



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“Evaluación *in vitro* de una matriz polimérica de aplicación
trasdérmica de polietilenglicol-quitosano como posible apósito
para el cierre de heridas”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICAS

PRESENTA:

Q.F.B. CLAUDIA MIRIAM ALONZO DE LA ROSA

DIRECTORES DE TESIS:

Ph. D. MIRIAM VERÓNICA FLORES MERINO

DR. EN C. JONNATHAN G. SANTILLÁN BENÍTEZ

DRA. EN C. DE M. GEORGINA CARBAJAL DE LA TORRE

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 1 DE FEBRERO DEL 2020



Índice

Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción	10
1.1 Medicina regenerativa	10
1.2 Ingeniería de tejidos y biomateriales	10
1.3 Redes poliméricas	11
1.4 Polietilenglicol	11
1.5 Quitosano	12
1.6 Biocompatibilidad	13
2. Antecedentes	16
3. Justificación	18
4. Planteamiento del problema	19
5. Hipótesis	20
6. Objetivo general	20
7. Objetivos específicos	20
8. Estrategia metodológica	20
9. Variables de estudio	20
10. Criterios	21
11. Consideraciones bioéticas	21
12. Materiales y reactivos	22
13. Metodología	23
13.1 Acrilación del polietilenglicol	23
13.2 Síntesis de la matriz polimérica de polietilenglicol (PEG)	24
13.3 Síntesis de la matriz polimérica de PQ	24
13.4 Tratamiento para mantener las matrices poliméricas libres de patógenos	26
13.5 Caracterización fisicoquímica de la matriz polimérica de PQ	26
13.5.1 Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	26
13.5.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	26
13.5.3 Cinética de hinchamiento	26
13.6 Caracterización biológica de la matriz polimérica de PQ	27

13.6.1	Evaluación de actividad antibacteriana por método turbidimétrico	27
13.6.1.1	Microorganismos de prueba	27
13.6.1.2	Preparación del inóculo	27
13.6.1.3	Para las muestras	27
13.6.2	Evaluación de la viabilidad celular directa	29
13.6.2.1	Propagación celular	29
13.6.2.2	Conteo celular	29
13.6.2.3	Viabilidad celular	30
13.6.2.4	Ensayo con resazurina	31
13.6.3	Ensayo de hemólisis	31
13.6.4	Ensayo de hemoglobina libre	32
14.	Análisis estadístico	33
15.	Resultados y discusiones	34
15.2	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	36
15.3	Cinética de hinchamiento	38
15.4	Evaluación de la actividad antibacteriana	42
15.5	Viabilidad celular directa	46
15.6	Ensayo de hemólisis	49
15.7	Ensayo de hemoglobina libre	51
16.	Conclusiones	54
17.	Referencias	55
18.	Anexos	61
18.1	Tabla de variables de estudio	61
18.2	Aprobación Comité de ética del CICMED	62
18.3	Consentimiento informado	63
18.4	Anexo estancia de maestría	64
18.5	Anexo de terminación de estancia de maestría	65
18.6	Productos	66
18.6.1	Certificado de presentación oral en el ISSIB 2019	67
18.7	Abreviaturas	68

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del polietilenglicol.....	12
Figura 2. Estructura química del quitosano	12
Figura 3. Reacción de acrilación del PEG.	23
Figura 4. Síntesis de la matriz polimérica de PQ.....	25
Figura 5. Cámara de Neubauer	29
Figura 6. Cuadrantes de la cámara de Neubauer.....	30
Figura 7. Espectometría de FT-IR.	35
Figura 8. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	37
Figura 9. Representación gráfica del % de hinchamiento en PBS a 37°C.	39
Figura 10. Representación gráfica del % de hinchamiento en PBS a temperatura ambiente.....	40
Figura 11. Representación gráfica de la actividad antibacterial contra <i>S. aureus</i>	44
Figura 12. Representación gráfica de la actividad antibacterial contra <i>E.coli</i>	45
Figura 13. Representación gráfica del ensayo de viabilidad celular directa en FDH.. ...	48
Figura 14. Representación gráfica del % de hemólisis en eritrocitos humanos.....	50
Figura 15. Representación gráfica de la hemoglobina libre relativa en sangre humana.	52

Índice de tablas

Tabla 1. Cantidad de quitosano utilizada para cada matriz polimérica	25
Tabla 2. Constitución del medio de cultivo No. 3	28
Tabla 3. Medias y desviación estándar del % de hinchamiento en PBS a 37°C	39
Tabla 4. Medias y desviación estándar del % de hinchamiento en PBS a temperatura ambiente	40
Tabla 5. Medias y desviación estándar de la absorbancia medida para cada bacteria...43	
Tabla 6. Medias y desviación estándar de la intensidad fluorescente	47
Tabla 7. Medias y desviación estándar del % de hemólisis	49
Tabla 8. Medias y desviación estándar de la hemoglobina libre relativa	51

Resumen

Las matrices poliméricas interpenetradas se consideran una forma efectiva de combinar las propiedades de dos o más materiales poliméricos en uno. El objetivo de este trabajo fue sintetizar y caracterizar las matrices poliméricas hechas de polietilenglicol (PEG) y quitosano como posibles apósitos para el cierre de heridas con propiedades antibacterianas. Las matrices poliméricas se sintetizaron por un método secuencial, agregando quitosano en diferentes proporciones (0.05, 0.1, 1, 2 y 4 %) al PEG. Para la caracterización fisicoquímica de las matrices, se realizó espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El comportamiento de hinchamiento se estudió en PBS a dos temperaturas diferentes: 37 °C y temperatura ambiente (25 ± 2 °C). El mayor hinchamiento fue en PBS a 37 °C (<315 %). Las propiedades antibacterianas de las matrices se evaluó mediante el MGA 0100 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y se demostró que PQ-2% fue el material con mayor actividad contra *S. aureus*. Las matrices no mostraron actividad contra *E. coli*. También se realizaron los ensayos de hemólisis y hemoglobina libre. Se utilizaron fibroblastos dérmicos humanos (FDH) para evaluar la citotoxicidad de las matrices. Los resultados mostraron que las redes semi-interpenetradas son hemocompatibles con sangre humana (<5 % de hemólisis) y el análisis de citotoxicidad indicó que la red de polímeros semi-interpenetrados no es tóxica para los fibroblastos dérmicos humanos. De acuerdo con los resultados, la combinación de PEG y quitosano como redes de polímeros semi-interpenetrados, en especial la red de PQ-2%, es adecuada para heridas en la piel además de que provee de propiedades antibacterianas contra *S. aureus*.

Abstract

Interpenetrated polymer networks are considered an effective way to combine the properties of two or more polymeric materials into one. The objective of this work was to synthesize and characterize polymeric matrix made of polyethylene glycol (PEG) and chitosan as possible wounds dressings with antibacterial properties. Polymeric networks were synthesized by a sequential method, adding chitosan in different proportions (0.05, 0.1, 1, 2 y 4 %) to PEG. For the characterization of the materials, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscopy (SEM) were performed. Swelling behavior was studied in PBS at two different temperatures: 37 °C and room temperature (25 ± 2 ° C). The maximum swelling of all the matrices was in PBS at 37 °C (<315 %). The antibacterial properties of the polymeric matrices were evaluated by the MGA 0100 of the Pharmacopoeia of the Mexican United States and it was shown that PQ-2% was the material with the highest activity against *S. aureus*. The matrices showed no activity against *E. coli*. Hemolysis and free hemoglobin assays were also evaluated. Human dermal fibroblasts (FDH) were used to assess the cytotoxicity of the matrices. The results showed that semi-interpenetrated networks are hemocompatible with human blood (<5 % of hemolysis) and the cytotoxicity analysis indicated that the network of semi-interpenetrated polymers is not toxic to human dermal fibroblasts. According to the results, the combination of PEG and chitosan as networks of semi-interpenetrated polymers, specially the PQ-2% network, is suitable for skin wounds and also provides antibacterial properties against *S. aureus*.

1. Introducción

Actualmente muchas enfermedades crónicas no tienen cura efectiva, millones de personas sufren de padecimientos que deterioran los órganos o tejidos del cuerpo humano y por lo tanto su calidad de vida se ve afectada. Los avances en la medicina regenerativa y en el área de los biomateriales provee un potencial para el progreso hacia terapias realmente efectivas.

Tratamientos y enfoques de la ingeniería de tejidos basados en el uso de biomateriales, tendrán un impacto positivo en la salud de las personas que sufren de problemas como: diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y desordenes degenerativos; sin embargo, uno de los retos es diseñar materiales biocompatibles y comprender sus interacciones con los componentes biológicos.

1.1 Medicina regenerativa

Un campo de estudio amplio que incluye la ingeniería de tejidos e incorpora la investigación de la curación del cuerpo a través de sus propios sistemas y mecanismos es la medicina regenerativa. El término “medicina regenerativa” e “ingeniería de tejidos” se han usado comúnmente como sinónimos ya que ambos tienen como objetivo curar los órganos o tejidos dañados.¹

1.2 Ingeniería de tejidos y biomateriales

La Ingeniería de tejidos es un área interdisciplinaria que aplica los conocimientos de varios campos de la ciencia como la bioingeniería, la medicina, la química y la ingeniería de materiales para resolver problemas clínicos asociados a la pérdida de tejido y el fallo funcional de órganos por enfermedad o accidente. Uno de los enfoques de la ingeniería tisular consiste en usar biomateriales que promuevan la proliferación y diferenciación de las células por medio de la activación de los mecanismos de regeneración biológicos². El concepto de biomaterial se puede aplicar a un amplio rango de situaciones, en este contexto se define como “un material capaz de estar en contacto con tejidos vivos con la finalidad de completar al tejido y/o de ayudar a mejorar el funcionamiento de éste cuando forma parte de un sistema, sin afectar al resto del organismo, y sin ser afectado por él, al menos que así se hubiera diseñado”³. Existen diferentes tipos de biomateriales, entre

estos los hidrogeles o también llamadas redes poliméricas que han cobrado gran importancia y han captado la atención de los científicos.

1.3 Redes poliméricas

Son materiales tridimensionales de origen polimérico que se consideran tienen similitud estructural con los componentes biológicos⁴. Han sido utilizados en tratamientos de cierre de heridas, especialmente en aquellas que requieren alto grado de humectación (ejemplo: heridas necróticas) hasta como andamiajes para estudiar los procesos de diferenciación celular⁵.

Cada tipo de red polimérica presenta ventajas y a su vez desventajas que han mermado su aplicación. La combinación de dos o más redes poliméricas o polímeros representa un camino efectivo para superar las limitaciones. Un tipo especial de hidrogeles son las llamadas “redes poliméricas interpenetradas”, que son consideradas como un camino efectivo para combinar las propiedades de dos o más materiales poliméricos en uno solo⁶. Por ejemplo, mientras que los hidrogeles de polietilenglicol (PEG) son materiales altamente biocompatibles, no poseen propiedades antimicrobianas, como es el caso de las redes poliméricas de quitosano⁷. Por lo tanto, la adición o combinación de otros materiales o moléculas activas representa una oportunidad para incorporar características de funcionalidad críticas.

1.4 Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) es un polímero sintético aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para aplicaciones intravenosas, orales y dérmicas en humanos. Además, el polietilenglicol tiene propiedades únicas como alta hidrofiliidad, no inmunogenicidad, baja adhesión a proteínas, no tóxico, no inmunogénico⁸; todas estas propiedades lo hacen un candidato ideal para su uso en el tratamiento de heridas.

El estado físico del PEG depende de su peso molecular; el PEG de 100 a 700 es líquido a temperatura ambiente, mientras que el PEG entre 1000 y 2000 es sólido blando y el PEG con un peso molecular mayor a 2000 es sólido cristalino duro con un punto de fusión de 63° C. La alta polaridad del PEG incrementa su hidrofiliidad y como consecuencia mejora su solubilidad en agua. La hidrofiliidad está determinada por el ángulo de

contacto. Además, el PEG es eléctricamente neutro a cualquier pH; es inerte en el entorno biológico, con baja adhesión a proteínas y produce un grado insignificante de inflamación⁹. Sin embargo, según Kokabi M. *et al.*¹⁰, un apósito ideal para heridas debe tener propiedades antibacterianas, que el PEG por sí mismo no tiene. Por ello, existen polímeros como el quitosano, que tienen propiedades antibacterianas. Por esta razón, los polímeros se pueden combinar para formar matrices poliméricas semi-interpenetradas para tener las propiedades de todos ellos en uno solo.

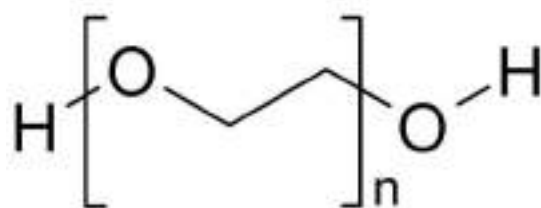


Figura 1. Estructura química del polietilenglicol¹¹

1.5 Quitosano

El quitosano es un biopolímero natural derivado de la quitina que fue descubierto en 1811 por el químico francés Henri Braconnot¹².

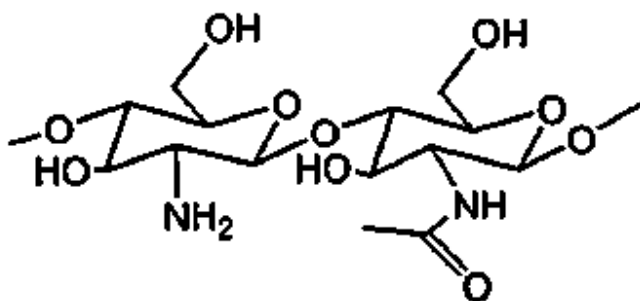


Figura 2. Estructura química del quitosano¹²

El quitosano está compuesto por dos unidades repetitivas de 2-amino-desoxi-β-D-Glucopiranososa; su principal fuente es la quitina, la cual es sometida a un proceso de desacetilación en medio alcalino. Este grado de desacetilación determina las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano¹³. Algunas de estas propiedades son biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad y efecto antimicrobiano. Este último ha

sido estudiado en los últimos años, y una de las principales razones de esta actividad antimicrobiana del quitosano se debe al grupo amino con carga positiva que posee en su estructura a un pH menor a 6.3. Esta carga positiva interactúa con las cargas negativas que poseen las bacterias en su pared celular, provocando su rompimiento y por consecuencia, la pérdida de algunos compuestos proteicos y otros constituyentes celulares⁷.

