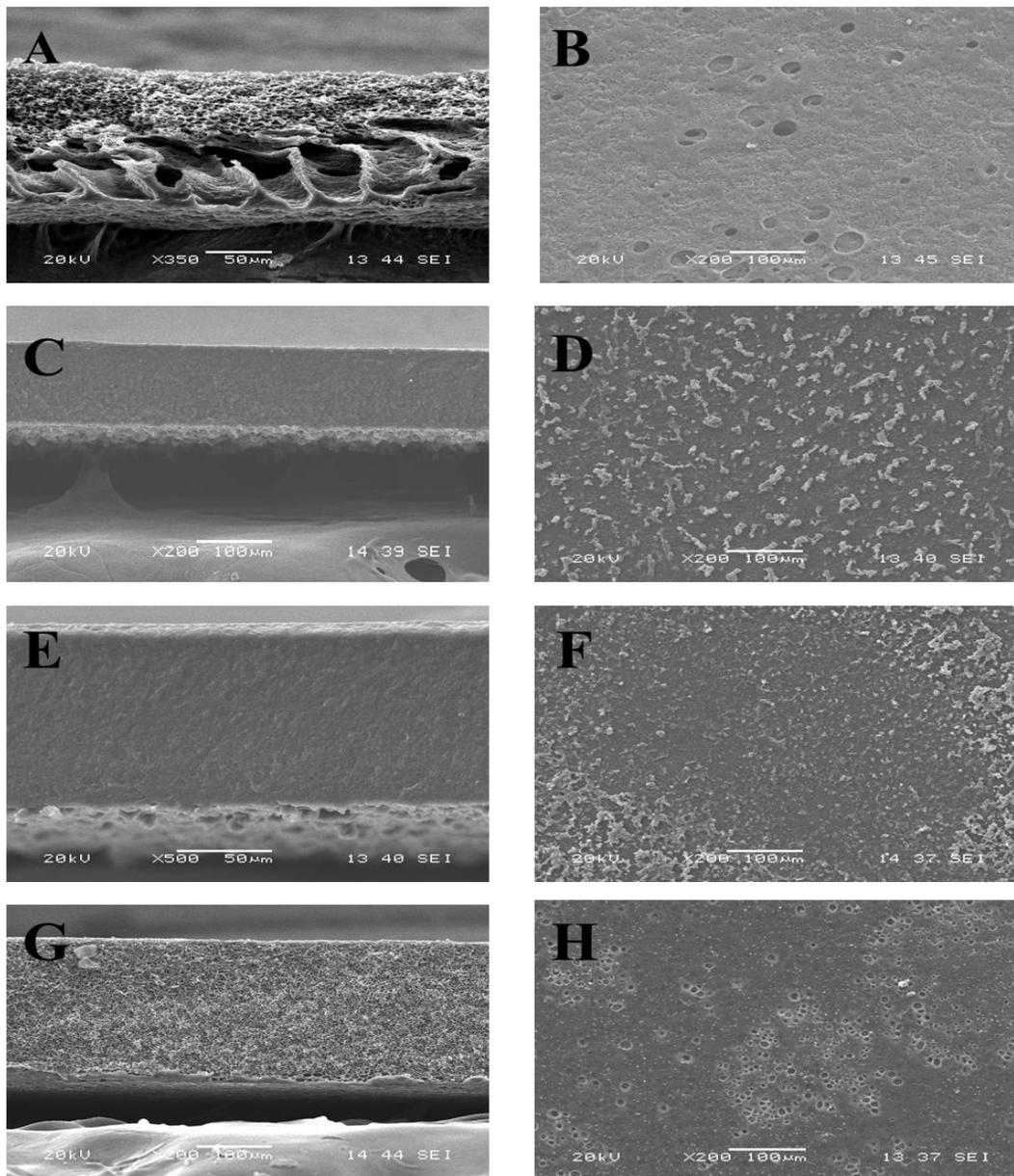


Figura 3.1 Membranas de PVA evaluada en diferentes baños de coagulado analizadas en sus áreas transversal y superficial, respectivamente A) y B) membrana formada con el baño 1-propanol, C) y D) membrana formada con el baño etanol/2-propanol (50/50), E) y F) membrana formada con etanol/2-propanol

3.2.2 Membranas de PVA/PAMPS

Las membranas de PVA/PAMPS elaboradas por inversión de fases en los diferentes baños como son: etanol, acetona, isopropanol y mezclas de estos disolventes, presentaron una morfología completamente porosa. Sin embargo, presentaron una pérdida casi completa del PAMPS. Por lo tanto, se consideró usar una mayor proporción de PAMPS para obtener las cantidades de PAMPS propuestas (5, 10 y 15 % de PAMPS) para la mezcla. Como primer caso, para obtener la membrana con 15 % de PAMPS se agregó doble cantidad de PAMPS (70/30 % peso/peso PVA/PAMPS) para compensar sus pérdidas en el baño.

En las figuras 3.2 A) y B), podemos observar la morfología superficial y transversal de la membrana preparada con el baño de 1-propanol, en donde se pudo distinguir una superficie con poros entre 1 y 2 μm con zonas densas en la parte transversal. Debido a las características morfológicas presentadas en la membrana, se descartó el uso de 1-propanol para la elaboración de las membranas.

Por otra parte, las micrografías mostradas en las figuras 3.2 C) y D) muestran la morfología de las membranas elaboradas en un baño de mezcla etanol/2-propanol (50/50 % v/v). Estas membranas presentan una superficie más porosa, con poros entre 1-16 μm , lo cual es posiblemente favorable para su aplicación. También se hicieron pruebas en el baño de coagulación etanol/2-propanol (90/10) a temperatura ambiente y a 40 °C. En este último baño a 40 °C, la membrana presentó poros con tamaños de alrededor de 20 μm con una estructura tipo red (figura 3.2 E y F). Por lo tanto, debido a la morfología que presentaron se consideraron ambos baños (mezcla etanol/2-propanol 50/50 % v/v y 90/10 % v/v a 40 °C) para la elaboración de las membranas a diferentes concentraciones de PAMPS.

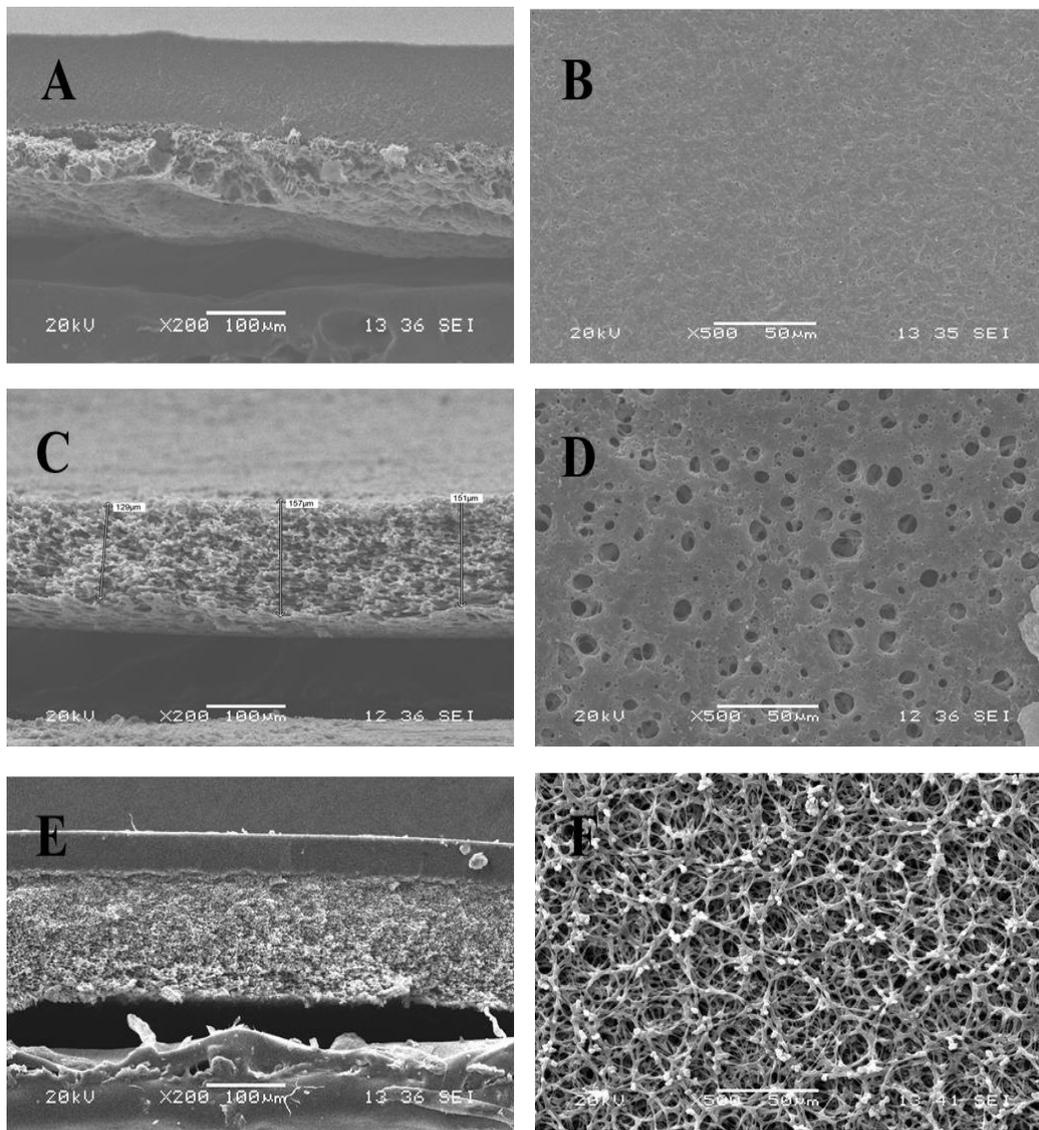


Figura 3.2 Membrana evaluada en diferentes baños de coagulado analizadas en sus áreas transversal y superficial, respectivamente. A) y B) membrana formada con el baño 1-propanol, C) y D) membrana formada con el baño Etanol/2-Propanol (50/50 %v/v), E) y F) membrana formada con el baño Etanol/2-Propanol (90/10/40 °C).

3.3 Capacidad de intercambio Iónico (IEC por sus siglas en inglés)

Para determinar la cantidad de PAMPS en las membranas previamente elaboradas, se determinó la cantidad de grupos sulfónicos presentes por medio de una titulación ácido-base, los resultados se presentan en la tabla 3.2. La determinación de la IEC confirmó la pérdida de más del 90% del PAMPS presente en la mezcla 70/30 (%peso/peso). Las membranas presentaron valores muy bajos de IEC entre 0.01 y 0.06 mmol g⁻¹. La alta pérdida de PAMPS se atribuye a la afinidad de los no-solventes con la solución polimérica, que permite la solubilidad del PAMPS debido a la compatibilidad entre ambos. Sin embargo, además de la baja solubilidad también ciertos parámetros como temperatura, tiempo de contacto de la solución polimérica/no-solvente y la humedad influyen en la retención del polímero “PAMPS”, y en la formación de la membrana porosa con control en su morfología. Por lo tanto, en la siguiente sección se describe las modificaciones realizadas al sistema de coagulación.

Tabla 3.2 Resultados de IEC para las membranas de PVA/PAMPS (80/20)

Baño de coagulación	Temperatura del baño	IEC Teórico (mmol g ⁻¹)	IEC Experimental (mmol g ⁻¹)
<i>1-Propanol</i>	25 °C	1.447	0.06
<i>Etanol/1-Propanol (70/30)</i>	25 °C	1.447	0.01
<i>Etanol/2-propanol (50/50)</i>	25 °C	1.447	0.02
<i>Etanol/2-Propanol (90/10)</i>	40 °C	1.447	0.01

3.4 Modificación de los principales parámetros del baño de coagulación para la formación de las membranas de PVA/PAMPS

Una de las variables más importantes en la elaboración de membranas es el tiempo de formación. Se ha reportado que los sistemas con una velocidad rápida de inversión de fases tienden a formar macroporos con estructuras tipo “dedo”, mientras que los sistemas con una

velocidad lenta de inversión de fases resultan en morfologías con estructura “tipo esponja” [74]. Como se mencionó anteriormente, las membranas se dejaban en el baño de coagulación durante 4 horas para su formación. El tiempo de formación fue bastante lento, al mismo tiempo el contacto prolongado de la membrana precipitada en el baño de coagulación permitió la pérdida del material PAMPS. Por lo tanto, se optó por disminuir el tiempo de formación de las membranas a 2 horas y se corroboró mediante los valores de IEC que conforme se disminuía el tiempo de formación, la IEC de las membranas se acercaba al valor teórico de PAMPS en la mezcla. De tal manera que, al disminuir el tiempo de formación a 2 horas, se obtuvo un incremento considerable del PAMPS. Sin embargo, se pudo observar la formación de una capa densa en una de las caras de la membrana. A continuación, se describe a detalle los resultados y mejoras obtenidas al modificar ciertos parámetros en la elaboración de las membranas.

El baño seleccionado de acuerdo a la morfología y la cantidad retenida de PAMPS fue la mezcla etanol/2-propanol (90/10 % v/v), se controló la temperatura del baño a 30°C, con un tiempo de formación de 2 horas y una humedad de 50-60%. A continuación, se plantean los resultados obtenidos.

3.5 Caracterización morfológica de las membranas asimétricas

3.5.1 Membranas de PVA

Como se observa en la figura 3.3, la estructura de la membrana de PLA fue completamente porosa tanto superficial y de manera transversal. Cabe mencionar que esta membrana se realizó en el baño de mezcla etanol/2-propanol (90/10) a 40°C.

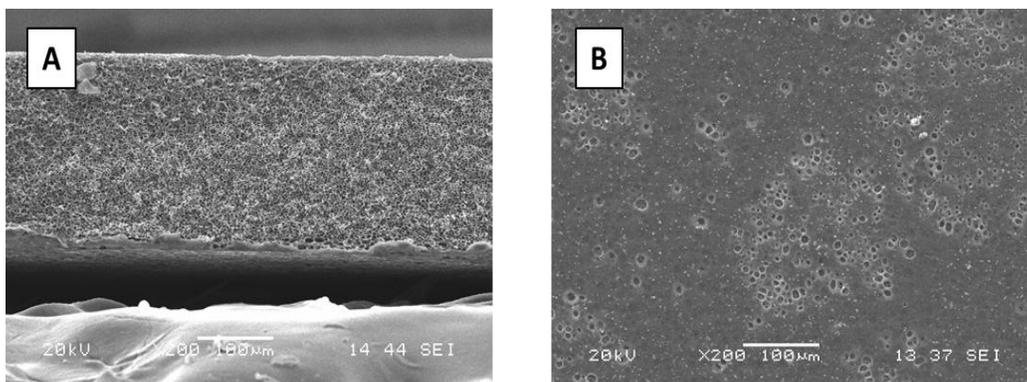


Figura 3.3 Micrografías de la membrana de PVA A) vista transversal, B) vista superficial; preparadas con el baño de coagulado etanol/ 2-propanol (90/10 % v/v) a 40°C

3.5.2 Membranas de PVA/PAMPS

Posteriormente, se prepararon las membranas de PVA/PAMPS en proporción (95/5, 90/10 y 85/15 % m/m) usando el mismo sistema empleado etanol/ 2-propanol (90/10 % vol/vol) para la membrana de PVA puro. Sin embargo, para estas membranas el incremento de temperatura a 40 °C no fue favorable, ya que incrementa la solubilidad del PAMPS en el baño de coagulación. Por lo tanto, la elaboración de la membrana se llevó a cabo a 30 °C.

En la Figura 3.4 se muestran la morfología superficial y transversal de las membranas. Como se mencionó anteriormente, las membranas presentan una estructura diferente a la obtenida con PVA puro. Estas membranas presentaron una estructura bicapa, es decir presentaron una capa densa y una capa porosa, tal como se observa en la vista transversal de las membranas. Esta capa densa presentó un mayor espesor a medida que se aumentó la concentración de PAMPS en la mezcla polimérica. Aunado a ello, se observó un incremento en el tamaño de los poros y en la porosidad superficial (%) conforme se incrementó la concentración de PAMPS en la mezcla.

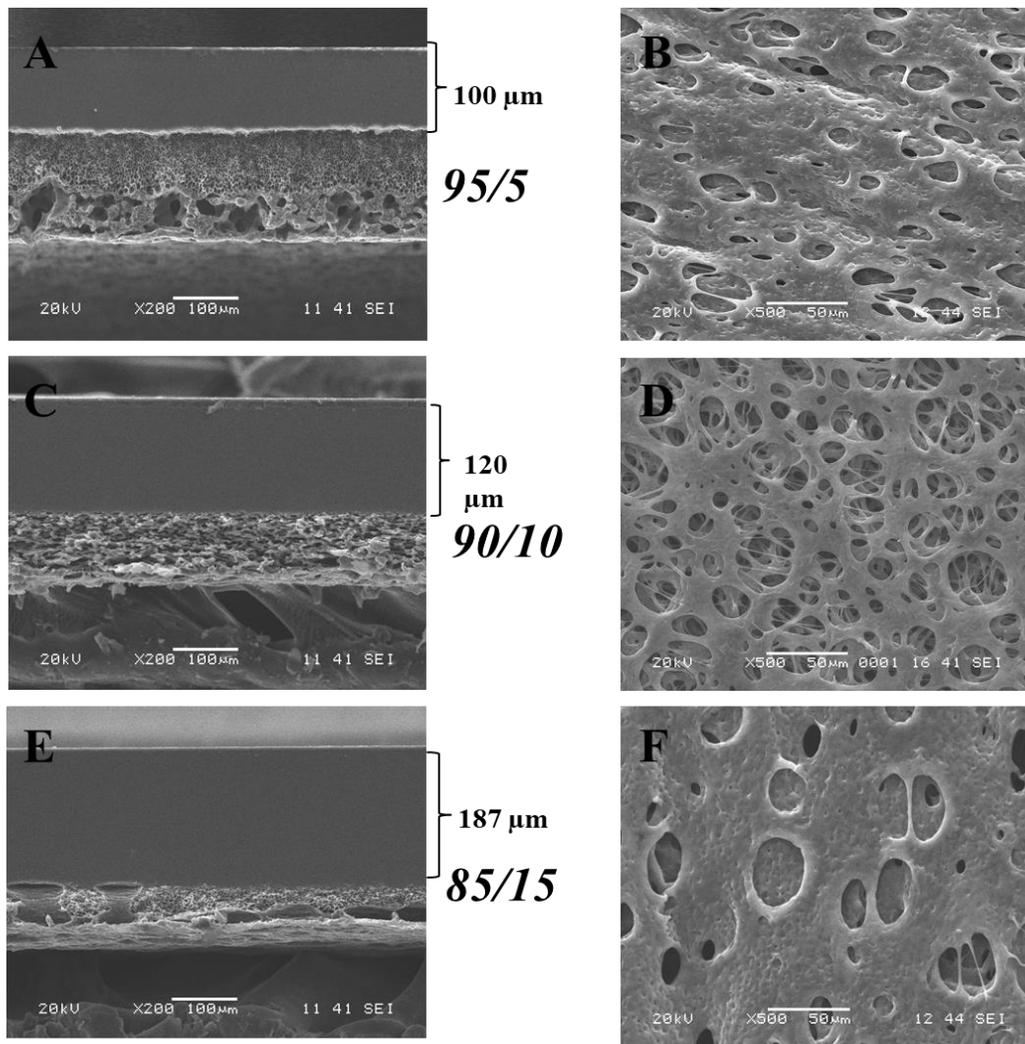


Figura 3.4 Micrografías de las membranas A) sección transversal y B) sección superficial (membrana PVA/PAMPS 95/5) C) sección transversal y D) sección superficial (membrana PVA/PAMPS 90/10) E) sección transversal y F) sección superficial (membrana PVA/PAMPS 85/15)

3.5.3 Distribución de tamaño de poros en las membranas asimétricas de PVA y PVA/PAMPS

Como se puede observar en la figura 3.5 A), la distribución del tamaño de poros en la superficie de las membranas asimétricas de PVA se encontró entre 0.5 a 5.5 μm , con un promedio de 1.78 μm ; la mayor concentración de poros se encontró en el intervalo de 1 a 2 μm . Para la membrana de PVA/PAMPS (95/5) (figura 3.5-B) la distribución de poros se encontró en el rango de 0.1 a 10 μm , presentando un diámetro promedio de poro de 1.97; así mismo la mayor concentración de poros se encontró en el intervalo de 1 a 2 μm . Para la membrana PVA/PAMPS (90/10) (figura 3.5-C) se encontró una distribución de poros en el rango de 0.1 a 11 μm , presentando un diámetro promedio de poro de 2.75 μm , mientras que la mayor concentración de poros se encontró en el rango de 1 a 2 μm . Finalmente, para la membrana PVA/PAMPS (85/15) (figura 3.5-D) se encontró una distribución de poros en el rango de 0.1 a 15 μm , presentando un diámetro promedio de poro de 2.24 μm , mientras que la mayor concentración de poros se encontró en el rango de 1 a 2 μm .

Principalmente, se observó un incremento en el tamaño de los poros y en la porosidad superficial (%) conforme se incrementó la concentración de PAMPS en la mezcla y con respecto a la membrana de PVA puro. Las figuras 3.5 (A-D) presentan la distribución de los tamaños de poros para cada una de las membranas. El distribución de poros, tamaño de poro promedio y la porosidad superficial fueron calculados de las imágenes de SEM usando el código de Matlab® desarrollado Ezeakacha *et al* [75] y por Rabbani and Salehi [76].

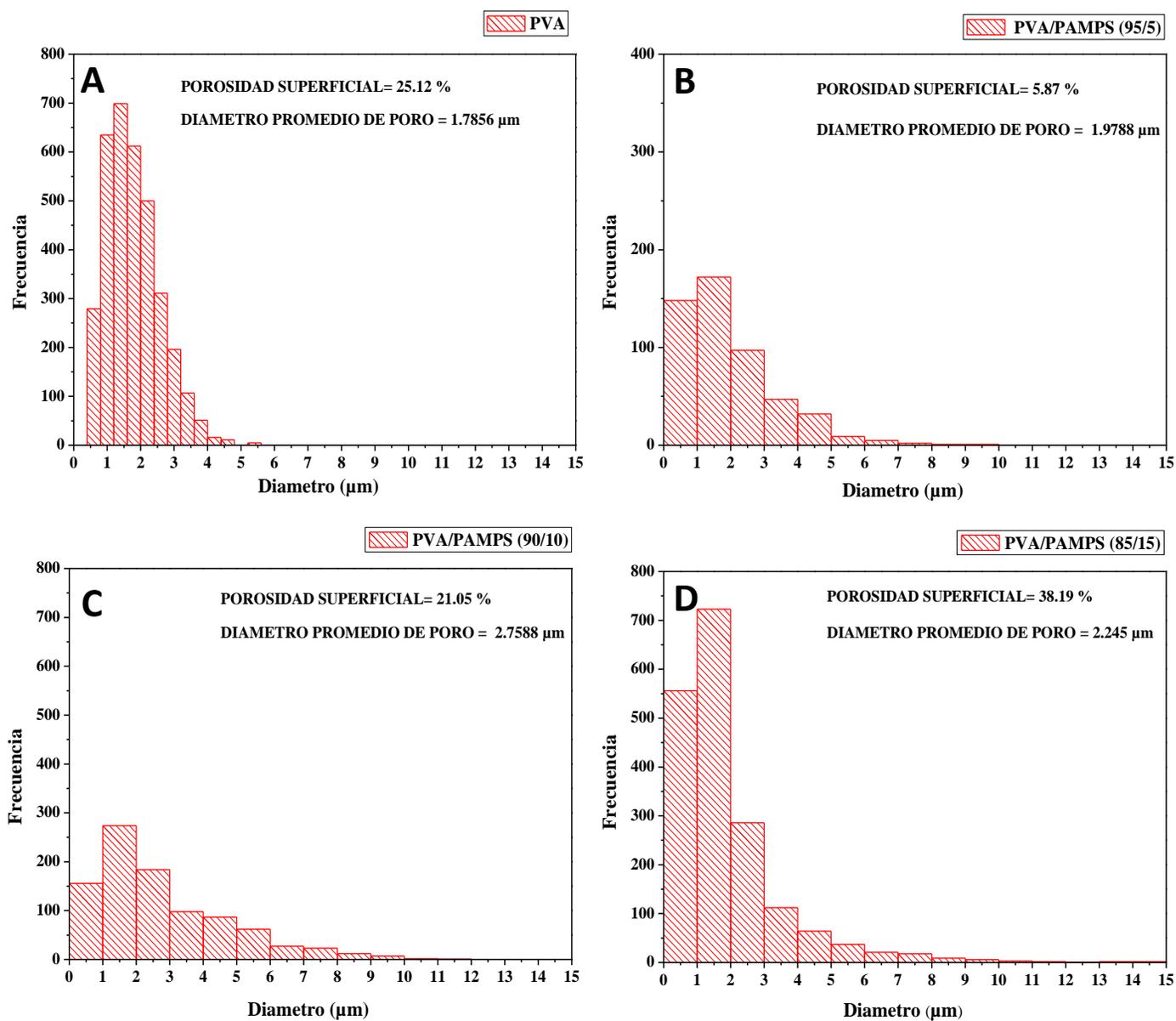


Figura 3.5 Distribución de tamaño de poros en la superficie de las membranas asimétricas obtenidas por el baño de coagulado etanol/2-propanol; A) membrana de PVA, B) membrana PVA/PAMPS (95/5), C) membrana PVA/PAMPS (90/10), D) membrana PVA/PAMPS (85/15)

El tipo de morfología obtenida llevó a considerar la fabricación de una estructura que representará biomiméticamente a la piel, tal como lo describe Kamoun et. al. [17], con una

barrera densa de protección de la herida contra microorganismos, infecciones o contaminaciones y que a la vez permita una buena permeabilidad a los gases, en particular al oxígeno para mantener la ventilación de la herida. Por otro lado, una capa porosa del material biocompatible que permita el contacto del material con la herida, favoreciendo una superficie adecuada para el crecimiento celular.

La formación de la capa densa simula la capa superficial de la piel conocida como epidermis y la que tiene el primer contacto con bacterias y que al sufrir afecciones o quemaduras es la primera en ser afectada. La capa densa conformada en su mayoría de PAMPS representa una gran ventaja, ya que funcionaría como barrera antimicrobiana (epidermis) y la capa porosa (dermis) como área de proliferación celular de fibroblastos. La figura 3.6 presenta la morfología planteada a partir de caracterización morfológica de las membranas.