Sin embargo, el quitosano al ser catiónico, atrae proteínas de carga negativa, lo cual puede ser perjudicial para el tratamiento de heridas cutáneas, pues al haber interacciones electrostáticas, las células se adhieren a la superficie del gel de quitosano, dando como origen una encapsulación fibrosa y un agravamiento en la inflamación celular¹⁴. Por este motivo, se ha buscado aminorar esta interacción electrostática con la adición de otro biopolímero que sinergice las propiedades del quitosano; uno de estos biopolímeros es el polietilenglicol.¹⁴

1.6 Biocompatibilidad

Se define como la habilidad que tiene un material para funcionar con una respuesta apropiada del hospedador, en este caso el cuerpo humano. La evaluación de la biocompatibilidad ha sido considerada un proceso complejo debido a la gran variedad de materiales que se encuentran disponibles para diversos usos. Por otra parte, los procesos de biocompatibilidad dependen de la cronología y de la localización, es decir se pueden presentar respuestas a largo, mediano o corto plazo y los efectos en el cuerpo humano pueden llegar a ser localizados o remotos (respuestas sistémicas). Por otra parte, los procesos de interacción entre los biomateriales y los componentes biológicos no son del todo entendidos³. Existen diferentes estándares internacionales, así como normas nacionales que abordan la evaluación toxicológica de los dispositivos médicos. En particular, la norma ISO 10993 ¹⁵ ofrece las pautas para evaluar materiales en etapas tempranas de desarrollo y establece los análisis que se deben de realizar para evaluar su riesgo en contacto con los humanos. Entre estos estudios se incluyen las interacciones con la sangre y la evaluación de la citotoxicidad *in vitro*. Así mismo, se establece que se debe comenzar por las pruebas *in vitro*; en caso de que éstas salgan positivas se procede

a realizar las pruebas de biocompatibilidad *in vivo* de acuerdo al tipo de dispositivo a evaluar.

1.7 Caracterización fisicoquímica

Algunas de las pruebas realizadas para la caracterización fisicoquímica de diversas matrices poliméricas incluyen la cinética de hinchamiento, Espectroscopía Infrarroja y Microscopía Electrónica de Barrido.

1.7.1 Cinética de hinchamiento

Ya que los hidrogeles son materiales higroscópicos, es de interés considerable estudiar el hinchamiento de estos bajo condiciones atmosféricas diferentes, para establecer los efectos de humedad en los datos de caracterización. Esto se refiere a parámetros como el medio en el que son inmersos y la temperatura. ¹⁶

1.7.2 Espectroscopía Infrarroja

La Espectroscopía Infrarroja es una técnica que ha sido utilizada por más de 70 años para la identificación de materiales desconocidos, la determinación de la calidad o consistencia de una muestra, y la determinación de la cantidad de componentes en una mezcla. Los picos de absorción emitidos en la Espectroscopía Infrarroja corresponden a las frecuencias de vibraciones entre los enlaces de los átomos que forman un material. Debido a que cada material es una combinación única de átomos, no hay dos compuestos que produzcan exactamente el mismo espectro infrarrojo. Por lo tanto, la espectroscopía infrarroja puede resultar en una identificación positiva. (análisis cualitativo) de cada tipo diferente de material. Además, el tamaño de los picos en el espectro es una indicación directa de la cantidad de material presente. ¹⁷

1.7.3 Microscopía Electrónica de Barrido

La Microscopía Electrónica de Barrido es una técnica utilizada para el examen y análisis de la morfología de la microestructura y caracterizaciones de composición química de diferentes materiales. La microscopía electrónica se ha desarrollado reemplazando la fuente de luz con un haz de electrones de alta energía. ¹⁸ El diseño del SEM, por lo tanto, depende de la interacción de un haz de un electrón primario con la muestra que da como

resultado la detección de una señal que consiste en cualquier forma de energía como resultado de la interacción.¹⁹

2. Antecedentes

Los biomateriales han sido empleados por el hombre no solo en el tratamiento de heridas crónicas, sino también en un sinfín de aplicaciones, como en lentes de contacto, vehículos farmacéuticos, materiales odontológicos, entre otros²⁰. Sin embargo, en el área de la ingeniería de tejidos, ha cobrado gran importancia el uso de matrices poliméricas semi-interpenetradas, ya que se pueden incorporar fácilmente nuevos agentes a su estructura, como algunos antibióticos, para mejorar su funcionalidad y obtener mejores beneficios en aplicaciones médicas²¹.

Xialoi Song y colaboradores en 2014 en China realizaron la síntesis de polietilenglicol/quitosano, injertado con ácido lactobiónico (PEG/LA-CS), además evaluaron su biocompatibilidad. La citocompatibilidad de PEG/LA-CS se llevó a cabo en células K562 (eritroleucemia), Hep G2 (cáncer de hígado) y LO2; el estudio demostró que la viabilidad celular disminuye al aumentar la concentración de PEG/LA-CS, sin embargo, la viabilidad celular es mayor del 80 % en comparación con el control (células no tratadas) después de interactuar con PEG/LA-CS durante 2,4 y 7 días para todas las líneas celulares. Por lo tanto, se concluye que PEG/LA-CS tiene buena citocompatibilidad.

En octubre de 2016, en México, Alondra Escudero y colaboradores, sintetizaron redes poliméricas de polietilenglicol y quitosano. Estos se pusieron en contacto con los componentes de sangre periférica de voluntarios sanos. La sangre se recogió en tubos de heparina Vacutainer. Todos los estudios se llevaron a cabo con muestras irradiadas y desinfectadas por triplicado. Las muestras fueron evaluadas para hemólisis, agregación de plaquetas y morfología de células mononucleares. El estudio cuantitativo demostró que el material es biocompatible porque exhibía menos del 5 % de hemólisis⁶. Además, para la toxicidad basada en masa, la actividad metabólica de fibroblastos se evaluó por el método XTT (sal de tetrazolio). Las células fueron tratadas a diferentes concentraciones de la red polimérica (5.4, 10.8, 16.2 y 32.4 mg) y se encontró que la viabilidad de estas, fue mayor al 80 % después de una exposición de 24 h con el material de PEG/quitosano⁶.

La proliferación celular se evaluó sembrando fibroblastos humanos en placas de microtitulación de 96 pocillos (1 x 10⁴ células / pocillo) y se incubaron durante la noche.

La viabilidad después de la exposición a redes poliméricas se evaluó a diferentes tiempos de exposición (1, 3, 7 y 10 días, 37 ° C, 5 % de CO₂ y 85 % de humedad) con un disco de la red polimérica (5.4 mg). La viabilidad de las células fue superior al 80%, lo que indicó que no hubo toxicidad en las células al aumentar el tiempo de exposición⁶.

Joel M. Berretta y colaboradores, en el 2017 en Estados Unidos, sintetizaron tres pastas de PEG/quitosano (pasta ácida al 1%, pasta ácida al 0.5 %, pasta ácida neutra) y su citocompatibilidad fue evaluada *in vitro*, con la determinación de la viabilidad celular en células NIH 3T3 después de estar en contacto con las pastas. Los resultados mostraron que las pastas son biocompatibles, ya que la viabilidad celular fue mayor al 79% en todas las pastas.²²

Guoqiang Jiang y colaboradores, en 2014 en China, sintetizaron una red polimérica de PEG/quitosano y evaluaron su citotoxicidad mediante ensayo MTT (metil tiazol tetrazolio), usando línea celular de fibrosarcoma murino L929 y los resultados muestran que la citotoxicidad depende de la concentración del polímero, pues al aumentar la concentración del polímero a 6 mg/mL, la viabilidad celular se redujo considerablemente, sin embargo, esta fue mayor al 80 %, concluyendo que la red polimérica no es citotóxica¹⁴.

Shengqi Zang y colaboradores en 2014 en China llevaron a cabo una comparación de las propiedades fisicoquímicas de una red polimérica de quitosano esterilizado y su aplicabilidad en un modelo canino de regeneración periodontal, además observaron la superficie de los hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados de los análisis evaluados, mostraron que el tamaño de poro fue de 140-230 μm , una viscosidad apropiada, capacidad de hinchamiento, degradación limitada, además de buena biocompatibilidad ²³.

Gaitán Tolosa y colaboradores, sintetizaron redes semi-interpenetradas de polietilenglicol y quitosano, e hicieron la caracterización fisicoquímica, incluyendo la Microscopía electrónica de Barrido (SEM). Los resultados mostraron que las redes poseían poros de diferente tamaño (13.7-26.8 nm).²⁴

3. Justificación

El tratamiento de heridas crónicas que no cicatrizan en pacientes con múltiples comorbilidades continúa siendo un desafío para los profesionales de la salud. Las heridas crónicas típicamente no progresan a través de las fases normales de curación de la herida y generalmente permanecen estancadas durante la fase inflamatoria.

Por tal motivo nos hemos dado a la tarea de buscar nuevas alternativas para el tratamiento del cierre de heridas, basado en el uso de biomateriales. Lo relevante de este posible tratamiento, es que está hecho a base de polietilenglicol y quitosano.

El polietilenglicol se caracteriza por tener propiedades únicas, tales como alta hidrofiliidad, no toxicidad, baja adhesión de proteínas y no inmunogenicidad⁸. Además, juega un papel importante en el mejoramiento de la reología²⁵ del gel y propiedades mecánicas, tiene buena biodegradabilidad y biocompatibilidad²⁶.

Por otro lado, la utilización del quitosano se debe a que este provee de características antisépticas, evitando el crecimiento bacteriano no deseado en heridas de la piel, además estimula a los fibroblastos que a su vez estimulan y liberan factores de crecimiento que favorecen el proceso de cicatrización²⁷.

Asimismo, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica y biológica de los filmes *in vitro*, para evitar el uso innecesario de animales y detectar los posibles riesgos en humanos, además se ofrecerán pautas en etapas tempranas del desarrollo de materiales destinados a estar en contacto con el cuerpo humano³.

Por lo anterior mencionado, este trabajo se enfoca en la evaluación *in vitro* de una matriz polimérica de aplicación transdérmica de polietilenglicol-quitosano como posible apósito para el cierre de heridas.

4. Planteamiento del problema

Las heridas crónicas son difíciles de curar y el período de tiempo requerido para la cronicidad se ha establecido en el rango de 4 semanas hasta más de 3 meses. En los países desarrollados, se estima que del 1 al 2 % de la población experimentará una herida crónica durante su vida. ^{28,29} Según la Sociedad de Curación de Heridas, las heridas crónicas se clasifican según las etiologías causales, en cuatro categorías: úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras venosas y úlceras por insuficiencia arterial.

Para este tipo de heridas, existen nuevas alternativas para el tratamiento del pie diabético, basado en el uso de biomateriales, específicamente las matrices poliméricas semi-interpenetradas, las cuales traen consigo algunas propiedades que pueden favorecer el proceso de cicatrización.

El PEG y el quitosano juntos, sinergizan sus propiedades, obteniendo matrices poliméricas con mayor estabilidad, no tóxicas, con propiedades antibacterianas, con baja adhesión a proteínas, no inmunogénicas, biocompatibles, entre otros.

Por lo tanto, la pregunta a resolver en estudio es: ¿la matriz polimérica de PEG y quitosano presentarán propiedades *in vitro* que demuestren su factibilidad para el cierre de heridas?

5. Hipótesis

La matriz polimérica de aplicación transdérmica presenta propiedades fisicoquímicas y biológicas *in vitro* que demuestran su factibilidad como apósito para el cierre de heridas.

6. Objetivo general

Evaluar las propiedades fisicoquímicas y biológicas *in vitro* de la matriz polimérica de aplicación transdérmica de polietilenglicol-quitosano.

7. Objetivos específicos

- Sintetizar los filmes de la matriz polimérica de polietilenglicol-quitosano.
- Evaluar las características fisicoquímicas de la matriz polimérica de PEG y quitosano mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), Espectroscopía Electrónica de Barrido (SEM) y cinética de hinchamiento.
- Realizar la caracterización biológica de la matriz polimérica de PEG y quitosano mediante la evaluación de la actividad antibacteriana, ensayo de hemólisis y ensayo de hemoglobina libre.

8. Estrategia metodológica

- **Diseño:** Experimental.
- **Universo:** No aplica por la naturaleza del tipo de estudio. Sólo en la prueba de hemocompatibilidad se requieren adultos sanos entre 18 y 60 años de edad.
- **Tipo de muestreo:** No aplica por la naturaleza del tipo de estudio, sólo en las pruebas de hemocompatibilidad y hemoglobina libre donde el tipo de muestreo fue crítico, eligiendo participantes con una edad entre 18 y 60 años.
- **Tamaño de muestra:** Cada experimento se realizará 5 veces. Solo la prueba de hemólisis se realizará por triplicado (n=3 por donador).

9. Variables de estudio

- **Independientes.** Concentración de quitosano en la red polimérica semi-interpenetrada de PEG y quitosano.

- **Dependientes:** Porcentaje de hinchamiento, estructura superficial, grado de inhibición de los microorganismos de prueba, viabilidad celular, porcentaje de hemólisis, hemoglobina libre.
- **Intervinientes:** No aplica por la naturaleza del estudio.

10. Criterios

Inclusión, exclusión y eliminación, no aplican por la naturaleza del estudio. Sólo en la prueba de hemólisis y hemoglobina libre, se incluyeron 3 adultos sanos, entre 18 y 60 años de edad, de sexo femenino o masculino; se excluyeron y eliminaron aquellos adultos que presentaron alguna enfermedad de cualquier etiología o que hayan consumido algún fármaco que alterara el número y la morfología de los eritrocitos (aspirina, AINES, antibióticos, entre otros) entre las 24 y 48 h previas a la muestra de sangre.

11. Consideraciones bioéticas

Los ensayos de hemólisis y hemoglobina libre, del presente trabajo, fueron realizados tomando en cuenta el artículo 323 de la Ley General de Salud³⁰ sobre el consentimiento de la donación de sangre, la NOM-087-ECOL-SA1-2002³¹ para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) y la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos³².

Asimismo, la realización de este trabajo fue aprobada por el Comité de Bioética del Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), CONBIOÉTICA: 2018/16.