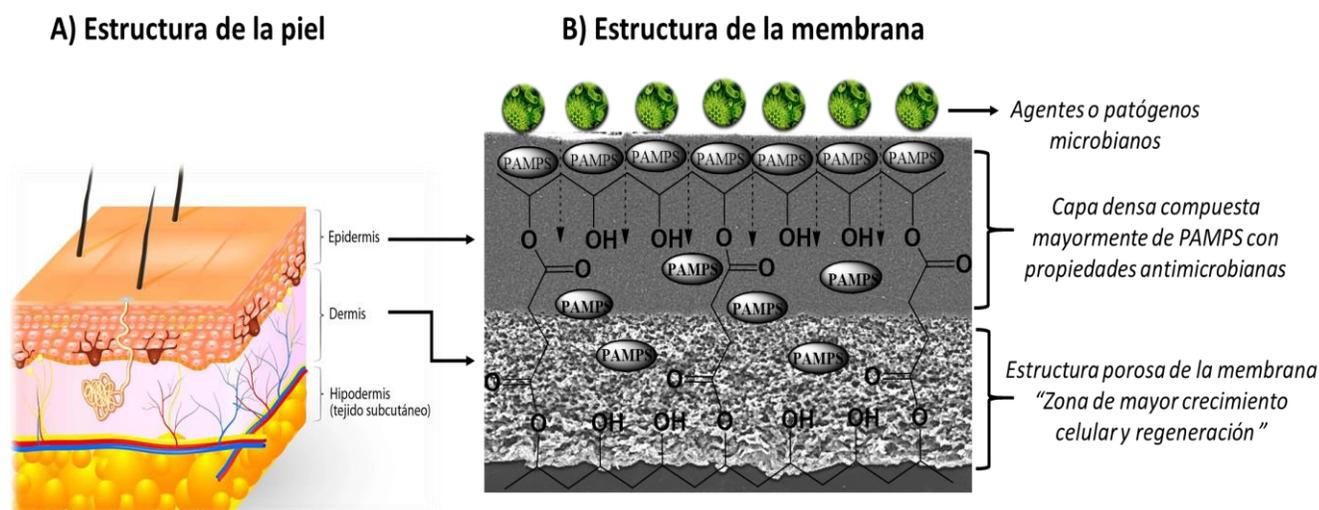


Figura 3.6 (A) Estructura de la piel y (B) estructura biomimética propuesta para membranas de PVA/PAMPS

3.6 Capacidad de intercambio Iónico (IEC)

Se determinó la cantidad de grupos sulfónicos presentes en cada mezcla polimérica al 5, 10 y 15 % de PAMPS, los resultados se resumen en la tabla 3.3. La determinación de los valores de IEC confirmó la preservación del PAMPS (tabla 3.2) en la mezcla, como resultado de la

modificación de las variables como tiempo de exposición y temperatura en el método de inversión de fases. Los valores de IEC fueron cercanos a los valores teóricos, con una pérdida máxima de 30% de PAMPS en las mezclas. El valor de IEC obtenido para cada mezcla fue de 0.25, 0.48 y 0.72 mmol/g para las proporciones 95/5, 90/10 y 85/15, respectivamente.

Tabla 3.3 Resultados de IEC para las membranas de PVA/PAMPS

% MEBRANA Requerido	IEC teórico (mmol/ g)	IEC experimental (mmol g⁻¹)	PAMPS agregado (%)	PAMPS retenido (%)
<i>PVA/PAMPS (95/5)</i>	<i>0.31</i>	<i>0.25</i>	<i>6.5</i>	<i>5.2</i>
<i>PVA/PAMPS (90/10)</i>	<i>0.48</i>	<i>0.40</i>	<i>13</i>	<i>10.8</i>
<i>PVA/PAMPS (85/15)</i>	<i>0.88</i>	<i>0.72</i>	<i>19</i>	<i>15.1</i>

En la Figura 3.7 se presenta de manera gráfica los valores de IEC experimental y teórico para las membranas de mezcla PVA/PAMPS. Los resultados experimentales del cálculo de IEC se realizaron por duplicado. Como se esperaba, los valores de IEC aumentaron con el incremento de PAMPS en la mezcla.

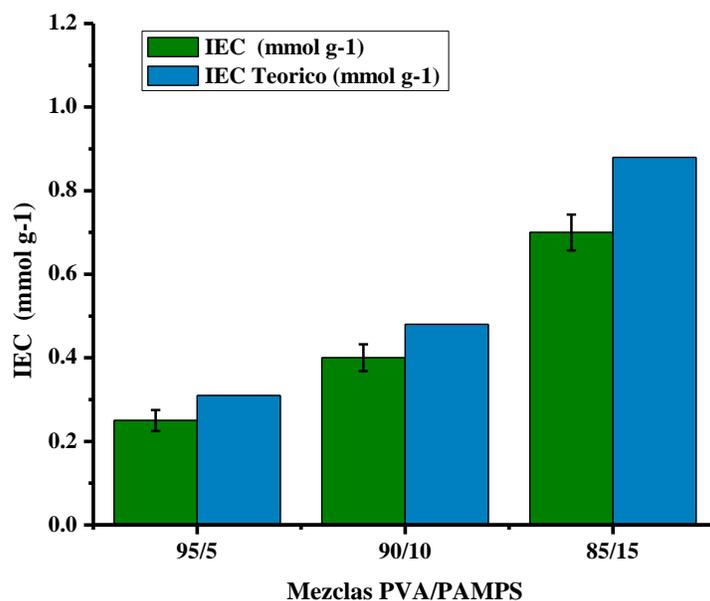


Figura 3.7 Gráfica comparativa de los valores de IEC experimental y teórico para las membranas PVA/PAMPS modificadas a diferentes concentraciones.

3.7 Análisis de la estructura química por medio de FTIR de las membranas de PVA y PVA/PAMPS

Con la finalidad de corroborar el entrecruzamiento químico de las membranas se realizó el análisis químico de las membranas de PVA y las de PVA/PAMPS entrecruzadas; con el propósito de comparar la acción del agente entrecruzante SA (10% en peso) antes y después del tratamiento térmico (100°C por 1 hora).

De acuerdo con lo reportado por Corzo y colaboradores, los picos característicos del PVA puro se presentan en 3276 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento de los grupos O-H, a 1090 cm^{-1} las vibraciones del estiramiento de los grupos C-OH, a 2926 cm^{-1} las señales de los enlaces C-H y sus correspondientes bandas de deformación a 1415 y 1140 cm^{-1} . El pico a 1711 cm^{-1} se le atribuye al enlace C=O del poli (acetato de vinilo) residual debido al grado de hidrólisis del PVA (98 %) [64].

El entrecruzamiento químico se corroboró por la formación de grupos éster debido a la reacción de los grupos carboxilos del SA con los grupos hidroxilos del PVA, como se observa en la figura 3.8. El pico del C=O asociado con el grupo éster a 1710 cm^{-1} se observa ligeramente más intensa, y al mismo tiempo se observa una disminución de la intensidad del pico a 1090 cm^{-1} debido al enlace C-OH en comparación con el espectro del PVA puro sin entrecruzar [64].

Por otra parte, en los espectros de las membranas PVA/PAMPS se puede ver la aparición de picos característicos de PAMPS, tales como los grupos carbonilo C=O (II) de la amida secundaria a 1648 cm^{-1} y la amida secundaria N-H a 1553 cm^{-1} . mientras que las señales correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos sulfónicos se encuentran a 1215 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} . Además, se observa el crecimiento de la intensidad de las señales correspondientes al PAMPS conforme incrementa la concentración de PAMPS en la mezcla.

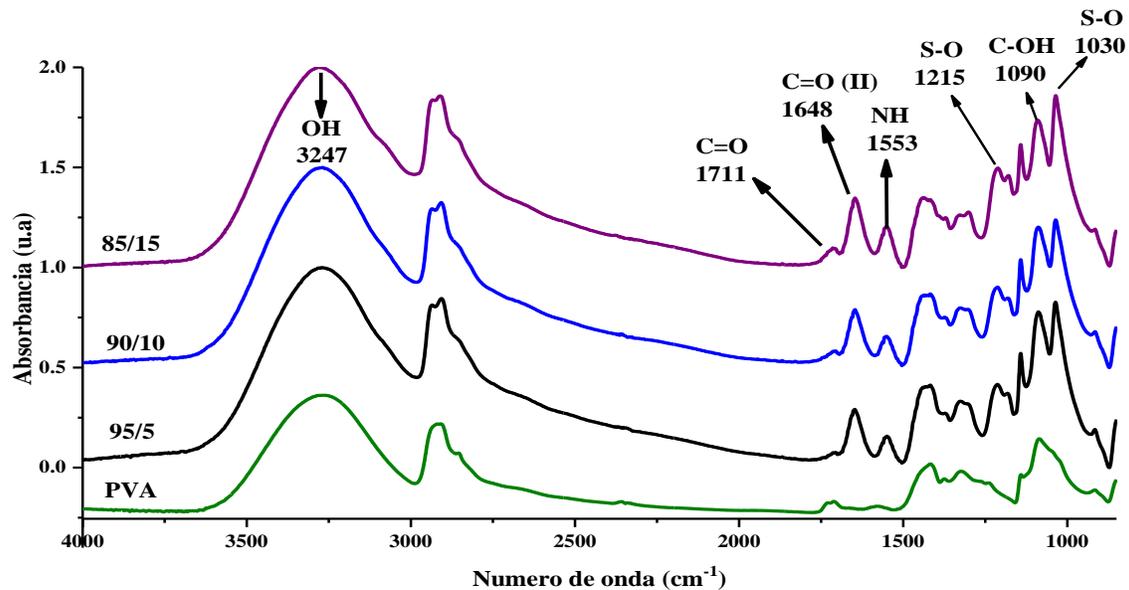


Figura 3.8 Espectros FTIR de las membranas de PVA sin entrecruzar Y PVA/ PAMPS entrecruzadas

3.8 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Con la finalidad de corroborar la composición de cada una de las capas presentes (porosa y densa), se analizó por XPS la superficie de cada una de las caras de las membranas. Se analizaron dos muestras de cada membrana por ambas superficies para cuantificar el porcentaje azufre, nitrógeno, carbono y oxígeno presente atribuido a la presencia de PAMPS en cada capa. En la tabla 3.4 y 3.5 se muestran los % atómicos de cada uno de los elementos mencionados en las películas de 100% PVA, PVA/PAMPS 95/5, 90/10 y 85/15.

La membrana de PVA no presentó porcentaje atómico de S ni de N en su superficie porosa, mientras que en las películas elaboradas a base de diferentes contenidos de PAMPS presentan estos elementos en su superficie porosa, con un ligero incremento con el aumento de la concentración de PAMPS en la mezcla. Esto indica que la parte porosa está conformada en mayor concentración por PVA con una pequeña cantidad de PAMPS interpenetrado en la matriz de PVA. A mayor concentración de PAMPS en la mezcla, XPS detectó mayor concentración de S en la capa. Con la presencia de PAMPS, se espera que incremente la

proliferación celular con respecto a las membranas de PVA puro, esto debido a que el PAMPS contiene grupos ácidos sulfónicos tipo heparina o taurina (compuestos presentes en el cuerpo humano con una función vital) en su estructura química.

Tabla 3.4 Porcentaje atómico de los elementos cuantificados por XPS para la estructura porosa de las membranas de PVA y PVA/PAMPS

Membrana	Superficie Porosa			
	%Atómico			
	C	O	N	S
<i>PVA</i>	82.7± 2.4	15.9±0.5	0	0
<i>PVA/PAMPS 95/5</i>	87.5±0.1	11.1±0.7	0.66±0.4	0.74±0.5
<i>PVA/PAMPS 90/10</i>	86.9±0.6	11.1±0.3	1.52±0.8	0.79±0.01
<i>PVA/PAMPS 85/15</i>	85.5±0.01	11.8±0.01	1.97±0.1	0.79±1.1

En cuanto a la capa densa de la membrana se encontró mayor incremento de S y N asociados al PAMPS, siguiendo el mismo patrón de aumento al incrementar la concentración de PAMPS en la membrana, como se muestra en la tabla 3.5.

El porcentaje atómico calculado a partir de un promedio de las muestras analizadas mostró un incremento significativo en las superficies densas con respecto a la superficie porosa, tal como se resume en la Tabla 3.4. El porcentaje atómico incrementa de 0% para las membranas de PVA a 0.79% para las de PVA/PAMPS (85/15) en la estructura porosa, mientras que para la estructura densa incrementa de 0% para las membranas de PVA y hasta 3.33% para las compuestas de PVA/PAMPS (85/15). Con base en lo anterior se puede confirmar que la capa densa de la membrana está compuesta de una mayor concentración de PAMPS, lo cual, se espera, incrementaría la actividad antimicrobiana en el área, y además una parte del PAMPS

migró a la parte interna del área porosa, lo que se espera redunde en un incremento en la biocompatibilidad de las membranas.

Tabla 3.5 Porcentaje atómico de los elementos cuantificados por XPS para la estructura densa de las membranas de PVA/PAMPS

Membrana	Superficie Densa			
	%Atómico			
	C	O	N	S
<i>PVA/PAMPS 95/5</i>	88.28±0.16	9.2±0.2	0.9±0.2	1.26±0.37
<i>PVA/PAMPS 90/10</i>	87.4±.4	8.4±0.1	1.7±0.6	2.51±0.06
<i>PVA/PAMPS 85/15</i>	86.08±0.1	8.6±0.2	2.04±0.3	3.33±0.0

En la figura 3.9 se presenta el espectro general de la superficie densa de cada una de las membranas elaboradas. Donde se observa claramente la tendencia descrita del incremento del porcentaje de azufre y nitrógeno y por ende de PAMPS en la mezcla.