12. Materiales, reactivos y equipos

Material o reactivo	Fabricante	Especificaciones
PEG	Polioles, México	PM= 4000 g/mol
Quitosano	Sigma Aldrich, USA	Bajo peso molecular, con un grado de desacetilación ≥ 75 %
Dihidrocloreto de 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida), AIBA	Sigma Aldrich, USA	Granular, 97 %
Ácido acético	Fermont, México	≥ 99.7 %
Éter etílico	Fermont, México	Anhidrido PM= 74.12 g/mol
Diclorometano	Fermont, México	PM= 84.93 g/mol
Metacrilato anhídrido	Sigma Aldrich, USA	94 % PM= 154.16 g/mol
Etanol	Emsure, Alemania	Pureza ≥ 99.9 %
Tubos Vacutainer	Becton Dickinson, Costa Rica	Tubos con EDTA (tubos morados)
PBS (Solución reguladora de Fosfatos)	Sigma Aldrich, USA	pH= 7.2
Tritón	Sigma Aldrich, USA	Grado laboratorio X-100
Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma Aldrich, USA	Estéril
Suero Fetal Bovino	Sigma Aldrich, USA	Estéril, adecuado para cultivo celular
Penicilina-Estreptomicina	Sigma Aldrich, USA	Solución estabilizada, con 10,000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL, bioreactivo, filtrado estéril, adecuado para cultivo celular
Resazurina (sal de sodio)	Sigma Aldrich, USA	Polvo, BioReagent, adecuado para cultivo celular
Solución de Tripsina-EDTA	Sigma Aldrich, USA	10x, BioReagent, filtrado estéril, adecuado para cultivo celular, 5.0 g de tripsina porcina y 2 g de EDTA • 4Na por litro de cloruro de sodio al 0.9%
Lámpara de luz UV	Fisher Scientific, USA	365 nm; lámpara UV modelo GL-25 UVP
Lector de placas	Awareness Technologinc, EE. UU.	0.0 a 4.0 unidades de absorbancia (A).
Lector de placas multimodo SpectraMax i3x	Molecular Devices, San José, California, EE. UU.	Multimodal

13. Metodología

13.1 Acrilación del polietilenglicol

Se obtuvo polietilenglicol diacrilado (PEGDA) a partir de 2.0 g de PEG, los cuales se colocaron en un tubo de vidrio de 145 x 20 mm; posteriormente se añadieron 0.35 mL de anhídrido metacrílico y se agitó el tubo con ayuda de un Vórtex por 30 segundos aproximadamente. A continuación, se colocó el tubo en un microondas por 2.5 minutos (cada 30 segundos, se sacó el tubo y se agitó por 30 segundos en un Vórtex), después se dejó enfriar el tubo completamente (aproximadamente 5 minutos). El tubo se volvió a colocar en el microondas, pero esta vez por 3.5 minutos (cada 30 segundos, se sacó el tubo y se agitó por 30 segundos en un Vórtex) y se dejó enfriar completamente. En seguida se añadieron 1.5 mL de cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y se agito en Vórtex hasta que el PEG se disolvió completamente.

Para precipitar el PEGDA, se añadieron 10 mL de éter etílico frío ($-10\text{ }^\circ\text{C}$) y se colocó el tubo en un baño de hielo. Después, se vació todo el contenido en un filtro cromatográfico que se colocó en un matraz Kitasato conectado a una manguera con vacío. Una vez obtenido el PEGDA, se colocó dentro de un desecador con vacío, en cajas de Petri de vidrio para completar la evaporación del solvente. Finalmente se calculó el rendimiento total por diferencia de peso.

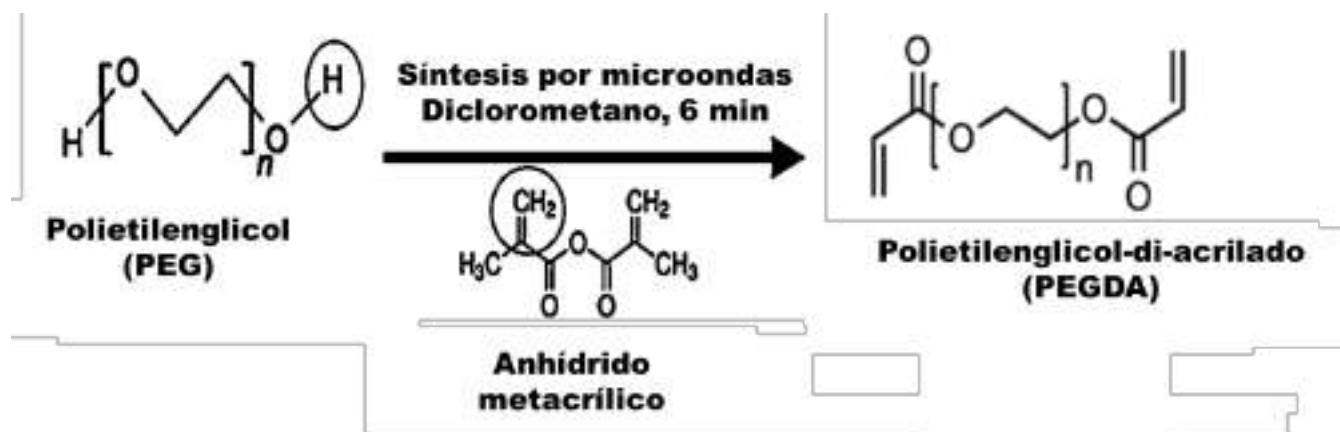


Figura 3. Reacción de acrilación del PEG.

13.2 Síntesis de la matriz polimérica de polietilenglicol (PEG)

Para la preparación de la matriz de PEG, el PEGDA obtenido en el punto anterior, se solubilizó en agua desionizada (10 % p/v). Luego, se añadió el fotoiniciador dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) en una proporción del 20 % p/v y se mezcló en un vial de vidrio a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). La solución final se colocó en una placa de 48 pocillos (200 μ L por pocillo) que se cerró y se colocó bajo luz UV durante 15 minutos para iniciar el proceso de polimerización. Las matrices poliméricas esterilizadas resultantes se lavaron con PBS estéril durante 3 días para eliminar cualquier residuo del proceso de síntesis, cambiando la solución todos los días y luego se almacenaron hasta su caracterización.

13.3 Síntesis de la matriz polimérica de PQ

La matriz de PQ se obtuvo mediante la mezcla de dos soluciones. La primera solución, contenía quitosano de bajo peso molecular (tabla 1) disuelto en 3 mL de ácido acético al 1 %. La segunda solución contenía 0.6 g de PEGDA disuelto en 3 mL de agua desionizada, adicionada con 0.12 g de AIBA.

Las dos soluciones se mezclaron y la solución resultante se colocó en un molde de PTFE de 40 mm x 30 mm x 3 mm. Este molde se colocó por 15 minutos en luz UV-Vis ($\lambda=365$ nm) para la fotopolimerización de la solución. Finalmente se cortaron los materiales en discos de 5 mm de diámetro y 3 mm de espesor.

Las proporciones de quitosano que se estudiaron en este trabajo se eligieron con base en su solubilidad en ácido acético al 1 % (v/v); una proporción mayor a 4 % (p/v) de quitosano se vuelve insoluble. Además, se tomó en cuenta que si se añade una cantidad menor a 0.05 % de quitosano, la actividad antibacteriana no es significativa.³³

Tabla 1. Cantidad de quitosano utilizada para cada matriz polimérica

Nomenclatura de los materiales	Quitosano (p/v)
PQ-4%	4 %
PQ-2%	2 %
PQ-1%	1 %
PQ-0.1%	0.1 %
PQ-0.05%	0.05 %

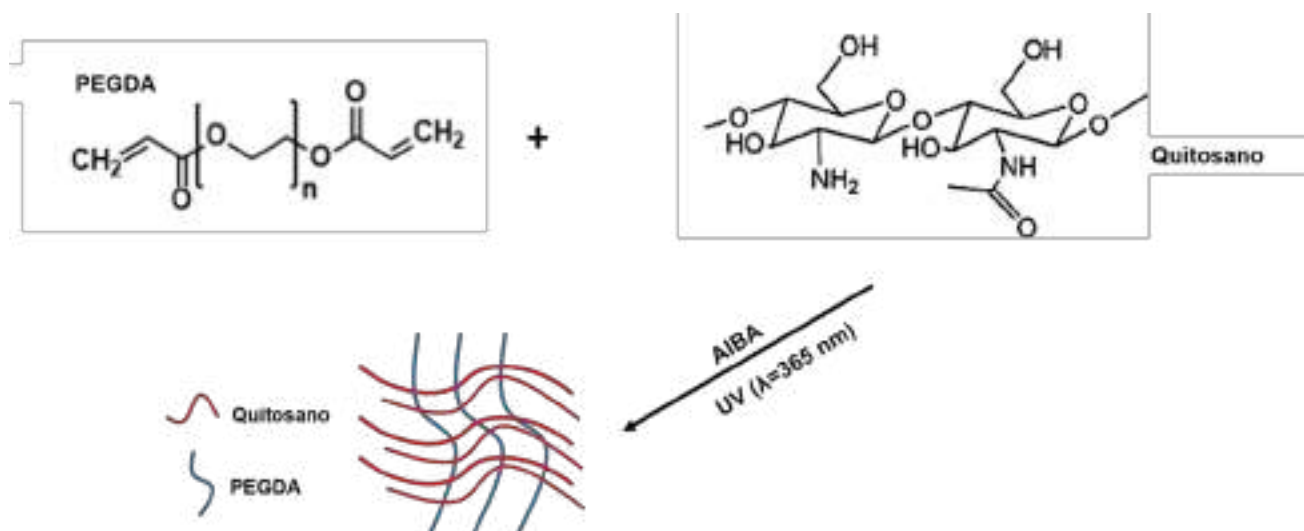


Figura 4. Síntesis de la matriz polimérica de PQ.

13.4 Tratamiento para mantener las matrices poliméricas libres de patógenos

Los discos de las matrices poliméricas se colocaron en alcohol etílico al 70 % a temperatura ambiente en tubos Falcón estériles de 20 mL por dos días, con un cambio de etanol en el segundo día. Al tercer día, se realizaron dos lavados en una solución reguladora de fosfatos (PBS) estéril, pH= 7.4, dejando un rango de 4 h para el segundo lavado. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar.

13.5 Caracterización fisicoquímica de la matriz polimérica de PQ

La matriz polimérica fue caracterizada a través de Espectrometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier (IR-FT), Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y cinética de hinchamiento.

13.5.1 Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros infrarrojos de los materiales se obtuvieron usando un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de la serie Cary 600 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El FT-IR de las muestras se estudió en un rango de 400–4000 cm^{-1} . Las matrices poliméricas se secaron completamente antes de comenzar el análisis FTIR.

13.5.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las matrices poliméricas se secaron completamente y se recubrieron con dos capas de oro. Posteriormente, las muestras recubiertas se unieron a un soporte de metal con una cinta conductora y se observaron en condiciones de alto vacío en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 250 FEG (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

13.5.3 Cinética de hinchamiento

La cinética de hinchamiento de los materiales se realizó en PBS (pH = 7,4) a 37 °C y en PBS a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) mediante el peso de cada muestra en una balanza analítica (Boeco, Alemania). Para este propósito, los materiales se secaron completamente y se pusieron en ambas soluciones. El peso de las muestras se midió a diferentes tiempos: 0.5, 1, 2, 3 y 4 horas y luego cada 24 h hasta alcanzar el equilibrio. El hinchamiento se calculó en porcentaje de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hinchamiento} = \frac{W_f - W_0}{W_0} \times 100$$

Donde W_t es el peso final y W_0 es el peso inicial de las muestras secas.

13.6 Caracterización biológica de la matriz polimérica de PQ

13.6.1 Evaluación de actividad antibacteriana por método turbidimétrico

13.6.1.1 Microorganismos de prueba

Se utilizaron las cepas de referencia *E. coli* ATCC25923 y *S. aureus* ATCC25922, proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química de la UAEMex. Estas cepas fueron sembradas en caldo Müeller Hinton e incubadas a 37°C por 24 h para posteriormente utilizarlas en el análisis correspondiente³⁴.

13.6.1.2 Preparación del inóculo

Se colocaron las bacterias (*E. coli* ATCC25922 o *S. aureus* ATCC 25923) de prueba en tubos con medio de cultivo agar Mueller Hinton (Bioxon, México), solidificado en posición inclinada y se incubaron por 24h a 35°C³⁴.

A partir de un tubo de cultivo reciente, se preparó la suspensión de prueba: 1.5×10^8 UFC/mL de las bacterias en solución salina estéril (0.9 %). Esta suspensión se puede conservar en refrigeración durante dos semanas³⁴.

13.6.1.3 Preparación de las muestras

Para cada bacteria utilizada, se colocaron cada una de las 6 diferentes condiciones en tubos de vidrio, además, para el control positivo se utilizó Amikacina 10 µg/mL para *E. coli*, y Fosfomicina 10 µg/mL para *S. aureus* (n=5).

Se utilizó la concentración de bacterias de 1.03×10^8 UFC/mL y se adicionaron 0.7 mL de esta en 100 mL de medio de cultivo No. 3 (Tabla 2). De esta suspensión, se colocaron 9.0 mL en todos los tubos preparados anteriormente. Para las muestras se colocó 1.0 mL de medio de cultivo No. 3 sin inocular y a los controles positivos se les agregó 1.0 mL de los antibióticos ya mencionados. En seguida se colocaron todos los tubos en baño de

agua con agitación continua a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Trascurrido el tiempo, se retiraron los tubos del baño y se adiciono 0.5 mL de una solución de formaldehído (1:3) a cada uno.

Se leyeron las absorbancias en un espectofotómetro a una longitud de onda de 492/630 nm. Además, se leyó la absorbancia del blanco, colocando medio de cultivo sin inocular con formaldehído. Finalmente se promediaron los valores obtenidos y se realizó la estadística. El control positivo identifica la inhibición del crecimiento microbiano.

Tabla 2. Constitución del medio de cultivo No. 3³⁴

Ingredientes	Gramo por litro
Peptona de carne	5.0
Extracto de levadura	1.5g
Extracto de carne	1.5g
Dextrosa	1.0
K₂HPO₄	3.68
KH₂PO₄	1.32
NaCl	3.5

13.6.2 Evaluación de la viabilidad celular directa

13.6.2.1 Propagación celular

Para esta prueba se utilizaron fibroblastos dérmicos humanos (FDH) (pase 4). Los FDH se monitorearon en cajas de cultivo T75, hasta tener una confluencia suficiente, para el ensayo. Una vez que se obtuvo el número de células necesarias, dentro de la campana de flujo laminar se desechó el medio en un vaso de precipitado, y se realizaron dos lavados con 3 mL de PBS (entre cada lavado se retiró el sobrenadante en un vaso de precipitado). Inmediatamente después se agregaron 3 mL de verseno (PBS + EDTA) en solución y 150 μ L de tripsina (1x). Se colocó la caja durante 5 min en la incubadora a una temperatura de 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 %, 85% de humedad y se sacó cuando las células estaban completamente despegadas de la caja. En el caso de que estas aún no se hayan despegado, colocar la caja unos minutos más en la incubadora, sin exceder los 10 min. Posteriormente, se colocaron 3 mL de DMEM suplementado en la caja T75 y se vació el contenido en un tubo Falcon estéril de 50 mL y se realizó una centrifugación a 1200 rpm por 5 min. Una vez centrifugado, se retiró el medio del tubo, dejando el pellet en el tubo. Después se agregaron 3 mL de medio DMEM suplementado y se re-suspendieron las células 20 veces con la ayuda de una pipeta estéril de 5 mL, evitando la formación de burbujas.

13.6.2.2 Conteo celular

Se colocaron 10 μ L de células del paso anterior en uno de los lados de una cámara de Neubauer.



Figura 5. Cámara de Neubauer

Posteriormente con ayuda de un microscopio invertido se realizó el conteo celular de cuatro cuadrantes.

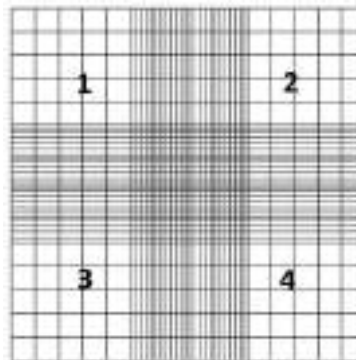


Figura 6. Cuadrantes de la cámara de Neubauer

Una vez obtenido el número total de células, se dividió entre cuatro (número de cuadrantes contabilizados), se multiplicó por 10,000 y luego por tres (el volumen en mililitros que se adiciono a las células).

Se realizaron los cálculos necesarios para un total de 12,000 células por cada pozo de una placa de cultivo de 24 pocillos.

13.6.2.3 Viabilidad celular

El efecto de la adición de diferentes proporciones de quitosano a las redes sobre la viabilidad celular se analizó utilizando un ensayo de viabilidad directo realizado con fibroblastos dérmicos humanos (HDF) a 1, 3 y 7 días. Las matrices poliméricas de PQ se prepararon en placas de 48 pocillos (12,000 células/pocillo en 120 μ L de medio DMEM; suplementado con 10 % de suero fetal bovino y penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en la superficie de cada muestra y se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ y 85 % de humedad durante 1 hora, para permitir que las células penetraran dentro de las redes poliméricas. Posteriormente, se agregaron 380 μ L de DMEM suplementado como se describió anteriormente, para tener todos los pocillos con un volumen final de 500 μ L. Las placas se incubaron según el tiempo establecido.

13.6.2.4 Ensayo con resazurina

Después de la incubación (1,3 y 7 días), el medio se retiró y se reemplazó por resazurina (1 % en medio DMEM) que se dejó durante cuatro horas a 37 °C, 5 % de CO₂ y 85 % de humedad. Transcurrido el tiempo, se recogió el producto obtenido (resorufina) y se midió la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de 545 nm_{ex}/590 nm_{em} con un lector de placas multimodo SpectraMax i3x.

13.6.3 Ensayo de hemólisis

Para realizar esta prueba, se utilizaron eritrocitos humanos. Todo el procedimiento se realizó bajo los criterios establecidos en ISO 10993-4 (2017) sobre la evaluación biológica de dispositivos médicos. Además, los donantes firmaron un consentimiento informado (anexo 18.3). La sangre de tres donantes adultos sanos diferentes (mayores de 18 años) se recogió en tubos de EDTA (n=3 repeticiones por donante). Posteriormente, los eritrocitos se aislaron del resto de la sangre y se diluyeron a una concentración final de 5% en PBS. Luego, cada gel se puso en 1 mL de esta solución en tubos Eppendorf. Tritón (Sigma Aldrich, EE.UU.) en una concentración de 2% y solución salina isotónica se utilizaron como controles positivo y negativo respectivamente. Todos los tubos se incubaron durante 1 hora a 37 ° C. Después de la incubación, se realizó una centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos. Las mediciones de absorbancia de cada muestra se obtuvieron con un lector de placas a 450/492 nm en el rango UV-VIS. El porcentaje de hemólisis se calculó con la siguiente fórmula:

$$Hemolisis (\%) = \frac{DO_{prueba} - DO_{negativo}}{DO_{positivo} - DO_{negativo}} \times 100$$

donde DO prueba pertenece a la densidad óptica de la muestra, DO negativo pertenece a la solución salina isotónica y la OD positivo pertenece a la solución de tritón.

13.6.4 Ensayo de hemoglobina libre

El ensayo de hemoglobina libre se realizó con sangre humana de un donante y siguiendo la norma ISO 10993-4 (2017). El donante firmó un consentimiento informado. Este ensayo se desarrolló para estudiar la hemocompatibilidad de las redes de PQ. Primero se prepararon las matrices poliméricas y se colocaron en placas de 24 pocillos (Sigma Aldrich, EE. UU.). Se colocó sangre citratada (50 μ L) en la superficie de cada muestra y se agregó un volumen de 10 μ L de CaCl_2 0.1 M (Sigma Aldrich, Oakville, Canadá) para inhibir el efecto anticoagulante del citrato. Después de 15, 30, 45 y 60 minutos, se añadió 1 mL de agua destilada a cada muestra. Posteriormente, la solución obtenida se colocó en una placa de 96 pocillos y se midió a 540 nm en un lector de placas multimodo SpectraMax i3x (Molecular Devices, San José, California, EE. UU.). Cuanto mayor es la absorbancia, mayor es la cantidad de hemoglobina libre, menor es la coagulación y la hemocompatibilidad es mayor.

14. Análisis estadístico

Para cada experimento se utilizaron cinco réplicas por cada condición. Solo en el ensayo de hemólisis se utilizaron tres replicas por donante (3 donantes). Los datos mostrados son medias $\pm$ desviación estándar (DE). La estadística de los resultados se realizó utilizando el método ANOVA no paramétrico con diferencia mínima significativa de Fisher (LSD). Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

15. Resultados y discusiones

15.1 Espectrometría de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectrometría FT-IR se realizó para obtener evidencia de los grupos funcionales característicos de PEG puro, PEGDA, y las matrices de PQ. El PEG puro (figura 7a) mostró un pico a 1108 cm^{-1} que se atribuye a la unión C-O-C. Otro pico a 2894 cm^{-1} pertenece al estiramiento-CH, una banda a 1463 cm^{-1} proviene del grupo de unión a CH y un pico a 962 cm^{-1} pertenece al grupo C-O-H. El PEGDA (fig. 7b) tiene las mismas bandas que el PEG puro, pero también un pico característico a 1724 cm^{-1} atribuido al grupo C=O como resultado de su acrilación.

El FT-IR del quitosano se muestra en la fig. 7c con bandas características a $2848\text{-}2915\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento-CH), $1656\text{-}1596\text{ cm}^{-1}$ (amida secundaria NHCO-) y $1078\text{-}1027\text{ cm}^{-1}$ (C-O elongado característico de su estructura de sacárido).³⁵

Se observaron bandas características de la matriz de PEG (fig. 7d). Aparecieron cinco picos: 1108 cm^{-1} de un grupo éter (COC), 1724 cm^{-1} de un ácido carboxílico (C=O) que proviene de la acrilación de PEG, 2890 cm^{-1} de CH-elongado, 1469 cm^{-1} de un CH-unido y a 962 cm^{-1} de un grupo alcohólico (COH). El espectro de las matrices de PQ también mostraron las mismas bandas.

El espectro infrarrojo de PQ-0.1 % (fig. 7f) comenzó a mostrar dos picos: 2844 cm^{-1} y 2919 cm^{-1} que son característicos del C-H elongado del quitosano. La intensidad de estos picos es mayor con el aumento de la cantidad de quitosano en las matrices, teniendo más intensidad en PQ-4 %. El C-H que se extiende en 2880 cm^{-1} de la red PEG, desaparece del espectro con la adición de quitosano. Además, las bandas a $1656\text{-}1596\text{ cm}^{-1}$ (amida secundaria NHCO-) del quitosano, aparecieron en todas las redes de PQ.

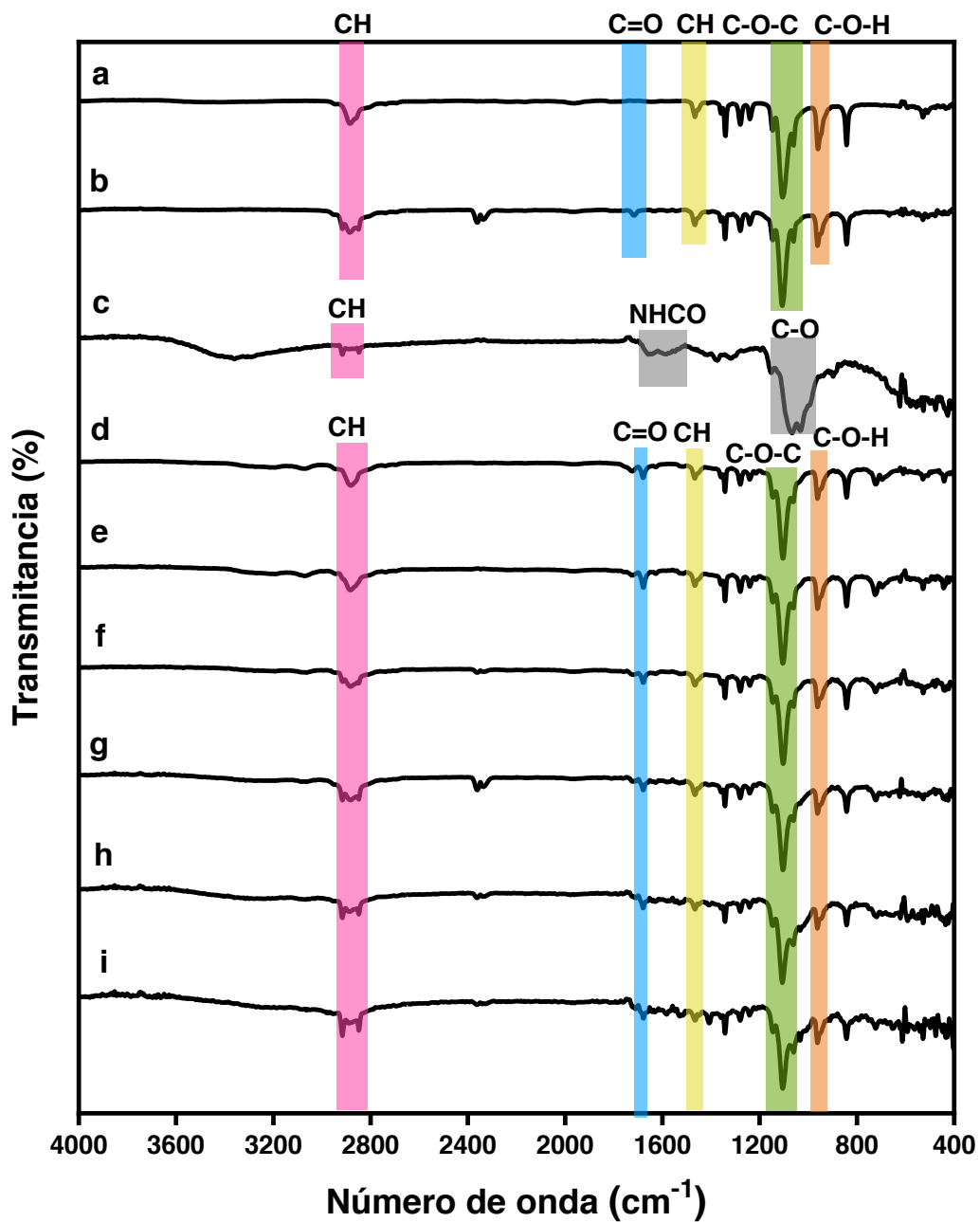


Figura 7. Espectrometría de FT-IR de (a) PEG, (b) PEGDA, (c) quitosano, (d) matriz de PEG, (e) PQ-0.05%, (f) PQ-0.1%, (g) PQ-1%, (h) PQ-2% (i) PQ-4%.

Las bandas observadas en el FT-IR de las matrices de PEG, quitosano y PQ (fig. 8) son similares a los FT-IR reportados en la literatura.^{35,24,36,37} La aparición de un nuevo material y del entrecruzamiento entre PEG y quitosano se demostró con la aparición de bandas de ambos polímeros. La matriz de PEG mostró bandas en 1108 cm^{-1} del grupo éter y en 1724 cm^{-1} del ácido carboxílico de la acrilación de PEG. Las matrices de PQ mostraron las mismas bandas en 2844 cm^{-1} , 2919 cm^{-1} (CH-elongado) y en $1656\text{-}1596\text{ cm}^{-1}$ (amida secundaria NHCO-) que demuestran la presencia de quitosano en estas. Las bandas correspondientes al grupo CH-elongado del quitosano mostraron más intensidad en PQ-4 %, lo que demuestra una mayor cantidad de quitosano en esta matriz.

15.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para observar la estructura microscópica de los hidrogeles, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM). La morfología de las superficies de las redes de PQ se realizó para analizar sus características topográficas y su porosidad (fig. 9). Se encontraron poros cilíndricos de diferentes tamaños en todos los materiales poliméricos. Las micrografías de la matriz de PEG (Fig. 9a y 9b) muestran múltiples poros cilíndricos con diferentes tamaños ($50\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$). PQ-4 % (Fig. 9k y 9l) mostró poros interconectados más pequeños y una superficie más irregular que la matriz de PEG. La combinación de PEG y quitosano creó superficies irregulares con menor cantidad de poros. El aumento en la cantidad de quitosano aumenta la irregularidad de la superficie.