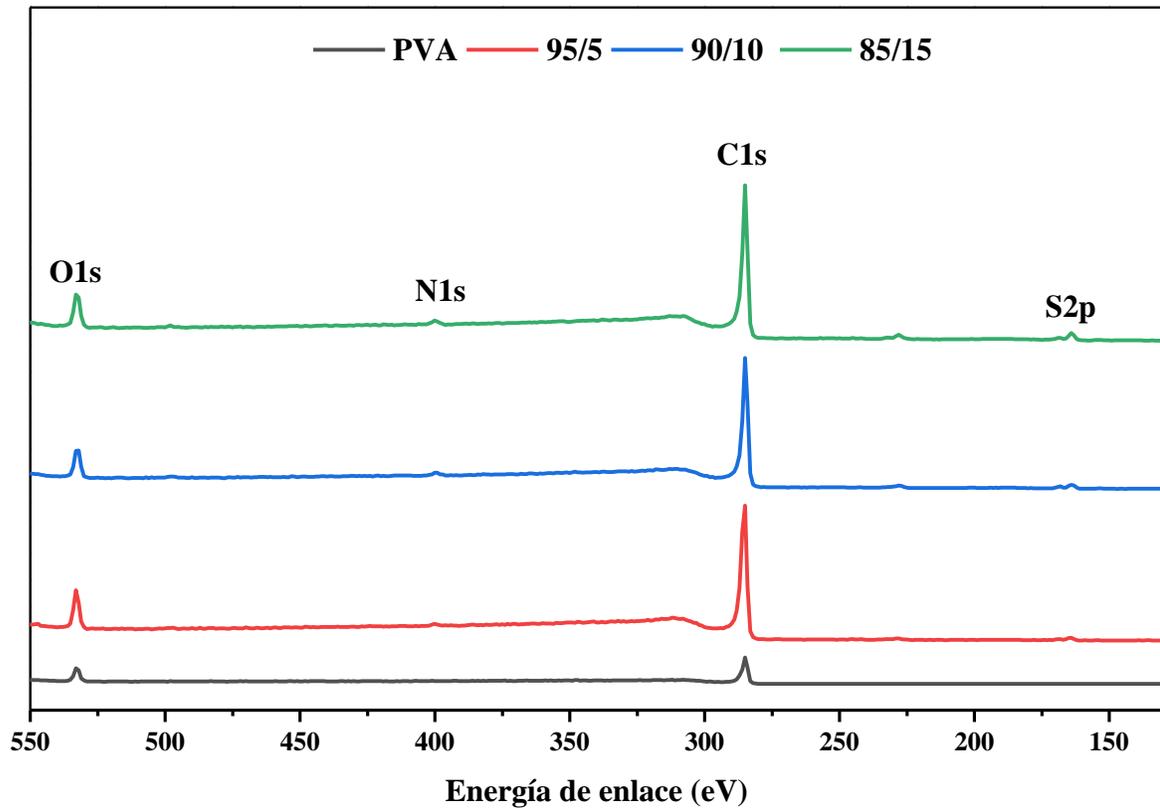


Figura 3.9 Análisis elemental por XPS en la capa densa de las membranas

3.9 Dispersión de energía de rayos-X (EDX)

Para comprobar que toda la capa densa estaba compuesta de PAMPS, se obtuvieron los porcentajes de concentración de azufre en la sección transversal de cada una de las películas por EDX. Como se muestra en la tabla 3.6, el porcentaje en peso del azufre (componente principal del PAMPS) cambia según el área de análisis (densa o porosa). A pesar de mostrar valores menores debido al tipo de barrido sobre la muestra (superficial) el porcentaje en peso del azufre sigue el mismo patrón que las pruebas de XPS aumentando en la capa densa de la membrana y manteniéndose en un menor porcentaje en la capa porosa.

Tabla 3.6 Composición elemental obtenida por EDX de las membranas PVA y PVA/PAMPS

Membrana	Superficie Densa %Peso(S)	Superficie Porosa %Peso (S)
<i>PVA</i>	0	0
<i>PVA/PAMPS 95/5</i>	2.37±0.6	1.3±0.79
<i>PVA/PAMPS 90/10</i>	4.09±0.91	0.73±0.42
<i>PVA/PAMPS 85/15</i>	8.1±2.31	1.98±0.1

El porcentaje más alto en peso del azufre para la capa porosa y densa se obtiene en la membrana de concentración 85/15 con 1.98 % y 8.1 %, respectivamente, lo cual indica un cambio significativo en el porcentaje de PAMPS para cada capa. La misma tendencia se observa en las membranas de PVA con 5 y 10 % de PAMPS como se indica en la Tabla 3.4..

3.10 Pruebas de hinchamiento

La capacidad de hinchamiento de un material está definida como la cantidad de agua que es capaz de absorber con relación a su peso seco. Generalmente, las membranas o materiales hechos de polímeros hidrofílicos y con un bajo grado de entrecruzamiento, son los que tienen mayor capacidad de hinchamiento [77]. La capacidad de absorber soluciones acuosas de una membrana en aplicaciones biomédicas como en injertos de piel, influye en la cantidad de medio de cultivo celular que el material será capaz de incorporar durante el proceso. Por consiguiente, esta propiedad interviene significativamente en las características del cultivo, como la difusión de nutrientes, la adhesión, el crecimiento y la diferenciación celular entre otras [78].

Se realizaron pruebas de hinchamiento para las membranas de PVA y PVA/PAMPS sin entrecruzar y entrecruzadas con ácido succínico al 10 % (respecto al PVA) para observar su comportamiento durante 21 días en una solución buffer de pH neutro. Las membranas de

PVA y PVA/PAMPS sin entrecruzar, se disolvieron por completo desde el primer día, lo que era de esperarse ya que tanto el PVA y PAMPS son altamente hidrofílicos. Por otro lado, las membranas entrecruzadas a 100 °C por 1 hora, no se disolvieron, pero si presentaron un alto porcentaje de hinchamiento o incremento en su volumen de más del 50 % desde el primer día, llegando al equilibrio al cabo de 10 días (ver figura 3.10). A mayor concentración de PAMPS mayor incremento de área presentaron las membranas, alcanzando hasta 16.4 cm² con 15 %, seguida de 15.48 cm² para la membrana con 10% de PAMPS y 13.68 cm² con 5 % de PAMPS a los 10 días. Cabe mencionar que, las muestras recuperaron su tamaño original una vez retiradas de la solución salina.

En el entrecruzamiento químico los grupos funcionales del SA reaccionan con los grupos -OH del PVA modificando parcialmente su propiedad hidrofílica. A mayor porcentaje de entrecruzamiento en la membrana, la capacidad de hinchamiento disminuye, debido a que sus grupos hidrofílicos disminuyen, disminuyendo su afinidad con medios acuosos.

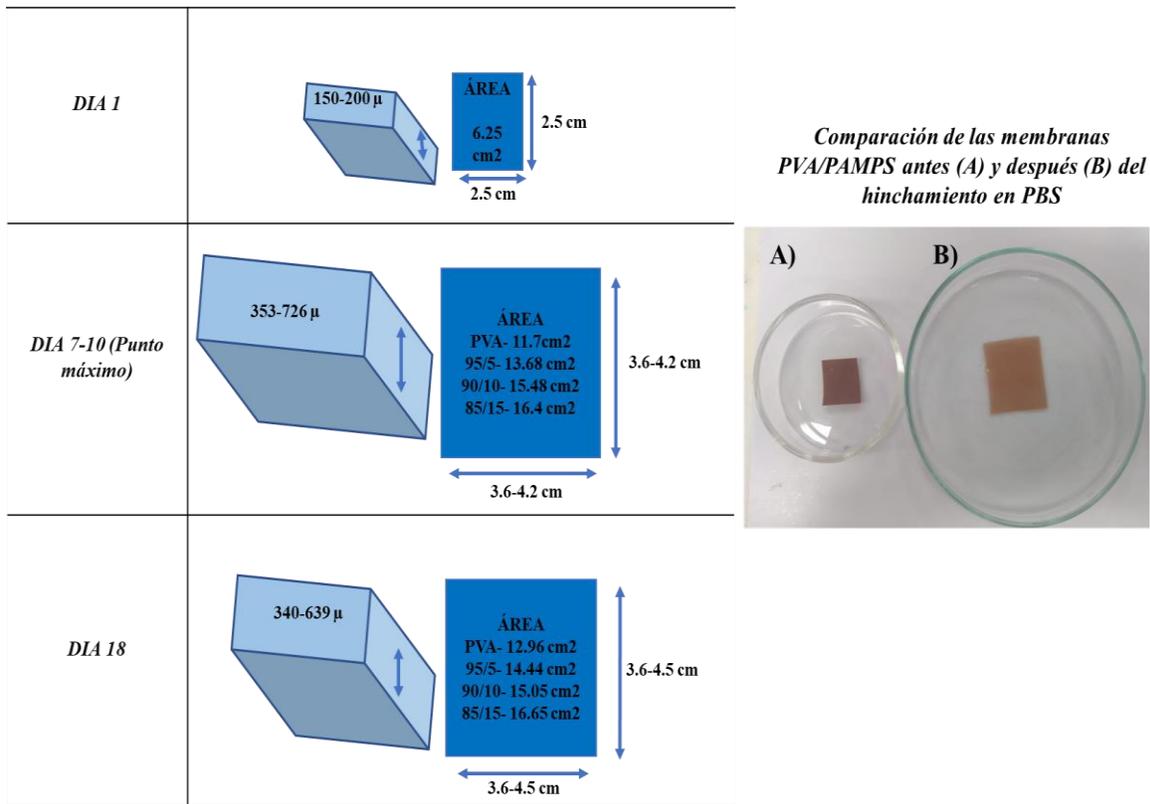


Figura 3.10 Pruebas de hinchamiento

En la figura 3.11 se observa la tendencia del aumento del porcentaje de captación de PBS con el incremento de PAMPS en las membranas. Se muestra que al incrementar la cantidad de PAMPS en la membrana, la absorción de PBS incrementa considerablemente con respecto a la absorción del PVA. A mayor cantidad de PAMPS presente en la membrana, mayor porcentaje de absorción de PBS presentaron las membranas pasando de 233.92% en las membranas de PVA puro hasta 343.73% en las membranas de PVA/PAMPS (85/15) ($p < 0.05$). Esta tendencia coincide con la reportada en hinchamiento o incremento de volumen.

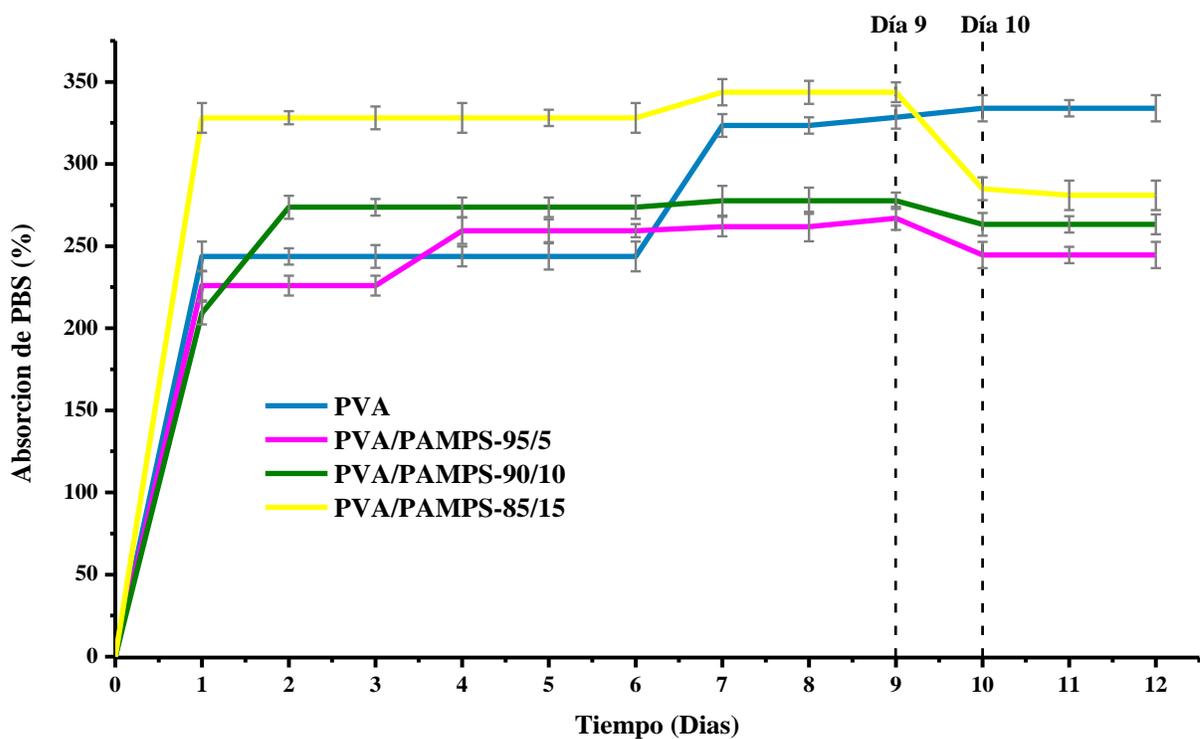


Figura 3.11 Absorción de PBS de las membranas

La siguiente tabla (3.7) resume los valores máximos de absorción en PBS con sus respectivos valores de desviación estándar.

Tabla 3.7 Porcentaje de absorción en PBS de las membranas entrecruzadas

Membrana	% Absorción en PBS (pH: 7.2)
PVA	333.92 ± 8
PVA/PAMPS 95/5	244.59 ± 14*
PVA/PAMPS 90/10	263.27 ± 19*
PVA/PAMPS 85/15	343.73 ± 18*

*Cambios estadísticamente significativos respecto a la modificación con PAMPS ($p \leq 0.05$)

3.11 Pruebas de pérdida de masa y degradación

Por otro lado, la pérdida de masa registrada después de los 21 días del ensayo, también se vio influenciada por el aumento del PAMPS en la mezcla. Como se observa en la tabla 3.8 la membrana de PVA presentó la mayor pérdida de masa con un porcentaje de 9.36%, mientras que la membrana de PVA/PAMPS 95/5 fue la membrana con el menor porcentaje de pérdida, llegando a 4.74 %, . Cabe mencionar que, la pérdida de masa se registra hasta los últimos días de la prueba las cuales se atribuyen a PAMPS y a PVA sin entrecruzar, por lo que el material en el proceso de aplicación como apósito tendrá tiempo suficiente para actuar y luego degradarse parcialmente con el transcurso del tiempo.

Tabla 3.8 Pérdida de masa registrada para las membranas de PVA y PVA/ PAMPS entrecruzadas

Membrana	Pérdida de masa (%)
<i>PVA</i>	<i>9.36±1.2</i>
<i>PVA/PAMPS 95/5</i>	<i>4.84±0.6*</i>
<i>PVA/PAMPS 90/10</i>	<i>4.74±0.8*</i>
<i>PVA/PAMPS 85/15</i>	<i>5.55±0.7*</i>

**Cambios estadísticamente significativos respecto a la modificación con PAMPS ($p \leq 0.05$)*

En relación a las pruebas de degradación, la membrana blanco de PVA fue la que presentó mayor degradación , con un porcentaje del 19.87%, lo cual coincide con lo reportado en la literatura para la hidrólisis de este material [66]. Las membranas de mezclas de PVA/PAMPS alcanzaron un máximo de biodegradación de 8.58%, esto se puede atribuir a interacciones tipo puente de hidrógeno que podrían estar formando los diferentes grupos presentes en el PAMPS y PVA, que inhiben parcialmente la hidrólisis del PVA (figura 3.12).