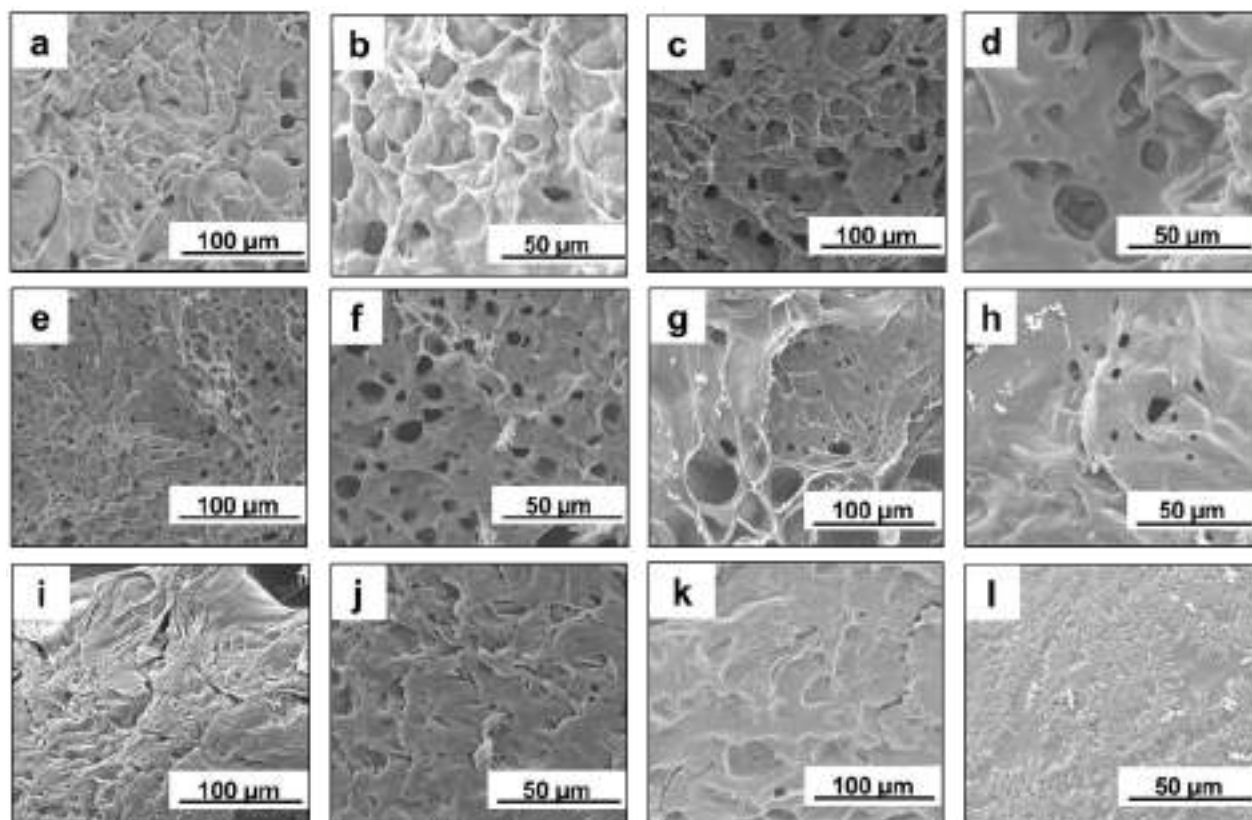


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de: PEG (a, b), PQ-0.05% (c, d), PQ-0.1% (e, f), PQ-1% (g, h), PQ-2% (i, j) y PQ-4% (k, l).

La importancia del análisis SEM radica en su capacidad para proporcionar imágenes de alta resolución útiles para la evaluación de la superficie de diversos materiales.³⁸ Las superficies de las redes poliméricas mostraron poros de diferente tamaño (50-100 μm), observándose poros más pequeños en PQ-4% (fig. 9k y 9l). A mayor cantidad de quitosano, mayor es el entrecruzamiento y por lo tanto los poros son más pequeños. Los enlaces cruzados entre PEG y quitosano compactan la red, lo que resulta en una reducción del tamaño de poro al aumentar la cantidad de enlaces cruzados.³⁹ La presencia de poros en las matrices también fue observada por Gaitán-Tolosa et.al.²⁴ que sintetizaron redes semi-interpenetradas de PQ y encontraron poros de diferente tamaño.

15.3 Cinética de hinchamiento

La cinética de hinchamiento de las matrices poliméricas se estudió en PBS a 37 °C y a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). En PBS a 37 °C (fig. 10) el porcentaje de hinchamiento de todas las redes fue mayor que a temperatura ambiente (fig. 11). En PBS a 37 °C y a temperatura ambiente, la matriz de PQ-4% exhibió la capacidad de hinchamiento más baja ($315.14 \% \pm 32.61 \%$ a 37 °C; $262.4 \% \pm 52.54 \%$) a temperatura ambiente. La matriz de PEG mostró el mayor porcentaje de hinchamiento en PBS a 37 °C ($1120 \% \pm 306.27 \%$) y a temperatura ambiente ($614.16 \% \pm 57.85 \%$). El porcentaje de hinchamiento parece disminuir con el aumento de la cantidad de quitosano. En PBS a 37 °C solo se encontraron diferencias no significativas entre PQ-1% y PQ-2 (ANOVA de dos vías, $p > 0.05$). En PBS a temperatura ambiente, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre: PEG y PQ-0.05%, PQ-1% y PQ-2%, PQ-1% y PQ-4%, PQ-2% y PQ-4% (ANOVA de dos vías, $p > 0.05$).

El tiempo en que las matrices de PEG, PQ-0.05% y PQ-0.1% alcanzaron el hinchamiento máximo en PBS a 37 °C fue aproximadamente a las 24 h. Las muestras con mayor porcentaje de quitosano alcanzaron el hinchamiento máximo en menor tiempo. Por ejemplo, mientras que PQ-1% y PQ-2% alcanzaron el hinchamiento máximo en 4 h, PQ-4% absorbió la mayor cantidad de PBS en 2 h. En PBS a temperatura ambiente, los hidrogeles de PEG, PQ-0.05% y PQ-0.1% tuvieron el mayor hinchamiento a las 24 h, mientras que PQ-1%, PQ-2% y PQ-4% alcanzaron el hinchamiento máximo a las 2 horas.

Se realizó el hinchamiento en solución reguladora de fosfatos (PBS), debido a que este provee condiciones similares a las del líquido extracelular de los mamíferos, tiene un pH de 7.4, es isotónico y no tóxico para las células⁴⁰.

Tabla 3. Medias y desviación estándar del % de hinchamiento en PBS a 37°C

% DE HINCHAMIENTO EN PBS A 37 °C						
Tiempo (horas)	PEG	PQ-0.05%	PQ-0.1%	PQ-1%	PQ-2%	PQ-4%
0.5	1080.00 ± 239.04	873.33 ± 234.99	480.00 ± 41.08	441.97 ± 37.01	427.88 ± 40.46	315.15 ± 32.62
1	1116.67 ± 274.37	873.33 ± 194.94	526.67 ± 77.15	463.25 ± 29.51	443.75 ± 53.43	346.05 ± 35.12
2	1116.67 ± 274.37	873.33 ± 208.70	527.50 ± 72.02	474.69 ± 14.42	456.61 ± 59.65	351.61 ± 38.29
3	1090.00 ± 301.75	873.33 ± 229.25	535.00 ± 65.19	467.95 ± 45.36	433.08 ± 61.63	353.41 ± 42.68
4	1090.00 ± 301.75	873.33 ± 257.01	540.00 ± 65.19	476.19 ± 47.36	437.11 ± 59.76	358.17 ± 42.46
24	1096.67 ± 294.01	873.33 ± 274.27	570.83 ± 56.21	473.71 ± 63.48	443.50 ± 56.64	364.98 ± 44.32
48	1120.00 ± 306.28	873.33 ± 301.75	575.00 ± 55.90	456.64 ± 61.62	433.28 ± 55.14	371.80 ± 47.29
72	1080.00 ± 298.70	873.33 ± 300.92	560.00 ± 51.84	437.70 ± 47.54	433.28 ± 55.14	367.49 ± 51.59

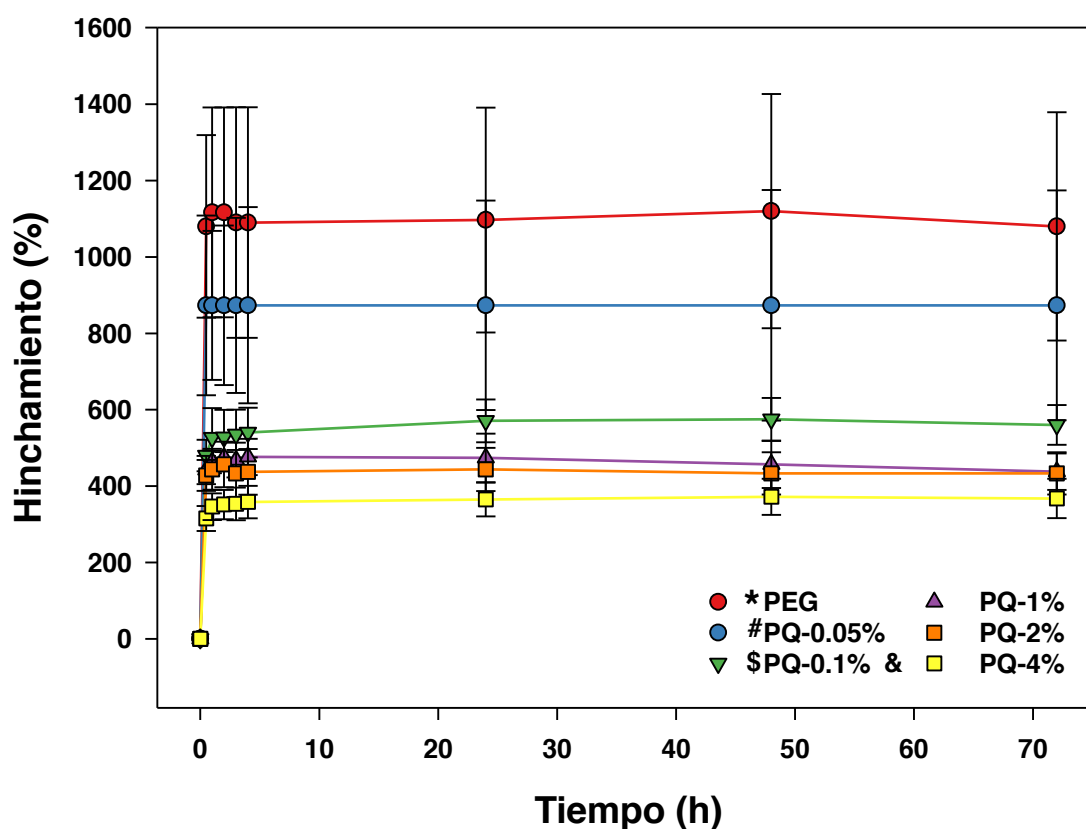


Figura 9. Representación gráfica del % de hinchamiento en PBS a 37°C (n=5). El gráfico muestra el porcentaje medio de hinchamiento de todas las muestras ± DE.

*p<0.05 vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; #p<0.05 vs PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; \$p<0.05 vs PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; &p<0.05 vs PQ-1% y PQ-2% (ANOVA de dos vías).

Tabla 4. Medias y desviación estándar del % de hinchamiento en PBS a temperatura ambiente

% DE HINCHAMIENTO EN PBS A TEMPERATURA AMBIENTE						
Tiempo (horas)	PEG	PQ-0.05%	PQ-0.1%	PQ-1%	PQ-2%	PQ-4%
0.5	515.71 ± 14.41	525.33 ± 45.94	344.28 ± 24.91	297.5 ± 23.31	291.66 ± 29.52	262.24 ± 52.54
1	549.52 ± 37.61	590.47 ± 52.42	360.71 ± 42.31	300 ± 20.84	306.41 ± 21.56	299.49 ± 56.68
2	557.73 ± 50.01	607.14 ± 55.78	360.71 ± 42.31	300 ± 20.84	310.73 ± 25.90	299.49 ± 56.68
3	565.59 ± 53.20	607.14 ± 55.78	368.57 ± 48.479	300 ± 20.84	310.73 ± 25.90	299.49 ± 56.68
4	570.95 ± 59.32	598.57 ± 62.75	373.57 ± 50.54	300 ± 20.84	310.73 ± 25.90	299.49 ± 56.68
24	658.33 ± 27.63	618.85 ± 49.09	381.07 ± 45.62	300 ± 20.84	310.73 ± 25.90	299.49 ± 56.68
48	598.33 ± 67.03	596.38 ± 26.23	386.42 ± 51.91	277.5 ± 18.54	297.24 ± 17.24	293.51 ± 49.74
72	614.16 ± 57.85	588.19 ± 31.09	373.92 ± 51.59	280 ± 22.70	292.92 ± 11.97	281.81 ± 55.05

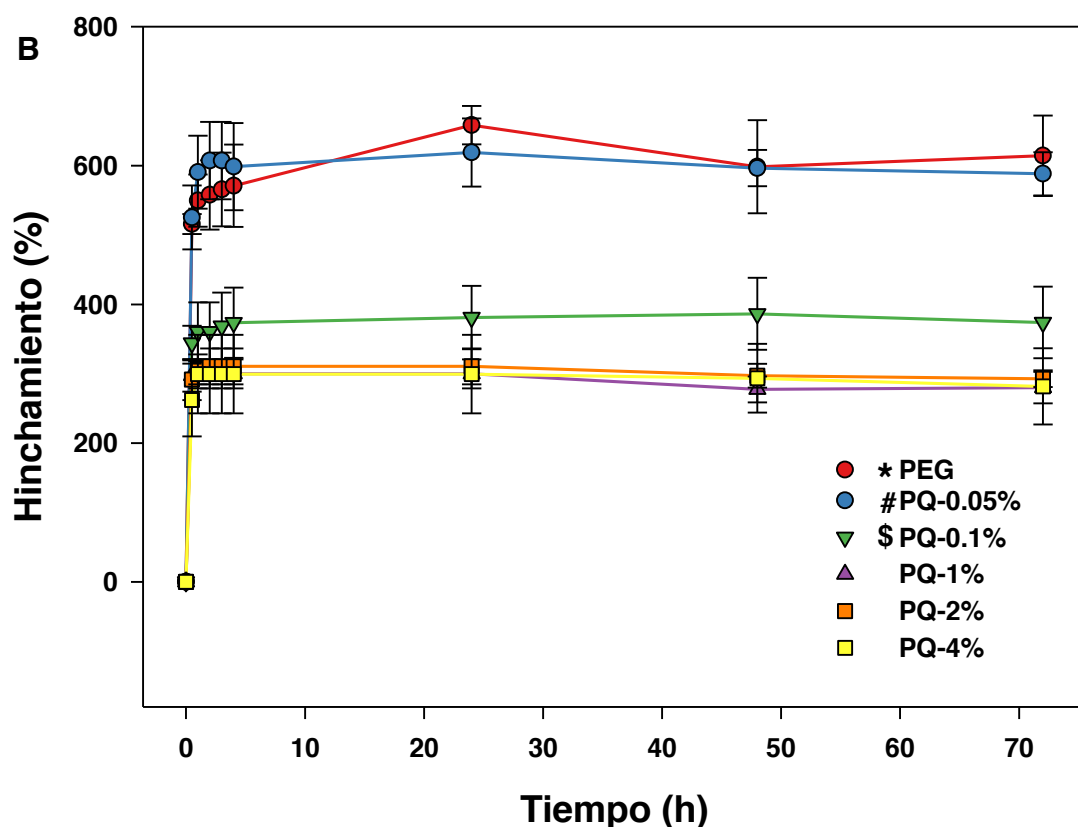


Figura 10. Representación gráfica del % de hinchamiento en PBS a temperatura ambiente (n=5). El gráfico muestra el porcentaje medio de hinchamiento de todas las muestras ± DE. *p<0.05 vs PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; #p<0.05 vs PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; \$p<0.05 vs PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%.