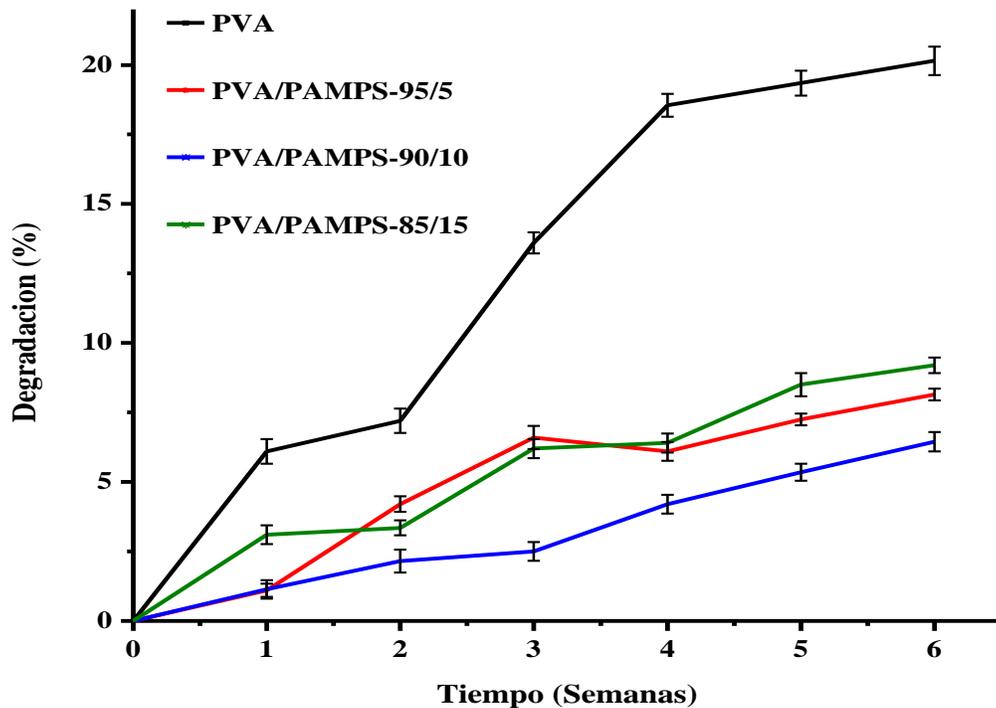


Figura 3.12 Ensayo de degradación para las membranas PVA y PVA/PAMPS entrecruzadas.

3.12 Caracterización mecánica

La importancia de la caracterización mecánica radica en la necesidad de fabricar membranas poliméricas con propiedades mecánicas (resistencia al esfuerzo máximo a tensión, módulo elástico y máxima deformación) similares a los reportados para la piel humana. Las propiedades mecánicas de las membranas elaboradas en este trabajo se realizaron con 7 muestras para cada membrana y en 3 repeticiones, efectuando dos ensayos, uno con las membranas secadas a 60 °C por 24 horas y otro con las membranas húmedas e hinchadas previamente en la solución buffer de fosfatos. Los resultados obtenidos para las membranas secas se muestran en la tabla 3.9.

Para las membranas secas de PVA puro se obtuvieron valores de módulo elástico, esfuerzo a tensión y deformación máxima de 333.41 MPa, 10.68 MPa y 7.67 % respectivamente (Tabla 3.8), mostrando un incremento gradual de 333.42 a 1,134.29 MPa en su módulo elástico, y de 10.68 a 26.61 MPa en su esfuerzo máximo con la introducción de PAMPS en

la mezcla, mientras que los valores de deformación máxima disminuye a la mitad al incrementar el porcentaje de PAMPS de 5 a 15%, pasando de 10.65 % a 5.1 %.

Tabla 3.9 Resultados de las pruebas a tensión de las membranas secas

Concentración		Modulo elástico (MPa)	Máximo esfuerzo a tensión (Omax) (MPa)	Máxima deformación % (ϵ_{max})
<i>PVA</i>	<i>PAMPS</i>			
<i>100%</i>	<i>0%</i>	<i>333.41 ±44.9</i>	<i>10.68 ±2.3</i>	<i>7.67 ±0.8</i>
<i>95%</i>	<i>5%</i>	<i>539.45 ±67.5</i>	<i>24.68 ±2.4</i>	<i>10.65 ±1.4</i>
<i>90%</i>	<i>10%</i>	<i>867.46 ±79.3</i>	<i>24.93 ±6.3</i>	<i>8.07 ±4.6</i>
<i>85%</i>	<i>15%</i>	<i>1,134.29 ±98.5</i>	<i>26.61 ±1</i>	<i>5.1 ±0.6</i>

La literatura reporta que, a partir de ensayos a tensión realizados con muestras extraídas de la capa dérmica profunda en el área lumbar del cuerpo, la piel humana presenta valores del modulo elastico cercanos a 0.64 MPa, 0.7 MPa para la tensión máxima y 180 % de deformación con respecto a su área (Tabla 3.10) [79, 80]; haciendo referencia a un material de baja tenacidad, elástico y alta resistencia a la deformación. En este sentido, las membranas secas presentan mayor rigidez y ductilidad lo cual no es favorable, debido a que la piel humana presenta elasticidad como parte su capacidad para recuperar su forma despues de esfuerzos aplicados.

Tabla 3.10 Propiedades mecánicas de la piel humana

Módulo elástico (MPa)	Máximo esfuerzo a tensión (Omax) (MPa)	Máxima deformación % (ϵ_{max})
<i>0.64</i>	<i>0.7</i>	<i>180</i>

Teniendo en cuenta que originalmente la membrana debe asemejarse miméticamente a la piel incluso mecánicamente, se puede afirmar con este ensayo que esta condición no se cumple para las membranas secas. Se procedió a realizar el ensayo de las propiedades mecánicas a tensión de las membranas previamente hinchadas. Este ensayo aporta un resultado más cercano a condiciones reales, ya que la aplicación requiere que las membranas se mantengan húmedas durante su desempeño. Los resultados obtenidos para las pruebas mecánicas con las membranas húmedas se presentan en la tabla 3.11. Las membranas húmedas presentaron un comportamiento completamente diferente al obtenido con las membranas secas y muy cercano al reportado para la piel humana. En este caso, las membranas de PVA puro presentaron valores de 0.27 MPa, 0.65 MPa y 232.21 % para el módulo elástico, esfuerzo máximo a tensión y de deformación máxima, respectivamente. Las membranas de PVA/PAMPS en comparación con las del PVA, presentaron un incremento significativo del módulo elástico de 0.44 MPa hasta 0.86 MPa con respecto al incremento del PAMPS. El porcentaje de deformación aumento de 171% a 301.22 % con la disminución del porcentaje de PAMPS en la membrana.

Cuando la membrana de PVA se somete a secado, el agua se evapora causando el colapso de la estructura, la membrana pasa de un estado de máximo hinchamiento, a un estado colapsado, además, la presencia del agente entrecruzante promueve fuertes interacciones intra e intermoleculares, originadas por la formación de enlaces éster [81]. Este comportamiento favorece la rigidez y la deformación mínima en los materiales, por lo que el módulo elástico y esfuerzo máximo registrado a tensión, pone de manifiesto la rigidez de la membrana y su fragilidad (atribuida a valores mínimos de deformación), provocando una incisión instantánea durante el ensayo.

Por otro lado, el aumento del módulo elástico y la deformación máxima, de acuerdo con lo reportado en la literatura se le puede atribuir entre otras razones, al efecto estérico causado por la presencia de los grupos dimetilo y sulfónico en el PAMPS. Estos grupos al combinarse dificultan estéricamente la movilidad de la cadena dentro de la red polimérica y proporcionan estabilidad tanto hidrolítica como térmica a los polímeros que lo contienen, proporcionando

mayor estabilidad a la cadena y una mayor oposición a los esfuerzos mecánicos inducidos en la membrana [82].

Tabla 3.11 Resultados de las pruebas a tensión de las membranas húmedas

PVA	PAMPS	Módulo elástico (E) (MPa)	Máximo esfuerzo a tensión (O max) (MPa)	Máxima deformación % (ε max)
100%	0%	0.27 ± 0.08	0.65 ± 0.09	232.21 ± 27.39
95%	5%	0.44 ± 0.03	1.53 ± 0.27	301.22 ± 42
90%	10%	0.47 ± 0.03	1.08 ± 0.08	215.96 ± 26
85%	15%	0.86 ± 0.02	1.43 ± 0.06	171.83 ± 13

En contraste, las películas de PVA y PVA/PAMPS húmedas, sumergidas en el buffer de fosfatos tienden a absorber grandes cantidades de agua, lo cual afecta las propiedades mecánicas y físicas del polímero debido a su naturaleza hidrofílica impartida por la presencia de grupos hidroxilo (-OH) y sulfónicos (-SO₃H) en su cadena principal. El agua absorbida actúa como plastificante en la membrana, lo cual incrementa la movilidad molecular de los polímeros amorfos y/o parcialmente cristalinos debido a un mayor volumen libre [83], surgiendo durante el hinchamiento un acomodo de cadenas que promueven su elasticidad. Sin embargo, la rigidez del material decae abruptamente debido a la mayor movilidad de cadenas.

Como los valores obtenidos para las membranas húmedas son muy semejantes a los datos reportados en la literatura para la piel, se hizo una comparación entre sí. El módulo elástico para las membranas de PVA/PAMPS se encuentra en un intervalo de 0.27 hasta 0.86 MPa incrementando con respecto al porcentaje de PAMPS, mientras que el valor reportado para la piel es de 0.64 MPa. Por lo tanto, el módulo elástico de las membranas de PVA/PAMPS se encuentra muy cercano al valor reportado para la piel.

Los valores de la máxima deformación fueron más altos en las membranas de PVA, PVA/PAMPS 90/10 y PVA/PAMPS 95/5 en condiciones húmedas en comparación con el valor presentado para la piel. En el caso de la membrana con 15% de PAMPS, su porcentaje

de elasticidad fue ligeramente menor que el que presenta la piel. En general, es posible obtener propiedades mecánicas similares a las que presenta la piel; sin embargo, se debe considerar que en muchas ocasiones diversos factores extrínsecos como la edad, el pH y factores externos pueden causar variaciones en las propiedades mecánicas de la piel humana diferentes a las que aquí se reportan, debido a que se considera un material anisotrópico.

Los valores de esfuerzo máximo no siguen una tendencia con respecto a la adición de PAMPS en la mezcla. Una de las causas de este comportamiento se explica por medio de la teoría de resistencia de la zona más débil, es decir, que el material siempre va a fallar por las zonas más débiles del mismo y que su resistencia máxima será la resistencia máxima de estas zonas [84]. De esta manera, el comportamiento mecánico del material estará dominado por las imperfecciones de las probetas, tales como poros, irregularidades en las aristas e irregularidades en el espesor, lugares que pueden ser considerados como puntos débiles. Es importante mencionar que el proceso de obtención de películas y probetas se realizó de una manera cuidadosa y que la selección de las probetas para los ensayos de tensión siguió los criterios de la Norma ASTM D882-02 para películas de materiales poliméricos. Sin embargo, la inspección y selección de las probetas se realizó de manera macroscópica, dejando de lado los posibles defectos imperceptibles al ojo humano.

3.13 Proliferación celular

Uno de los requisitos claves que debe cumplir un material auxiliar en la restauración tejido cutáneo, es su capacidad de promover crecimiento o proliferación celular [17]. Por lo tanto, se estudió la cinética de proliferación celular de los fibroblastos sembrados sobre la superficie de las membranas de PVA y de PVA/PAMPS. Se definió como control positivo a las células sembradas en la caja de cultivo sin membrana y, como control negativo de proliferación al medio de cultivo en ausencia de células.

Se ha reportado que los materiales usados para esta aplicación deben ser altamente porosos y con un tamaño de poro adecuado para proveer una adecuada migración e interacción celular

[85]. Además, la morfología y química de la superficie son importantes para la adhesión y proliferación celular [86]. Tomando en cuenta estos aspectos, se decidió realizar en estudio de proliferación celular en ambas superficies de la membrana para hacer un estudio comparativo. Una de las superficies es altamente porosa con PVA como principal material, sin embargo, también contiene cierta cantidad de PAMPS como mostró el análisis por XPS (0.79 % S) y EDX (0.7-1.98 % S). La otra superficie es densa con PAMPS como principal componente.

En la figura 3.13 y 3.14 se presenta la cinética de crecimiento celular (medida en absorbancia) de los fibroblastos humanos cultivados sobre las películas de PVA y PVA modificadas, en comparación con el crecimiento de las células sin el material (control) por medio del ensayo alamar blue (AB) a 0, 24, 48 y 72 horas.

Analizando los resultados es posible confirmar la biocompatibilidad de las membranas evaluadas, observando un crecimiento celular máximo a las 24 horas para la superficie porosa de la membrana (figura 3.13), en comparación con el control positivo que presenta un crecimiento normal no mayor al 100%. También se observa que las células en contacto con el material proliferaron gradualmente al aumentar el porcentaje del PAMPS en la membrana, en consecuencia, la membrana 85/15 exhibe una mayor proliferación celular en comparación con la membrana 95/5. Siendo la membrana con 15% de PAMPS la que presentó mayor proliferación celular en los diferentes tiempos ($p \leq 0.05$).