El tiempo de hinchamiento en PBS a 37 ° C y a temperatura ambiente de las matrices poliméricas fue diferente; la matriz de PEG, PQ-0.05% y PQ-0.1% alcanzaron el hinchamiento máximo en aproximadamente 24 h. Sin embargo, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4% tuvieron el hinchamiento máximo en PBS a ambas temperaturas en 2 horas. Este comportamiento puede deberse al tamaño y número de poros que se determina mediante el entrecruzamiento entre PEG y quitosano.²⁴ En ambas soluciones, PQ-4% exhibió la capacidad de hinchamiento más baja (315.15 % $\pm$ 32.62 % a 37 ° C; 262.24 % $\pm$ 52.54 % a temperatura ambiente). La matriz de PEG mostró el mayor porcentaje de hinchamiento (1120 % $\pm$ 306.28 % a 37 ° C; 658.33 % $\pm$ 27.63 % a temperatura ambiente). Esto se debe a que cuanto mayor es la cantidad de quitosano, mayor es el entrecruzamiento con el PEG. A mayor entrecruzamiento, menor es la movilidad de la estructura interpenetrada de los hidrogeles, por lo tanto, la absorción del disolvente es menor. Sautrot *et al.*⁴¹ sintetizaron matrices de PEG basadas en quitosano y descubrieron que cuando disminuye la cantidad de PEG, la densidad de entrecruzamiento es menor y, por lo tanto, la capacidad de hinchamiento es mayor.

Además, el hinchamiento resultante mayor en PBS a 37°C, concuerda con los resultados obtenidos por Karimi *et. al.*⁴² que prepararon hidrogeles de quitosano sensibles al pH y a la termorresistencia e investigaron el comportamiento de hinchamiento de estos a diferentes temperaturas. Descubrieron que el aumento de la temperatura aumenta el hinchamiento de los hidrogeles debido a un aumento de su capacidad de adsorción y un aumento en la velocidad de difusión de la solución.

15.4 Evaluación de la actividad antibacteriana

Uno de los problemas importantes de las heridas crónicas es la formación de biopelículas que se definen como una comunidad estructurada de células microbianas capaces de adherirse a superficies naturales o artificiales.^{43,44} Las biopelículas se caracterizan por su resistencia a los agentes antimicrobianos y desinfectantes.^{44,45} Una biopelícula no solo consiste en 1 bacteria sino también de hongos y virus.

En este trabajo, se evaluó la acción antibacteriana del quitosano dentro de las redes de PQ contra *S. aureus* ATCC25922 y *E. coli* ATCC25923, que son microorganismos de prueba causantes de infección en heridas crónicas.^{46,47}

La actividad antibacteriana se realizó tomando como base para el diseño de la prueba el MGA 0100 (Evaluación microbiológica de antibióticos) de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos³⁴.

La actividad antibacteriana de las matrices poliméricas contra *S. aureus* se muestra en la fig. 13. PQ-2% (0.020 ± 0.005) pudo disminuir significativamente el crecimiento de *S. aureus* en el medio, en comparación con el control positivo (0.032 ± 0.001 ; $p < 0.05$ vs PQ-1% y PQ-2%). PQ-1% (0.29 ± 0.005) tuvo una actividad similar contra *S. aureus* que el control positivo (0.032 ± 0.001 ; $p > 0.05$ vs PQ-1%). La matriz de PEG (0.087 ± 0.009), PQ-0.05% (0.078 ± 0.002) y PQ-0.1% (0.078 ± 0.004) no pudieron disminuir significativamente la cantidad de *S. aureus* en el medio en comparación con el control positivo (0.032 ± 0.001 ; $p < 0.05$ vs matriz de PEG, PQ-0.05% y PQ-0.1%). No se encontraron diferencias significativas entre el control positivo (0.032 ± 0.001) y PQ-4% (0.033 ± 0.001 ; $p < 0.05$ vs C +).

La actividad antibacteriana de las matrices poliméricas contra *E. coli* se muestra en la tabla 5. Ningún material mostró una disminución significativa en el crecimiento de *E. coli* en comparación con el control positivo (fig. 14). Sin embargo, el C+ (0.073 ± 0.016) tampoco disminuyó significativamente el crecimiento bacteriano, en comparación con el C+ utilizado contra *S. aureus* (0.032 ± 0.001 ; $p < 0.05$ vs C+ *E.coli*). Este efecto nulo de actividad antibacteriana de las matrices poliméricas de PQ puede atribuirse a la resistencia desarrollada por *E. coli*, ya que no solo hubo nula actividad antibacteriana de las matrices,

sino también del antibiótico utilizado como C+. La resistencia a los antibióticos es un problema importante y oportuno de la medicina contemporánea. La rápida evolución de las bacterias resistentes requiere nuevas medidas preventivas. ⁴⁸

Tabla 5. Medias y desviación estándar de la absorbancia medida para cada bacteria (*E. coli* y *S. aureus*)

Muestras	Absorbancias	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
PEG	0.082 ± 0.001	0.087 ± 0.009
PQ-0.05	0.079 ± 0.002	0.078 ± 0.002
PQ-0.1%	0.086 ± 0.007	0.078 ± 0.004
PQ-1%	0.083 ± 0.006	0.029 ± 0.005
PQ-2%	0.091 ± 0.007	0.02 ± 0.005
PQ-4%	0.086 ± 0.008	0.033 ± 0.001
C+	0.073 ± 0.01	0.032 ± 0.001

C+: *E.coli*: Amikacina 10µg/mL; *S.aureus*: Fosfomicina 10µg/mL.

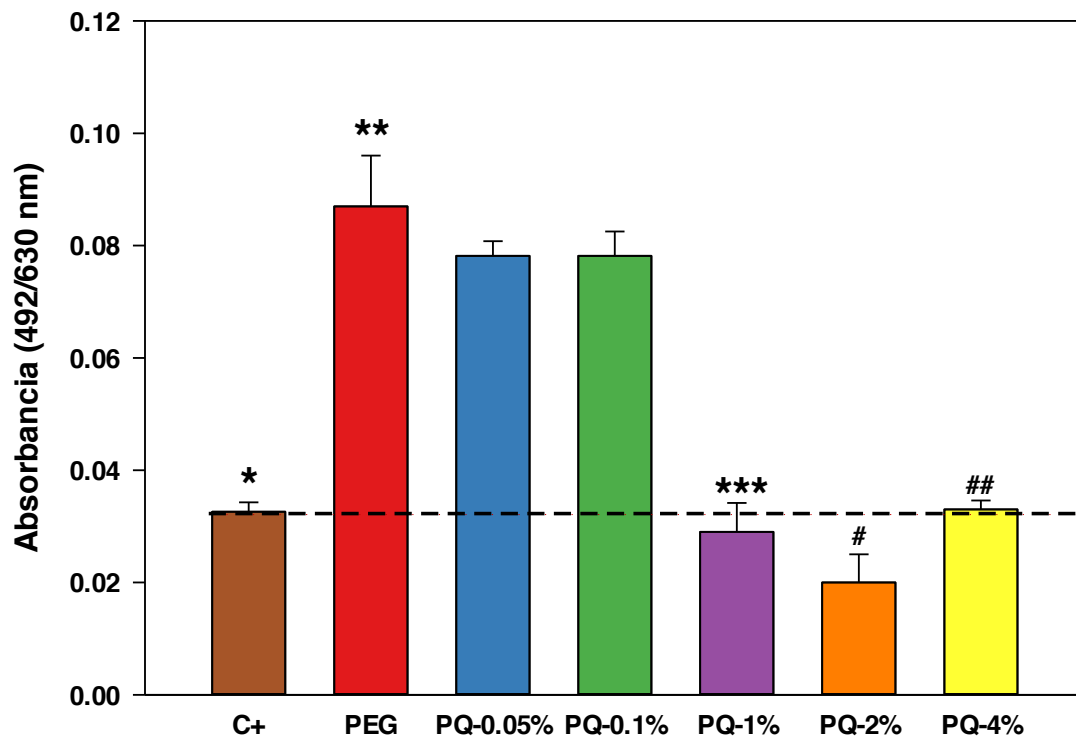


Figura 11. Representación gráfica de la actividad antibacterial contra *S. aureus* ATCC25922 (n=5). La gráfica muestra la media de la absorbancia de todas las muestras $\pm$ DE. * $p < 0.05$ vs matriz de PEG, PQ-0.05%, PQ-0.1% y PQ-2%; ** $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; *** $p < 0.05$ vs PQ-0.05% y PQ-0.1%; # $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1% y PQ-4%; ## $p < 0.05$ vs PQ-0.05% y PQ-0.1% (ANOVA de una vía).

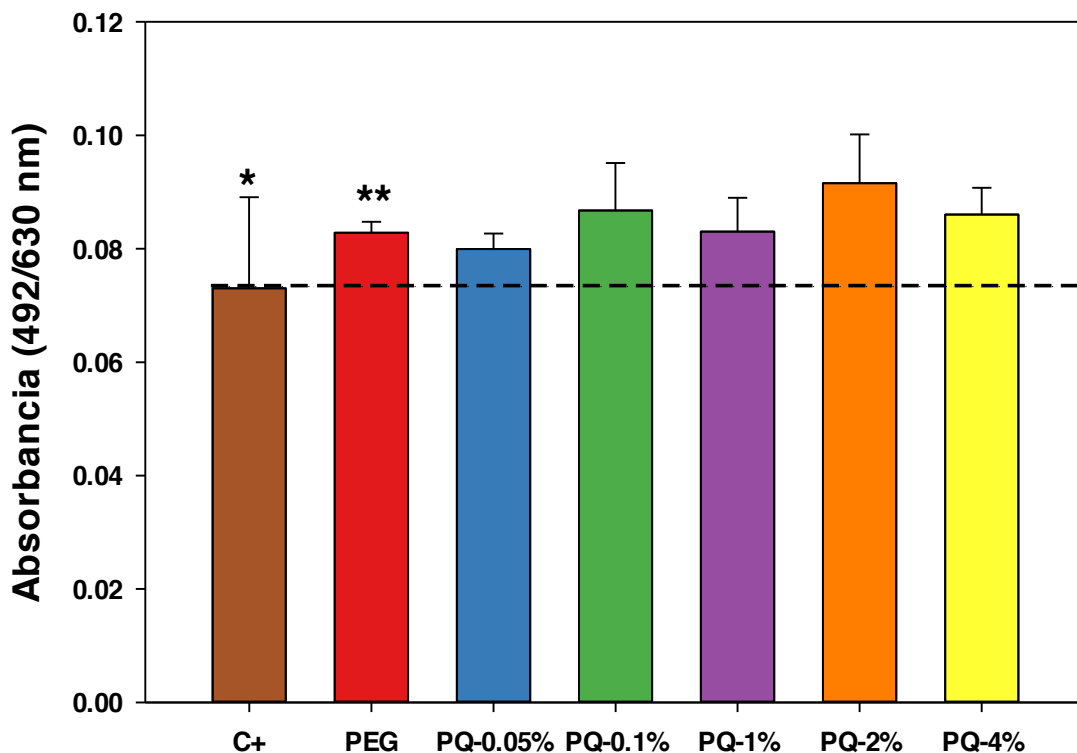


Figura 12. Representación gráfica de la actividad antibacterial contra *E. coli* ATCC25923 (n=5). La gráfica muestra la media de la absorbancia de todas las muestras $\pm$ DE. * $p < 0.05$ vs PQ-0.1%, PQ-2% y PQ-4%; ** $p < 0.05$ vs PQ-2% (ANOVA una vía).

De acuerdo con Kong, *et al.* ⁴⁹ hay algunos factores que pueden afectar la actividad antimicrobiana del quitosano: factores intrínsecos del quitosano como peso molecular, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante; microorganismo: especie y etapa de desarrollo; estado físico del quitosano: líquido (coloide) o sólido (membrana); Factores ambientales: pH, temperatura y tiempo.

El efecto antibacteriano contra *S. aureus* del quitosano que se mostró en este trabajo está acorde con Sónia P. Miguel *et al.* ⁵⁰, quienes produjeron hidrogeles de quitosano-agarosa y variaron la cantidad de quitosano. Evaluaron las propiedades antibacterianas de los hidrogeles mediante el método estándar de dilución en tubo utilizando *S. aureus* y observaron actividad bactericida de los hidrogeles que contenían más de 188 $\mu\text{g/mL}$ de

quitosano. Otro estudio de Sautrot-Ba *et al.* ⁴¹ confirmó la propiedad antibacteriana del quitosano. Sintetizaron hidrogeles de poli (etileno) glicol (PEG) a base de quitosano bajo irradiación ligera en medio acuoso. Evaluaron la actividad antibacteriana de los hidrogeles contra *S. aureus*. Los hidrogeles de quitosano-PEG resultantes demostraron una tremenda inhibición (100 %) del crecimiento bacteriano.

El efecto antibacteriano del quitosano es debido a su carga positiva (NH_3^+) cuando se solubiliza en medios ácidos (es decir, ácido acético). Esta carga interactúa con las cargas negativas que poseen las bacterias Gram negativas (grupos fosfato y carboxilo) y Gram positivas (ácido lipoteicoico y pectidoglicanos) en sus membranas externas. Esta interacción crea una desestabilización en la pared bacteriana que causa su ruptura y, en consecuencia, la muerte de la bacteria. ⁵¹

15.5 Viabilidad celular directa

El ensayo de viabilidad directa se realizó en fibroblastos dérmicos humanos (FDH) directamente sembrados en las diferentes matrices de PQ para evaluar el efecto del quitosano en la viabilidad de los FDH. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la viabilidad celular. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 6.

Después de 1 día de incubación, los FDH sembrados en PQ-1% ($3.30\text{E}^7 \pm 2.46\text{E}^7$) mostró una viabilidad significativamente mayor en comparación con la matriz de PEG ($3.06\text{E}^7 \pm 1.92\text{E}^7$ $p < 0.05$ vs PQ-1%). Sin embargo, se observó una disminución significativa de la viabilidad con PQ-4% ($3.00\text{E}^7 \pm 2.69\text{E}^7$). Después de 3 días de incubación, PQ-0.1% ($3.41\text{E}^7 \pm 2.64\text{E}^7$), PQ-1% ($3.48\text{E}^7 \pm 2.46\text{E}^7$) y PQ-4% ($3.47\text{E}^7 \pm 2.46\text{E}^7$) mostraron una viabilidad significativamente mayor en comparación con la matriz de PEG ($3.06\text{E}^7 \pm 1.92\text{E}^7$ $p < 0.05$ vs PQ-0.1%, PQ-1% y PQ-4%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la matriz de PEG y PQ-0.05%. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre PQ-0.1% ($3.41\text{E}^7 \pm 2.64\text{E}^7$), PQ-1% ($3.48\text{E}^7 \pm 2.46\text{E}^7$) y PQ-2% ($3.47\text{E}^7 \pm 2.46\text{E}^7$), en comparación con PQ-4% ($3.07\text{E}^7 \pm 2.69\text{E}^7$ $p < 0.05$ vs PQ-0.1%, PQ-1% y PQ-2%). Después de 7 días de incubación, PQ-0.05% ($3.27\text{E}^7 \pm 1.60\text{E}^7$) y PQ-0.1% ($3.31\text{E}^7 \pm 1.18\text{E}^7$) tuvieron una viabilidad significativamente mayor en comparación con la matriz de PEG ($3.01\text{E}^7 \pm 1.32\text{E}^7$ $p < 0.05$ vs PQ- 0.05% y PQ-0.1%). Por otro lado, PQ-0.05% ($3.27\text{E}^7 \pm 1.60\text{E}^7$) y PQ-0.1% ($3.31\text{E}^7 \pm 1.18\text{E}^7$)

mostraron una viabilidad mayor en comparación con PQ-1% ($2.90E^7 \pm 1.81E^7$), PQ-2% ($2.96E^7 \pm 1.67E^7$) y PQ-4% ($2.83E^7 \pm 1.73E^7$) (fig. 12).

Tabla 6. Medias y desviación estándar de la intensidad fluorescente

Matriz polimérica	Tiempo de viabilidad celular		
	Día 1	Día 3	Día 7
PEG	$3.07E^7 \pm 1.92E^6$	$3.21E^7 \pm 1.92E^6$	$3.01E^7 \pm 1.33E^6$
PC-0.05%	$3.21E^7 \pm 2.58E^6$	$3.20E^7 \pm 2.58E^6$	$3.28E^7 \pm 1.61E^6$
PC-0.1%	$3.27E^7 \pm 2.65E^6$	$3.42E^7 \pm 2.65E^6$	$3.32E^7 \pm 1.18E^6$
PC-1%	$3.30E^7 \pm 2.47E^6$	$3.49E^7 \pm 2.47E^6$	$2.91E^7 \pm 1.82E^6$
PC-2%	$3.17E^7 \pm 2.46E^6$	$3.48E^7 \pm 2.46E^6$	$2.96E^7 \pm 1.67E^6$
PC-4%	$3.00E^7 \pm 2.69E^6$	$3.07E^7 \pm 2.69E^6$	$2.83E^7 \pm 1.73E^6$

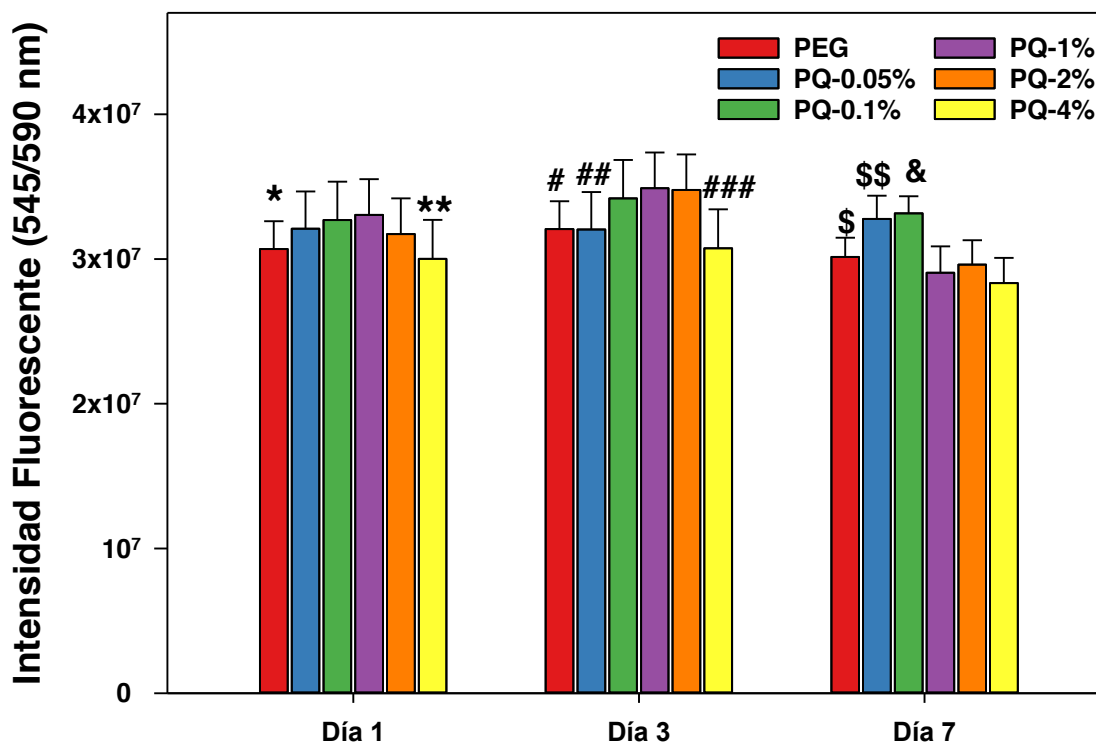


Figura 13. Representación gráfica del ensayo de viabilidad celular directa en FDH.

El gráfico muestra la intensidad fluorescente media $\pm$ DE de cada muestra.

* $p < 0.05$ vs PQ-1%; ** $p < 0.05$ vs PQ-0.1% y PQ-1%; # $p < 0.05$ vs PQ-0.1%, PQ-1% y PQ-2%; ## $p < 0.05$ vs PQ-0.1%, PQ-1% y PQ-2%; ### $p < 0.05$ vs PQ-0.1%, PQ-1% y PQ-2%; \$ $p < 0.05$ vs PQ-0.05% y PQ-0.1%; \$\$ $p < 0.05$ vs PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; \$\$\$ $p < 0.05$ vs PQ-1%, PQ-2% y PQ-4% (ANOVA dos vías).

Los resultados de esta prueba demuestran que no existe una relación directa entre la cantidad de quitosano y la viabilidad celular, ya que no se observó mayor viabilidad a mayor cantidad de quitosano añadida. Estos resultados están acordes con Hamilton *et al.*⁵² quienes correlacionaron las respuestas de fibroblastos con las características conocidas del material de quitosano y demostraron que el quitosano no tenía ningún efecto sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos.

15.6 Ensayo de hemólisis

De acuerdo con la ISO 10993-4 (2017), para que un dispositivo médico sea considerado como hemocompatible, debe de producir un porcentaje de hemólisis menor al 5 %.

Se midió y analizó la absorbancia de la hemoglobina liberada de los eritrocitos hemolizados por el contacto directo de las matrices con los eritrocitos humanos (tabla 7). No se encontraron diferencias significativas entre la hemólisis producida por las matrices poliméricas entre los donadores. Todos los materiales produjeron menos del 5 % de hemólisis, lo que significa que no son hemolíticos, por lo tanto, son biocompatibles.

Tabla 7. Medias y desviación estándar del % de hemólisis (n=3 por donador)

Hidrogeles	% Hemólisis		
	Donador 1	Donador 2	Donador 3
PEG	0.384 ± 0.094	0.492 ± 0.163	0.328 ± 0.001
PQ-0.05%	0.384 ± 0.095	0.493 ± 0.164	0.383 ± 0.094
PQ-0.1%	0.274 ± 0.095	0.328 ± 0.001	0.328 ± 0.164
PQ-1%	0.438 ± 0.095	0.547 ± 0.094	0.328 ± 0.164
PQ-2%	0.384 ± 0.095	0.547 ± 0.189	0.438 ± 0.094
PQ-4%	0.329 ± 0.164	0.328 ± 0.001	0.273 ± 0.189

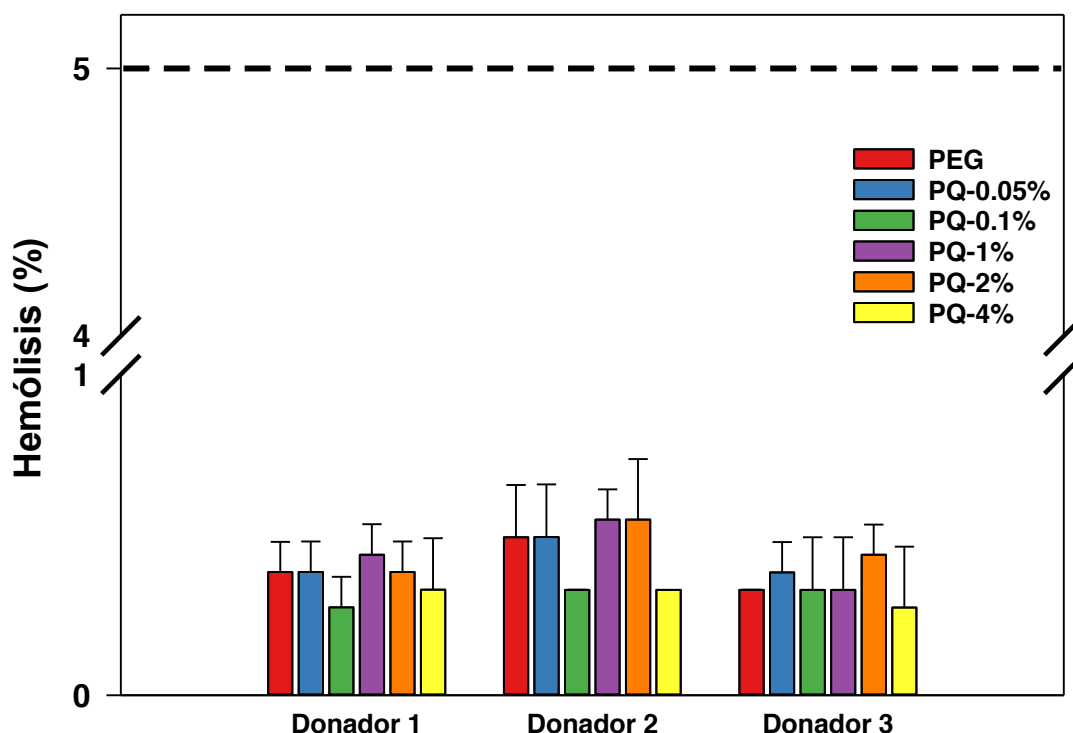


Figura 14. Representación gráfica del % de hemólisis en eritrocitos humanos (n=3 por donador).

Este ensayo se realizó como un requisito de la norma ISO-10993-4 (2017) para materiales destinados a estar en contacto con sangre humana. Los resultados de este trabajo mostraron que todas las redes produjeron menos del 1 % de hemólisis en todos los donadores, por lo tanto, son altamente compatibles. La cantidad de quitosano no afectó la hemocompatibilidad de las matrices. Estos resultados son similares a los obtenidos por Escudero-Castellanos *et al.* ⁶ quienes sintetizaron redes de PEG, PQ y PEG de múltiples brazos e informaron que todos los materiales probados produjeron un porcentaje de hemólisis inferior al 5 %.