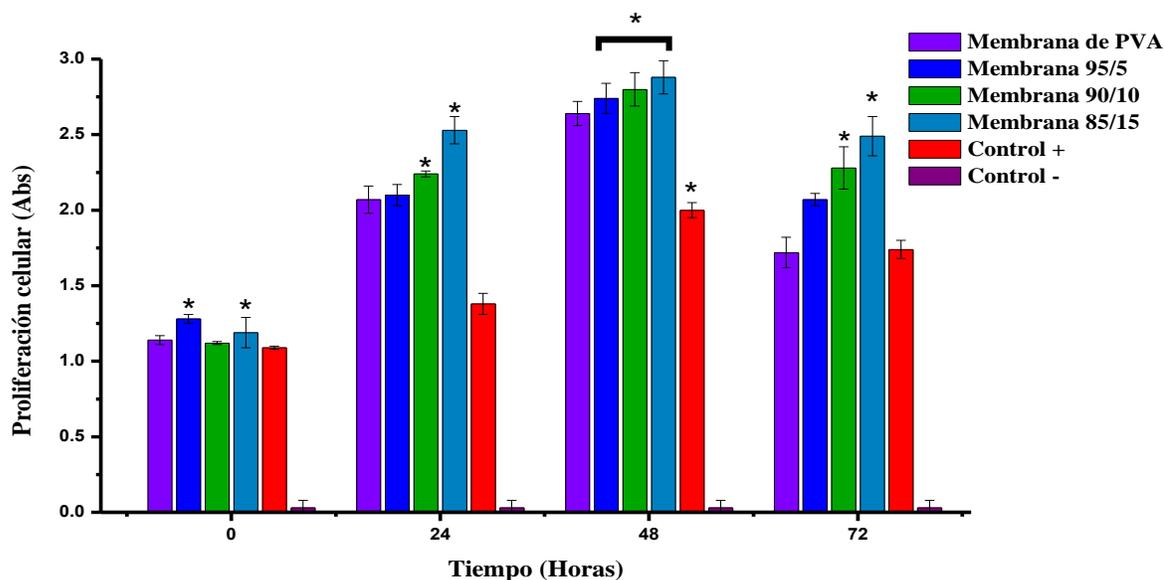


Figura 3.13 Cinética de proliferación celular de la estructura porosa de la membrana siendo PVA el material sin modificar con PAMPS y 95/5, 90/10 y 85/15 las membranas modificadas a diferentes concentraciones de PAMPS ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, la estructura densa de la membrana (figura 3.16) presentó un crecimiento similar al control positivo en las primeras 24 horas. El máximo crecimiento se observó después de 48 horas con una tendencia similar a las reportada en la superficie porosa, es decir mayor proliferación al incrementar el porcentaje de PAMPS en las membranas ($p \leq 0.05$). Sin embargo, se observa claramente una menor proliferación celular en comparación con los resultados presentados para la superficie porosa. Por lo tanto, se comprueba que la biocompatibilidad de un material depende de la composición polimérica, morfología y la estructura de la membrana, entre otros factores.

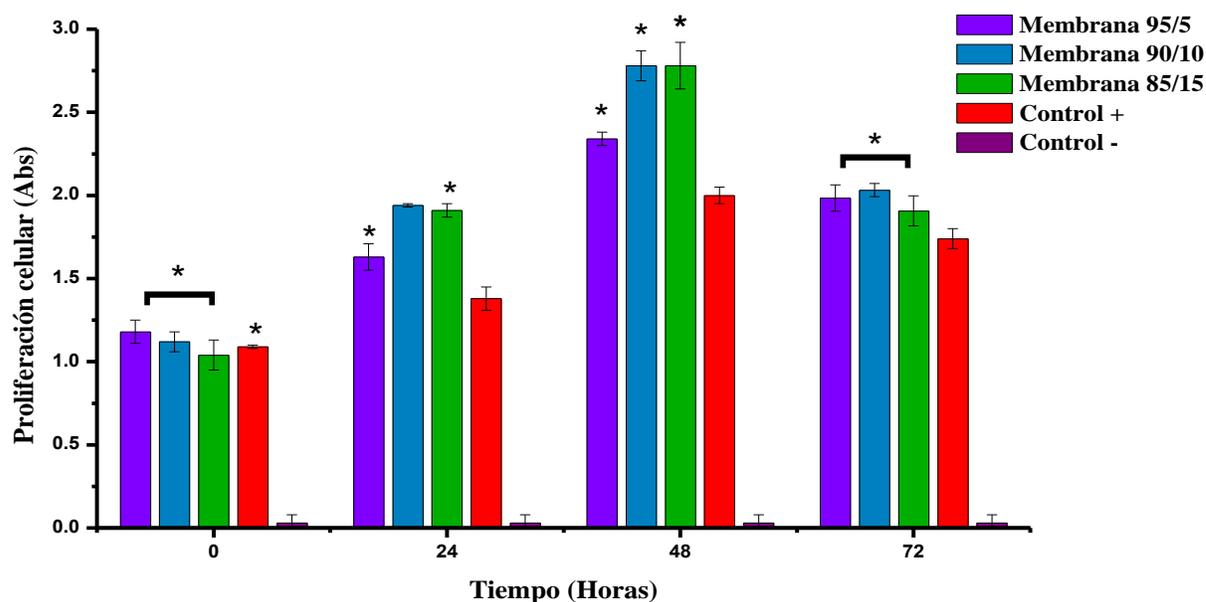


Figura 3.14 Cinética de proliferación celular de la estructura densa de la membrana siendo PVA el material sin modificar con PAMPS y 95/5, 90/10 y 85/15 las membranas modificadas a diferentes concentraciones de PAMPS ($p \leq 0.05$).

3.14 Ensayos de actividad antimicrobiana

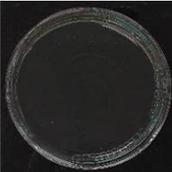
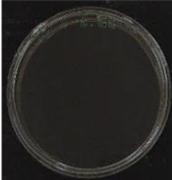
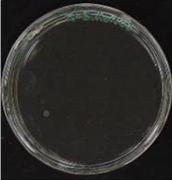
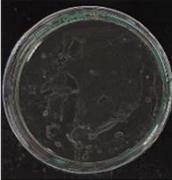
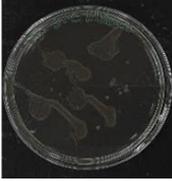
3.14.1 Ensayo por diluciones en cajas Petri

En este ensayo se estudiaron las membranas con mayor (15 %) y menor (5 %) concentración de PAMPS y el blanco (PVA) en contacto con las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* a través de diluciones por 24 horas. En la Tabla 3.12 se puede observar que la membrana de PVA no inhibe ninguna de las cepas en contacto y la membrana con 5% de PAMPS inhibe la bacteria *E. coli*, pero sin inhibición para *S. aureus* y *C. albicans*. En cuanto a la membrana con 15% de PAMPS, ésta presenta inhibición para las cepas *E. coli* y *S. aureus*. Este análisis indica que a mayor concentración de PAMPS mayor actividad antimicrobiana de las membranas, lo anterior se atribuye al incremento de concentración de grupos ácidos

contenidos en el agente activo, el cual interacciona en mayor proporción ya sea inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplasmática, impidiendo la síntesis proteica o bien bloqueando la síntesis de las funciones de ácidos nucleicos en las bacterias.

Sin embargo, para corroborar los resultados se determinó la inhibición del crecimiento bacteriano mediante ensayos por microdiluciones.

Tabla 3.12 Ensayos microbiológicos por diluciones a 24 horas

<i>Control positivo de inhibición</i>	<i>Cepas</i>	<i>PVA</i>	<i>PVA/PAMPS (95/5 % w/w)</i>	<i>PVA/PAMPS (85/15 % w/w)</i>
	<i>E. coli</i>			
	<i>S. aureus</i>			
	<i>C. albicans</i>			

3.14. Ensayo por microdiluciones y sus réplicas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC)

El ensayo por MIC del agente activo confirmó la actividad antimicrobiana del PAMPS y las mezclas utilizadas en las membranas.

Las placas y sus respectivas réplicas se realizaron de acuerdo con la metodología descrita en la sección experimental. En la figura 3.15 se muestran las concentraciones de los materiales poliméricos empleados en cada una de las placas y en la caja Petri (replica).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30%	30%	30%	30%	30%	30%	100%	100%	100%	15%	15%	15%
B	15%	15%	15%	15%	15%	15%	30%	30%	30%	10%	10%	10%
C	7.5%	7.5%	7.5%	7.5%	7.5%	7.5%	15%	15%	15%	5%	5%	5%
D	3.75%	3.75%	3.75%	3.75%	3.75%	3.75%	7.5%	7.5%	7.5%	C-	C-	C-
E	1.88%	1.88%	1.88%	1.88%	1.88%	1.88%	3.75%	3.75%	3.75%	CV	CV	CV
F	0.93%	0.93%	0.93%	0.93%	0.93%	0.93%	1.88%	1.88%	1.88%	C+	C+	C+
G	0.47%	0.47%	0.47%	0.47%	0.47%	0.47%	0.93%	0.93%	0.93%			
H	0.23%	0.23%	0.23%	0.23%	0.23%	0.23%	0.47%	0.47%	0.47%			

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

Figura 3.15 Diseño experimental en caja Petri replicado para cada bacteria

Cabe recalcar que las cajas Petri muestran la réplica exacta de las placas de 96 pozos para cada bacteria (figura 3.16).

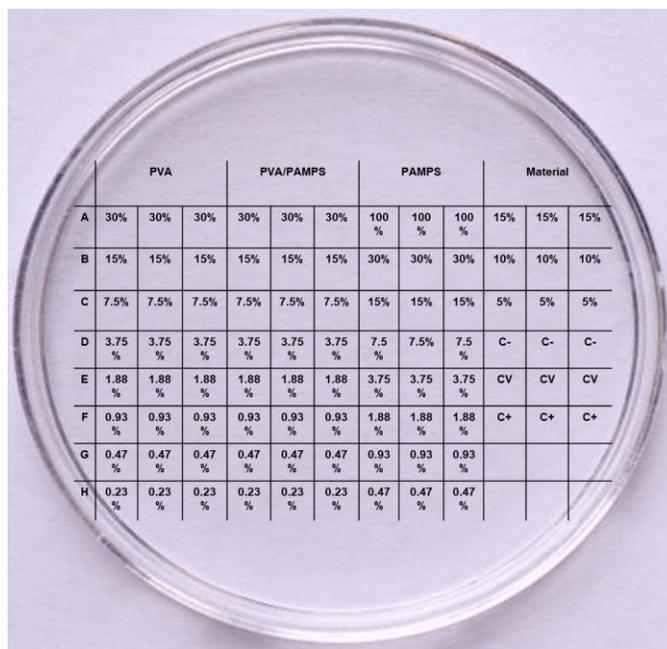


Figura 3.16 Diseño experimental en caja Petri replicado para cada bacteria

Como se explicó en la metodología, en cada ensayo se analizaron soluciones de PVA (al 30 %), mezcla de PVA/PAMPS (relación 70/30), el PAMPS al 100%, así como las membranas a diferentes concentraciones. Además, estándares y blancos como el medio de cultivo Mueller-Hinton, medio más antibiótico y antibiótico para su comparación.

- *Escherichian coli*

Los resultados indican que el PVA puro presenta inhibición a *E. coli* únicamente en la primera microdilución (30%). Sin embargo, solo presenta carácter bacteriostático, ya que la réplica en caja Petri presentó crecimiento de la bacteria al contacto con el medio. Respecto al PAMPS puro, las microdiluciones con la cepa *E. coli* presentaron inhibición en el intervalo de microdilución del 100% al 3.25 %, con una concentración mínima bacteriostática al 15 %, como se muestra en la Tabla 3.13. Por otro lado, las diluciones de mezclas PVA/PAMPS presentaron inhibición a esta bacteria en el intervalo del 30-7.5% y una concentración mínima bacteriostática al 15 %. El carácter bactericida al agente activo se determinó con la replicación de la placa (cajas Petri en figura 3.17).

Por último, a diferencia de los resultados obtenidos en el experimento de diluciones descritos anteriormente, en las microdiluciones las membranas PVA/PAMPS no presentaron inhibición a *E. coli*. Esto posiblemente a la baja concentración del agente activo en el material (muestras de 4 mm de diámetro), además que el material ya presenta una coloración café rojiza por el entrecruzamiento, lo cual resulta confuso para observar la inhibición del material a esta bacteria. Los blancos y estándares presentaron los resultados esperados.

Tabla 3.13 Resultados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para *E. coli*

<i>Escherichian coli</i>				
Membrana	Bactericida	MBC	Bacteriostático	MIC
PVA	Negativo	---	Positivo	30%
PAMPS	Positivo	15%	Positivo	3.75%
PVA/PAMPS	Positivo	15%	Positivo	15%

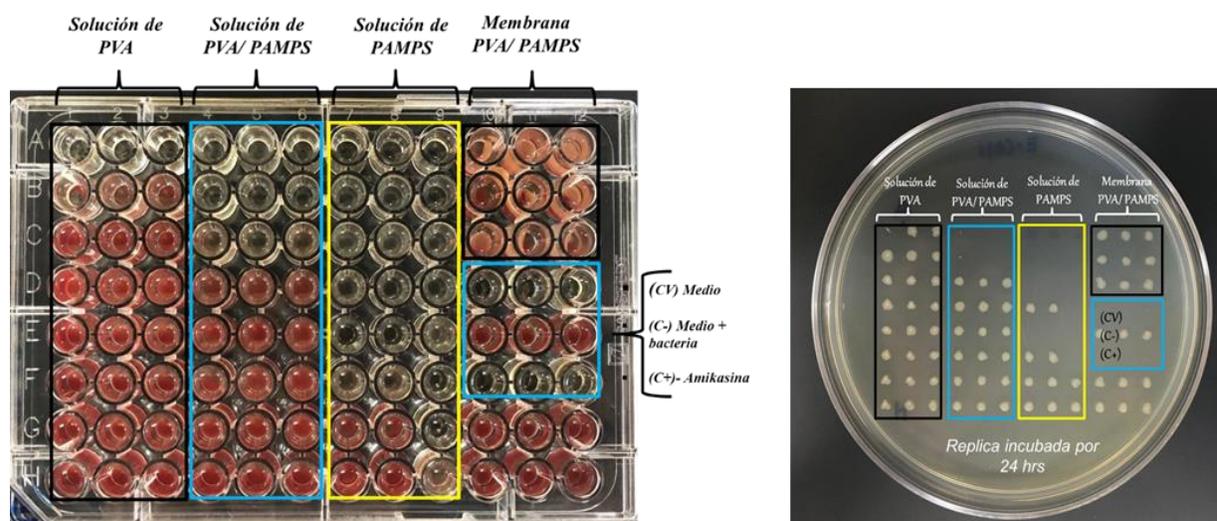


Figura 3.17 Placa y réplica en caja Petri del ensayo para *E. coli*

- *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 3.14 se presentan los resultados de las microdiluciones con la cepa *S.aureus*, la cual confirma la inhibición por PAMPS a partir de una concentración al 7.5% y en la mezcla con PVA a un 15% con carácter bactericida, mientras que el PVA puro presenta inhibición desde un 30% pero solo de manera bacteriostática.

Tabla 3.14 Resultados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para *S.aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Membrana	Bactericida	MBC	Bacteriostático	MIC
<i>PVA</i>	<i>Negativo</i>	---	<i>Positivo</i>	<i>30%</i>
<i>PAMPS</i>	<i>Positivo</i>	<i>15%</i>	<i>Positivo</i>	<i>7.5%</i>
<i>PVA/PAMS</i>	<i>Positivo</i>	<i>15%</i>	<i>Positivo</i>	<i>15%</i>

Para cada caso fue posible confirmar la acción del agente activo con la replicación de la placa como se puede observar en la figura 3.18.

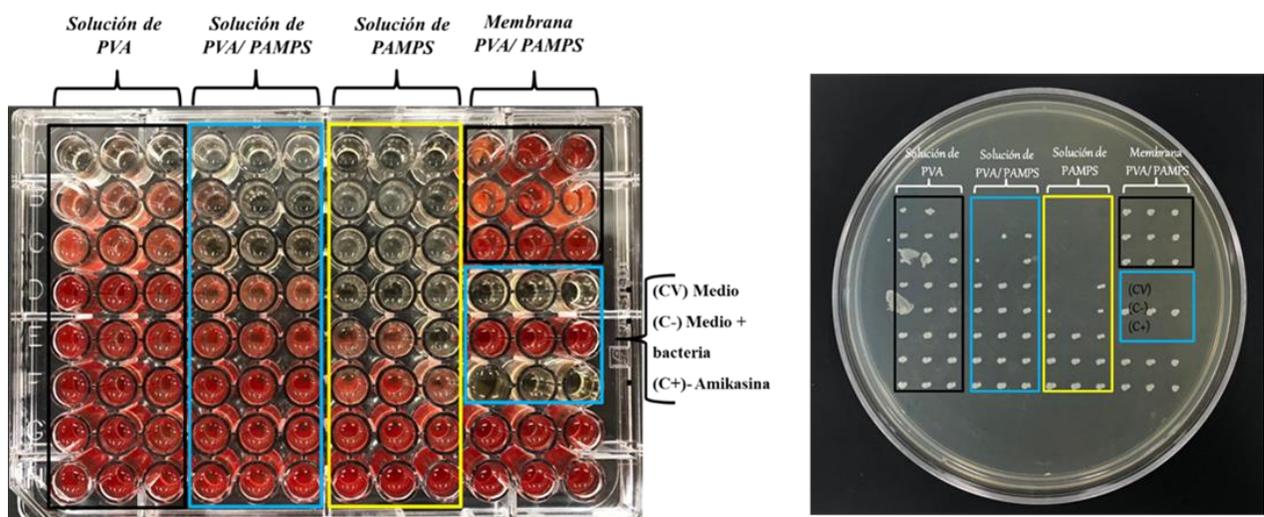


Figura 3.18 Placa y réplica del ensayo para *S. aureus*

- *Pseudomona aureuginosa*

Por otra parte, se realizó la prueba con la cepa *P. aureuginosa* que se toma en cuenta como complemento de las cepas que atacan las lesiones dérmicas. Como se muestra en la Tabla 3.15 las microdiluciones con la cepa presenta inhibición por PAMPS a partir de una concentración al 15% y con carácter bactericida a partir del 30%, mientras que, en la mezcla con PVA inhibe a partir del 15% y el PVA puro presenta inhibición desde un 30%, ambos solo de manera bacteriostática.

Tabla 3.15 Resultados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para *P. aureuginosa*

<i>Pseudomona aureuginosa</i>				
Membrana	Bactericida	MBC	Bacteriostático	MIC
<i>PVA</i>	Negativo	---	Positivo	30%
<i>PAMPS</i>	Positivo	30%	Positivo	15%
<i>PVA/PAMS</i>	Negativo	---	Positivo	30%

La confirmación de la acción del agente activo se realizó con la replicación de la placa como se puede observar en la figura 3.19.

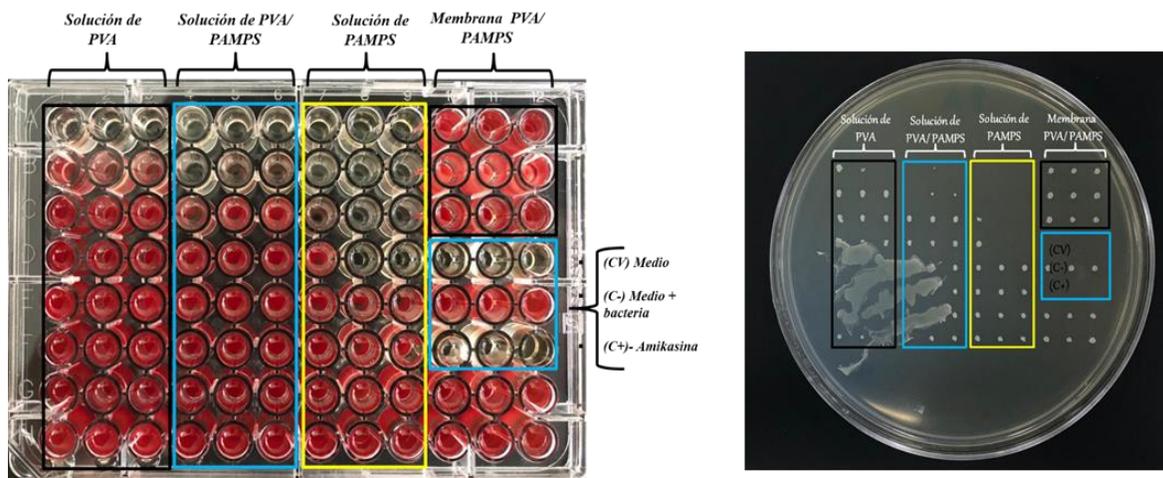


Figura 3.19 Placa y réplica del ensayo para *P. aureuginosa*

Finalmente, se realizó la prueba con el hongo *C. albicans*. Como se muestra en la Tabla 3.16 las microdiluciones con la cepa presenta inhibición por PAMPS a partir de una concentración al 30%, sin embargo, en las microdiluciones con PVA no muestra inhibición alguna y la mezcla PVA/PAMPS solo muestra una ligera inhibición bacteriostática al 30%.

Tabla 3.16 Resultados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para *C. albicans*

<i>Candida albicans</i>				
Membrana	Bactericida	MBC	Bacteriostático	MIC
PVA	Negativo	---	Negativo	---
PAMPS	Positivo	30%	Positivo	30%
PVA/PAMS	Negativo	---	Negativo	30%

La confirmación de la acción de los materiales se realizó con la replicación de la placa como se puede observar en la figura 3.20.

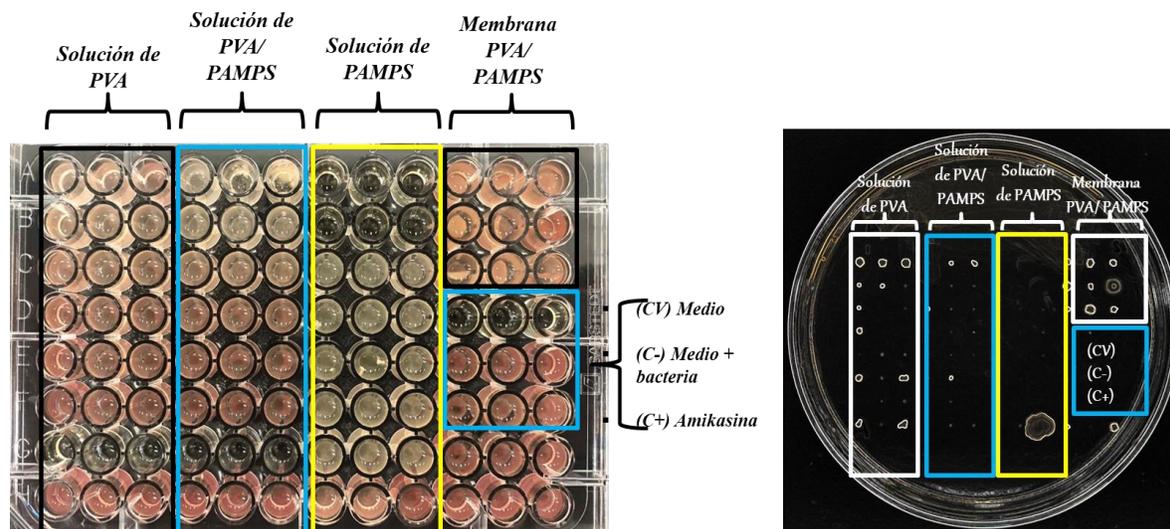


Figura 3.20 Placa y réplica del ensayo para *C. albicans*

CONCLUSIONES

- Las membranas de PVA y PVA/PAMPS se elaboraron de manera exitosa usando como no disolvente etanol/2-propanol (90/10 % v/v) a 30°C, con un tiempo de formación de 2 horas y una humedad de 50-60%. A estas condiciones, se obtuvieron membranas de PVA/PAMPS con estructura bicapa compuesta de una capa densa y una porosa.
- La morfología resultante de las membranas de PVA/PAMPS mostrada por SEM asocia la capa densa al polímero PAMPS y la capa porosa a PVA con trazas de PAMPS, lo que sugiere la obtención de una estructura biomimética a la piel. La caracterización morfológica y cuantitativa de la membrana por diversas técnicas (IEC, SEM, XPS y EDX) confirmó los componentes de cada capa en las superficies de las membranas.
- Las pruebas de hinchamiento, pérdida de masa y degradación en el buffer de fosfatos pudieron demostrar el entrecruzamiento, la estabilidad e integridad de la membrana después del ensayo. Se obtuvo un aumento considerable del porcentaje de hinchamiento con el incremento del PAMPS en la mezcla, pasando de 333.92% en la membrana de PVA a 343.73 % en la membrana de PVA con 15% de PAMPS lo cual facilita aun mas la adhesión celular a la membrana.
- Las pruebas mecánicas a tensión de las membranas húmedas indicaron un comportamiento similar a la de la piel humana. El módulo elástico, el máximo esfuerzo a tensión y el porcentaje de deformación permanecen en un intervalo cercano a valores reportados para la piel (0.64 MPa, 0.7 y 180 % respectivamente).
- La adición e incremento de PAMPS en las membranas de PVA resulta benéfico para mejorar la biocompatibilidad en las membranas, además, la estructura porosa de las películas permite incrementar la proliferación celular en comparación con la capa densa de la estructura.

- La introducción de PAMPS en las membranas microporosas es altamente efectivo para impartir actividad antimicrobiana. La membrana PVA/PAMPS con 15% de PAMPS presenta mayor inhibición contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aureuginosa*, además, de presentar propiedades bactericidas y bacteriostáticas en las mezclas.
- En general, de acuerdo con los resultados obtenidos, es posible inferir que, el desarrollo de membranas microporosas constituidas de mezclas poliméricas permite generar películas con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos dérmicos, gracias a su morfología, biocompatibilidad y su importante carácter antimicrobiano conferido gracias a la conjunta adición de polímeros con cualidades inhibitorias.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. V. Regí, Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos, *Rev. Farm. Univ. Complut.*, 15, 10–14, 1999.
- [2] L. Peng *et al.*, Characterization of a novel polyvinyl alcohol / chitosan porous hydrogel combined with bone marrow mesenchymal stem cells and its application in articular cartilage repair, *BMC Musculoskelet. Disord.*, 7, 1–12, 2019.
- [3] R. Lakshmanan *et al.*, Evaluation of dermal tissue regeneration using resveratrol loaded fibrous matrix in a preclinical mouse model of full-thickness ischemic wound, *Int. J. Pharm.*, 558, 177–186, 2019.
- [4] J. Yannas, Gordon PL, Huang C, Silver FH, Burke, Crosslinked Collagen-Mucopolysaccharide Composite Materials, Patent 4280954, 1980.
- [5] R. H. Schmedlen, K. S. Masters, and J. L. West, Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering, *Biomaterials*, 23, 4325–4332, 2002.
- [6] Swapna, S. Thom, Suresh, Saranya, Rahana, and R. Stephen, Thermal properties of poly (vinyl alcohol)(PVA)/halloysite nanotubes reinforced nanocomposites, *Int. J. Plast. Technol.*, 19, 124–136, 2015.
- [7] C. Huang, K. Hu, and Z. Wei, Comparison of cell behavior on pva / pva-gelatin electrospun nanofibers with random and aligned configuration, *Nat. Sci. Reports*, 6, 1–8, 2016.
- [8] E. A. Kamoun, X. Chen, M. S. Mohy Eldin, and E. R. S. Kenawy, Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers, *Arab. J. Chem.*, 8, 1–14, 2015.
- [9] S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, H. Brancal, P. Coutinho, and I. J. Correia, Thermoresponsive chitosan – agarose hydrogel for skin regeneration, *Carbohydr.*

Polym., 111, 366–373, 2014.

- [10] A. Shah, M. Ali, E. A. Arafa, I. Hussain, and L. Li, The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-sericin) films loaded with moxifloxacin, *Int. J. Pharm.*, 564, 22–38, 2019.
- [11] L. Song *et al.*, Biocompatibility of polypropylene non-woven fabric membrane via UV-induced graft polymerization of 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid, *Appl. Surf. Sci.*, 258, 425–430, 2011.
- [12] C. Soykan, R. Coskun, and S. Kirbag, Poly(crotonic acid-co-2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)-metal complexes with copper(II), cobalt(II), and nickel(II): Synthesis, characterization and antimicrobial activity, *Eur. Polym. J.*, 43, 4028–4036, 2007.
- [13] B. Bolto, T. Tran, M. Hoang, and Z. Xie, Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes, *Prog. Polym. Sci.*, 34, 969–981, 2009.
- [14] World Health Organization, Burns, 2018.
- [15] A. Fonseca, Burn Wound Infections, *medscape*, 17, 1–4, 2016.
- [16] M. S. Granick, A. Sood, and N. L. Tomaselli, Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data, *Adv. Wound Care*, 3, 511–529, 2014.
- [17] E. A. Kamoun, E. S. Kenawy, and X. Chen, A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications : PVA-based hydrogel dressings, *J. Adv. Res.*, 8, 217–233, 2017.
- [18] A. Grice and A. Segre, The skin microbiome, *Nat Rev Microbiol*, 9, 244–253, 2013.
- [19] D. Church, S. Elsayed, O. Reid, B. Winston, and R. Lindsay, Burn Wound Infections, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19, 403–434, 2006.
- [20] N. Beltran Vargas, *Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos*. México, 2016.

- [21] A. Sepúlveda, J. Saavedra, *Sistema tegumentario*. México, 2015.
- [22] M. I. Chaves-rodríguez, L. A. Calvo-castro, R. Alva-, O. Madrigal-monge, and A. Ulloa-fernández, Skin grafts and substitutes developed by Tissue Engineering, *Tecnol. en marcha-Ingeniería Tejidos*, 46–57, 2014.
- [23] B. Feng *et al.*, Bioresorbable electrospun gelatin / polycaprolactone nanofibrous membrane as a barrier to prevent cardiac postoperative adhesion, *Acta Biomater.*, 83, 211–220, 2019.
- [24] M. Ulbricht, Advanced functional polymer membranes, *Polymer (Guildf.)*, 47, 2217–2262, 2006.
- [25] J. V. L. D. S. Marcos A. Sabino, Marielys Loaiza, Janaína Dernowsek, Rodrigo Rezende, Técnicas Para La Fabricación De Andamios Poliméricos Con Aplicaciones En Ingeniería De Tejidos, *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.*, 37, 120–146, 2017.
- [26] A. Hernández, J. I. Calvo, P. Prádanos, L. Palacio, M. L. Rodríguez, and J. A. De Saja, Surface structure of microporous membranes by computerized SEM image analysis applied to Anopore filters, *J. Memb. Sci.*, 137, 89–97, 1997.
- [27] J. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, 2da ed. Enschede, Países Bajos, 1996.
- [28] X. Dong, A. Al-Jumaily, and I. C. Escobar, Investigation of the use of a bio-derived solvent for non-solvent-induced phase separation (NIPS) fabrication of polysulfone membranes, *Membranes (Basel)*, 8, 2–17, 2018.
- [29] U. Maähr, H. Purnama, E. Kempin, R. Schomaäcker, and K. H. Reichert, Synthesis and characterization of porous polymer membranes produced by interparticle crosslinking, *J. Memb. Sci.*, 171, 285–291, 2000.
- [30] R. C. Ruaan, T. Chang, and D. M. Wang, Selection criteria for solvent and coagulation medium in view of macrovoid formation in the wet phase inversion process, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 37, 1495–1502, 1999.

- [31] H. A. Tsai *et al.*, Morphology control of polysulfone hollow fiber membranes via water vapor induced phase separation, *J. Memb. Sci.*, 278, 390–400, 2006.
- [32] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. Roberto, Biodegradable and bioactive porous polymer / inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 3413–3431, 2006.
- [33] J. C. Middleton and A. J. Tipton, Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 21, 2335-2346 Synthetic, 2000.
- [34] N. Vargas-alfredo, A. Dorronsoro, and A. L. Cortajarena, Antimicrobial 3D Porous Scaffolds Prepared by Additive Manufacturing and Breath Figures, *Appl. Mater. Interfaces*, 9, 37454–37462, 2017.
- [35] H. Z. Li, S. C. Chen, and Y. Z. Wang, Thermoplastic PVA/PLA blends with improved processability and hydrophobicity, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53, 17355–17361, 2014.
- [36] P. Alexy *et al.*, Poly(vinyl alcohol)-collagen hydrolysate thermoplastic blends: I. Experimental design optimisation and biodegradation behaviour, *Polym. Test.*, 22, 801–809, 2003.
- [37] A. Aguilar, Sistemas poliméricos hidrofílicos con grupos ionizables y su aplicación como biomateriales, PhD Thesis, Universidad Complutense de Madrid, España, 2002.
- [38] L. V. Thomas, An electrospun citric acid modified polyvinyl alcohol scaffold for vascular tissue engineering, *Bioact. Compat. Polym.*, 1–17, 2019.
- [39] J. Jeong and S. Lee, Electrospun poly (vinyl alcohol) nanofibrous membranes containing Coptidis Rhizoma extracts for potential biomedical applications, *Text. Res. J.*, 89, 3506–3518, 2019.
- [40] S. Ceylan, D. Göktürk, D. Demir, M. Damla Özdemir, and N. Bölgen, Comparison of additive effects on the PVA/starch cryogels: Synthesis, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity studies, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 22, 1–10, 2017.

- [41] J. S. Suwandi, R. E. M. Toes, T. Nikolic, and B. O. Roep, Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 33, 97–103, 2006.
- [42] S. Jiang, S. Liu, and W. Feng, PVA hydrogel properties for biomedical application, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 4, 1228–1233, 2011.
- [43] K. A. Whitehead, J. Colligon, and J. Verran, Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions, *Colloids and surfaces*, 41, 129–138, 2005.
- [44] J. M. Anderson, Biological responses to materials, *Annu. Rev. Mater. Res.*, 31, 81–110, 2001.
- [45] D. F. Williams, Tissue-biomaterial interactions, *Mater. Sci. Eng. C*, 22, 3421–3445, 1987.
- [46] J. M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, and D. J. Burgess, Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response, *AAPS J.*, 12, 188–196, 2010.
- [47] I. Standard, "Iso 10993-3-2003", *Int. Stand.*, 3, 1–16, 2003.
- [48] Y. E. El Mogahzy, Finishing processes for fibrous assemblies in textile product design, *Eng. Text.*, 23, 300–326, 2009.
- [49] L. C. D. Avignon *et al.*, Contribution of bacterial and viral infections to attributable mortality in patients with severe burns : An autopsy series, *Burns*, 36,773–779, 2010.
- [50] M. S. Kinch, E. Patridge, M. Plummer, and D. Hoyer, An analysis of FDA-approved drugs for infectious disease: antibacterial agents, *Drug Discov. Today*, 19, 1283–1287, 2014.
- [51] W. Norbury, D. N. Herndon, J. Tanksley, M. G. Jeschke, and C. C. Finnerty, Infection in Burns, *Surg. Infect. (Larchmt)*, 17, 250–255, 2016.

- [52] L. K. Branski, A. Al-mousawi, H. Rivero, M. G. Jeschke, A. P. Sanford, and D. N. Herndon, Emerging Infections in Burns, *Surg. Infect. (Larchmt)*., 10, 389–396, 2009.
- [53] Y. Wang *et al.*, Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 123, 3–17, 2018.
- [54] R. Yañez-mac, A. Muñoz-bonilla, M. A. De Jes, H. Maldonado-textle, C. Guerrero-s, and U. S. Schubert, Combinations of Antimicrobial Polymers with Nanomaterials and Bioactives to Improve Biocidal Therapies, *Polymers (Basel)*., 11, 1–31, 2019.
- [55] A. Muñoz-bonilla and M. Fernández-garcía, Poly(ionic liquid)s as antimicrobial materials, *Eur. Polym. J.*, 1–28, 2018.
- [56] J. Wang, K. Lewis, and A. M. Klibanov, Immobilized N -Alkylated Polyethylenimine Avidly Kills Bacteria by Rupturing Cell Membranes With No Resistance Developed, *wilwy Period. Inc*, 0002, 715–722, 2005.
- [57] A. Mu and M. Fernández-garcía, Polymeric materials with antimicrobial activity, *Prog. Polym. Sci.*, 37, 281–339, 2012.
- [58] A. Y. Jiao, L. Niu, S. Ma, J. Li, R. Franklin, and J. Chen, Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance, *Prog. Polym. Sci.*, 1–52, 2017.
- [59] Y. Wang, Z. Wang, K. Wu, and J. Wu, Synthesis of cellulose-based double-network hydrogels demonstrating high strength, self-healing, and antibacterial properties, *Carbohydr. Polym.*, 168, 112–120, 2017.
- [60] D. . García, J. . Escobar, M. Bocourt, N. Bada, D. Zaldivar, and I. Katime, Influencia del agente entrecruzante y la composición en hidrogeles de poli (ácido itacónico-co-ácido metacrílico), *Rev. Iberoam. polímeros*, 4, 1–13, 2003.
- [61] M. Bay, M. Jones, H. Osholm, and J. Jacobsen, Acids generally recognized as safe affect morphology and biocompatibility of electrospun chitosan / polyethylene oxide nanofibers, *Carbohydr. Polym.*, 215, 253–262, 2019.

- [62] N. N. Rupiasih, T. Istirokhatun, and R. Rachmawaty, Blend membrane of succinic acid-crosslinked chitosan grafted with heparin / PVA-PEG (polyvinyl alcohol-polyethylene glycol) and its characterization, *Mater. Sci. Eng.*, 349, 0–9, 2018.
- [63] A. Yamasaki, T. Shinbo, and K. Mizoguchi, Pervaporation of Benzene / Cyclohexane and Benzene / n-Hexane Mixtures Through PVA Membranes, *Appl. Polym. Sci.*, 193, 1061–1065, 1996.
- [64] M. I. Loria-bastarrachea, E. Herna, and M. O. Gonza, Preparation and characterization of crosslinked PVA / PAMPS blends catalytic membranes for biodiesel production, *Polymer (Guildf)*., 74, 2741–2754, 2017.
- [65] Gary D. Christian, *Química analítica*, 6ta ed. México, 2009.
- [66] L. V Thomas, s. U. A. Æ. S. Remya, and P. D. Nair, A biodegradable and biocompatible PVA – citric acid polyester with potential applications as matrix for vascular tissue engineering, *J. Mater Sci Mater Med*, 20, 259–269, 2009.
- [67] BRITISH STANDARD (BSI), Biological evaluation of medical devices, *Biol. Eval. Med. devices*, 10993–1, 1–21, 2010.
- [68] C. D. ISO and Standard, Biological evaluation of medical devices "ISO10993-2", *Int. Stand.*, 1–13, 2003.
- [69] N. Rodríguez-Fuentes *et al.*, Nukbone promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 434, 676–680, 2013.
- [70] J. H. Jorgensen and M. J. Ferraro, Antimicrobial Susceptibility Testing : A Review of General Principles and Contemporary Practices, *Med. Microbiol.*, 7750, 1749–1755, 2009.
- [71] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.*, 6, 71–79, 2016.

- [72] S. Kim and K. Lee, Poly (vinyl alcohol) Membranes Having an Integrally Skinned Asymmetric Structure, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1406, 1563–5287, 2009.
- [73] C. Yam, Membranas basadas en polisulfona sulfonada para ultrafiltración y osmosis inversa, PhD Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), México, 2016.
- [74] P. Thurmer, Beatriz Poletto, Effect of Non-Solvents Used in the Coagulation Bath on Morphology of PVDF Membranes, *Materials (Basel)*., 15, 884–890, 2012.
- [75] C. Ezeakacha, A. Rabbani, and S. Salehi, Integrated Image Processing and Computational Techniques to Characterize Formation Damage, *Soc. Pet. Eng.*, 1–13, 2018.
- [76] A. Rabbani and S. Salehi, Dynamic modeling of the formation damage and mud cake deposition using filtration theories coupled with SEM image processing, *J. Nat. Gas Sci. Eng.*, 42, 157–168, 2017.
- [77] J. H. Giuseppe Perale, *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*. United Kingdom: Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 2017.
- [78] N. Davidenko *et al.*, Acta Biomaterialia Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics, *Acta Biomater.*, 25, 131–142, 2015.
- [79] A. N. Annaidh, M. Ottenio, K. Bruyère, M. Destrade, M. D. Gilchrist, and B. Cédex, Mechanical Properties of Excised Human Skin, in *Federación Internacional de Ingeniería Médica y Biológica*, 2010, 31, 2–5.
- [80] M. Griffin, Y. Premakumar, A. Seifalian, P. E. Butler, and M. Szarko, Biomechanical Characterization of Human Soft Tissues Using Indentation and Tensile Testing, *J. Vis. Exp.*, 118, 1–8, 2016.
- [81] E. M. Ahmed, Hydrogel : Preparation , characterization , and applications : A review, *J. Adv. Res.*, 6, 105–121, 2015.

- [82] S. Lin, C. Yuan, and A. Ke, Electrical Sensitivity and Mechanical Properties of Fast T-IPN Hydrogels, *Adv. Polym. Technol.*, 32, 20–31, 2011.
- [83] L. S. Sakanaka, F. Yamashita, and M. V. E. Grossmann, Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect, *Carbohydr. Polym.*, 60, 283–289, 2005.
- [84] R. O. Ritchie, The conflicts between strength and toughness, *Nat. Mater.*, 10, 817–822, 2011.
- [85] Y. Wang, J. L. Robertson, W. B. Spillman, and R. O. Claus, Effects of the Chemical Structure and the Surface Properties of Polymeric Biomaterials on Their Biocompatibility, *Pharm. Res.*, 21, 1362–1373, 2004.
- [86] S. Raghavendra, M. M. C. Wood, and D. M. D. T. D. Taylor, Early Wound Healing Around Endosseous Implants : A Review of the Literature, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 20, 425–431, 2005.