15.7 Ensayo de hemoglobina libre

La hemocompatibilidad de las matrices de PQ se probó usando una prueba de hemoglobina libre. Cuanto mayor es la absorbancia, mayor es la cantidad de hemoglobina libre, menor es la coagulación y la hemocompatibilidad es mayor. Después de 15 minutos de incubación, se obtuvo un mayor valor de hemoglobina libre (por lo tanto, una mayor hemocompatibilidad) con PQ-2% (0.98 ± 0.08) en comparación con PEG (0.70 ± 0.09 ; $p < 0.05$ vs PQ-2%). Sin embargo, con PQ-0.05% (0.25 ± 0.07) el valor de la hemoglobina libre fue menor en comparación con la PEG ($p < 0.05$ vs PQ-0.05%). Se observó un comportamiento diferente después de 30 minutos de incubación: PQ-2% (0.50 ± 0.14) y PEG (0.45 ± 0.15 ; $p > 0.05$ vs PQ-2%) tuvieron una hemoglobina libre similar, por lo tanto, una hemocompatibilidad similar. PQ-1% (0.19 ± 0.04) tuvo una hemoglobina libre más baja en comparación con PEG (0.45 ± 0.15 ; $p < 0.05$ vs PQ-1%) y PQ-2% (0.50 ± 0.14 ; $p < 0.05$ vs PQ-1 %). Después de 45 minutos de incubación, la matriz de PEG fue más hemocompatible que los otros materiales al tener mayor hemoglobina libre (0.44 ± 0.12 ; $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%). PQ-0.05% (0.18 ± 0.05) y PQ-1% (0.18 ± 0.05) disminuyeron la hemoglobina libre en comparación con la matriz de PEG. Nuevamente, después de 60 minutos de incubación, la matriz de PEG tuvo una mayor hemoglobina libre que las otras matrices (0.45 ± 0.14 ; $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4 %). PQ-0.1% (0.17 ± 0.04) y PQ-2% (0.17 ± 0.07) tuvieron una hemoglobina y hemocompatibilidad más bajas en comparación con la matriz de PEG (0.45 ± 0.14 ; $p < 0.05$ vs PQ-0.1% y PQ-1%).

Tabla 8. Medias y desviación estándar de la hemoglobina libre relativa (n=5)

Matriz polimérica	Tiempo (min)				
	0	15	30	45	60
PEG	1.00 $\pm$ 0.003	0.70 $\pm$ 0.09	0.45 $\pm$ 0.15	0.44 $\pm$ 0.12	0.45 $\pm$ 0.14
PQ-0.05%		0.25 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.07	0.18 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.02
PQ-0.1%		0.42 $\pm$ 0.10	0.26 $\pm$ 0.10	0.20 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.04
PQ-1%		0.55 $\pm$ 0.16	0.19 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.07
PQ-2%		0.98 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.14	0.27 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.03
PQ-4%		0.86 $\pm$ 0.14	0.38 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.04

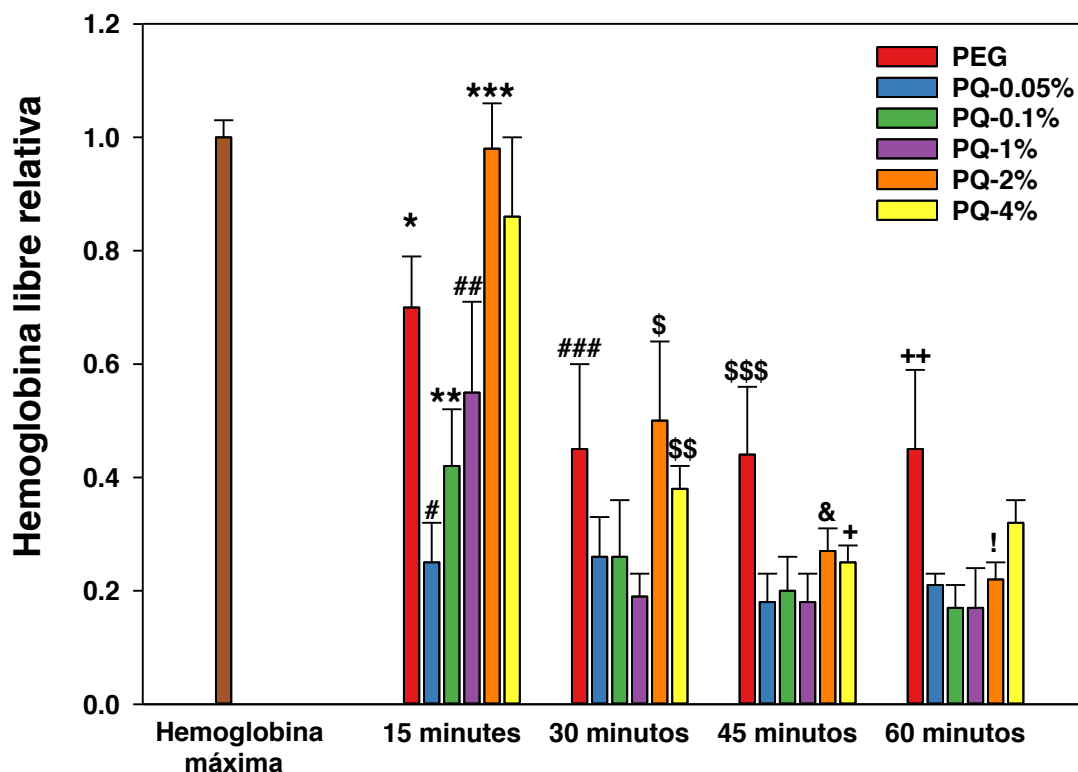


Figura 15. Representación gráfica de la hemoglobina libre relativa en sangre humana (n=5). El gráfico muestra la media de hemoglobina libre relativa de todas las muestras $\pm$ DE. * $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; # $p < 0.05$ vs PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; ** $p < 0.05$ vs PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; ### $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1% y PQ-1%; \$\$\$ $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; & $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1% y PQ-1%; ++ $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%; ! $p < 0.05$ vs PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1% y PQ-2% (ANOVA dos vías).

La alta hemoglobina libre significa que hay una alta hemocompatibilidad y una reducción del proceso de coagulación como consecuencia del contacto con los materiales probados. La disminución de la hemoglobina libre y del proceso de coagulación con el aumento de la cantidad de quitosano van acordes con algunos estudios comparativos, por ejemplo, Sanandam *et al.*⁵³ encontraron que el quitosano tarda dos veces menos en coagular la sangre que el proceso de coagulación sanguínea natural.

16. Conclusiones

Se sintetizaron seis matrices poliméricas diferentes variando la cantidad de quitosano (PQ-0.05%, PQ-0.1%, PQ-1%, PQ-2% y PQ-4%). La matriz de PEG exhibió una mayor cantidad de poros y un mayor porcentaje de hinchamiento. En contraste, PQ-4% presentó la menor porosidad y un menor porcentaje de hinchamiento. Este comportamiento se debe al entrecruzamiento entre el polietilenglicol y el quitosano. Una mayor cantidad de quitosano aumenta el entrecruzamiento, por lo tanto, disminuye la porosidad y la cinética de hinchamiento.

En los análisis biológicos, nuestros resultados demuestran que las matrices de PQ-1% y PQ-2% tuvieron la mayor actividad antibacteriana contra *S. aureus* ATCC25923 y la matriz de PEG no mostró actividad. En el caso de *E. coli*, donde no se presentó inhibición del crecimiento microbiano, se descarta la prueba, lo que obliga a repetirla con cepas sensibles al antibiótico de control.

Las propiedades de compatibilidad de las redes de PQ demostraron que la viabilidad celular no se vio afectada por la adición de quitosano. Los resultados obtenidos en el ensayo de hemoglobina libre mostraron que PQ-2% después de 15 minutos de estar en contacto con sangre humana, mostró una mejor propiedad anticoagulante, lo que sugiere un menor riesgo de formación de trombosis.

Todos los materiales mostraron menos del 5 % de hemólisis en contacto con eritrocitos humanos, por lo tanto, una alta hemocompatibilidad.

En conclusión, las redes de PQ aquí propuestas pueden representar una buena alternativa como apósito para heridas en el tratamiento de heridas crónicas, debido a sus propiedades antibacterianas y buena biocompatibilidad.

17. Referencias

1. Mao, A. S. & Mooney, D. J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 14452–14459 (2015).
2. O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **14**, 88–95 (2011).
3. Williams, D. (2014). Essential materials science. In *Essential Biomaterials Science* (Cambridge Texts in Biomedical Engineering, pp. 29-128). Cambridge: Cambridge University Press.
4. Hunt, J. A., Chen, R., van Veen, T. & Bryan, N. Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *J. Mater. Chem. B* **2**, 5319–5338 (2014).
5. MacNeil, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Mater. Today* **11**, 26–35 (2008).
6. Escudero-Castellanos, A., Ocampo-García, B. E., Domínguez-García, M. V., Flores-Estrada, J. & Flores-Merino, M. V. Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: biocompatibility assessment and effect of the sterilization process. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, 0–1 (2016).
7. Catarina, S. Efecto Antimicrobiano Del Quitosano: Una Revisión De La Literatura. *Rev. Sci. Agroaliment.* **2**, (2015).
8. Wang, L. *et al.* Dual-Functional Dextran-PEG Hydrogel as an Antimicrobial Biomedical Material. *Macromol. Biosci.* **18**, 1–9 (2018).
9. D'souza, A. A. & Shegokar, R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* **13**, 1257–1275 (2016).
10. Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S. & Chen, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J. Adv. Res.* **8**, 217–233 (2017).

11. Escudero-Castellanos, A. 'Evaluación de la biocompatibilidad in vitro de materiales poliméricos para la regeneración de tejido cutáneo'. (2016).
12. Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G. & Jordan, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **97**, 417–426 (2015).
13. Giraldo, J. Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *Univ. Concepc.* (2015). doi:10.13140/RG.2.1.3350.9287
14. Jiang, G., Sun, J. & Ding, F. PEG-g-chitosan thermosensitive hydrogel for implant drug delivery: Cytotoxicity, in vivo degradation and drug release. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **25**, 241–256 (2014).
15. INTERNATIONAL STANDARD Selection of tests for interactions with blood. **2017**, (2017).
16. Ederth, T., Ekblad, T., Öst, U. & Öst, U. Swelling of thin poly(ethylene glycol)-containing hydrogel films in water vapour - A neutron reflectivity study. (2018). doi:10.1021/acs.langmuir.8b00177
17. Ganzoury, M. A., Allam, N. K., Nicolet, T. & All, C. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **50**, 1–8 (2015).
18. Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L. & Joy, D. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning Microsc. Nanotechnol. Tech. Appl.* 1–40 (2007). doi:10.1007/978-0-387-39620-0_1
19. Han, W., Jiao, H. & Fox, D. Scanning electron microscopy. *Springer Tracts Mod. Phys.* **272**, 35–68 (2018).
20. Osorio-Delgado, M. A. *et al.* Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos. *Dyna* **84**, 241 (2017).
21. Ramirez, A. & Astudillo, L. R. De. Materiales polimeros de tipo hidrogeles : revisión sobre su caracterización mediante ftir , dsc , meb , met polymers materials type

hydrogels : review of their characterization by ftir , dsc , meb , met artículo regular (asap). *rev. latinoam. metal. y mater.* **36**, materiales polimeros de tipo hidrogeles: Revisión (2016).

22. Berretta, J. M. *et al.* Blended Chitosan Paste for Infection Prevention: Preliminary and Preclinical Evaluations. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **475**, 1857–1870 (2017).

23. Zang, S. *et al.* A comparison of physicochemical properties of sterilized chitosan hydrogel and its applicability in a canine model of periodontal regeneration. *Carbohydr. Polym.* **113**, 240–248 (2014).

24. Gaitán-Tolosa, I. M., Montiel-Campos, R., Flores-Estrada, J., Domínguez-García, M. V. & Flores-Merino, M. V. Characterization of ketoprofen-loaded PEG-CH semi-IPN system for wound dressing application. *J. Appl. Polym. Sci.* **135**, 1–9 (2018).

25. Espinosa, A. K. L., Bernad, M. J. B. & Flores, L. H. Caracterización Reológica De Geles De Liberación Modificada Y Su Cuantificación En Suero. 73 (2014).

26. Lu, H. *et al.* Poly(ethylene glycol)/chitosan/sodium glycerophosphate gel replaced the joint capsule with slow-release lubricant after joint surgery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **5063**, 1–13 (2018).

27. Velazco, G., González, A. & Ortiz, R. Apósitos de quitosano para el tratamiento de pie diabético (Chitosan films for the diabetic foot treatment). *Av. en Biomed.* **1**, 1–4 (2012).

28. Järbrink, K. *et al.* Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: A protocol for a systematic review. *Syst. Rev.* **5**, 1–6 (2016).

29. Gottrup, F. A specialized wound-healing center concept: Importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds. *Am. J. Surg.* **187**, S38–S43 (2004).

30. La, M. D. E. & Hurtado, M. TITULO PRIMERO Disposiciones Generales CAPITULO UNICO. 1–268 (2016).

31. Secretaría de Salud. NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002: Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos. 1–17 (2003).
32. Editorial, E. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. *Arbor Cienc.* **184**, 349–352 (2008).
33. Ayala Valencia, G. Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Sci. Agroaliment.* **2**, 32–38 (2015).
34. Secretaría de Salud, C. permanente de la F. de los E. U. M. Feum 11 Tomo I. *Farm. los Estados Unidos Mex.* **11th edition**, 256–264 (2014).
35. Antonino, R. S. C. M. D. Q. *et al.* Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Mar. Drugs* **15**, 1–12 (2017).
36. Koosehgo, S., Ebrahimian-Hosseiniabadi, M., Alizadeh, M. & Zamanian, A. Preparation and characterization of in situ chitosan/polyethylene glycol fumarate/thymol hydrogel as an effective wound dressing. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 66–75 (2017).
37. Shameli, K. *et al.* Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 6639–6650 (2012).
38. Xing, Q. Information or resolution: Which is required from an SEM to study bulk inorganic materials? *Scanning* **38**, 864–879 (2016).
39. Borzacchiello, A., Russo, L., Malle, B. M., Schwach-Abdellaoui, K. & Ambrosio, L. Hyaluronic acid based hydrogels for regenerative medicine applications. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
40. La, A. D. E. *et al.* Evalua AtCC 25 Prese Acion De L. (2007).
41. Sautrot-Ba, P. *et al.* Photoinduced chitosan-PEG hydrogels with long-term antibacterial properties. *J. Mater. Chem. B* **7**, 6526–6538 (2019).
42. Larrañeta, E. *et al.* Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels

crosslinked using a solvent-free process for potential biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **181**, 1194–1205 (2018).

43. Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**, 7–10 (2005).

44. Robert J. Snyder, DPM, MSc; Greg Bohn, MD; Jason Hanft, DPM; Larry Harkless, D. P. & Kim, Larry Lavery; Greg Schultz, P. and R. W. Wound Biofilm: Current Perspectives and Strategies on Biofilm Disruption and Treatments. (2017).

45. Swanson, T. & Angel, D. Wound Infection in Clinical Practice Update. *Aust. Nurs. midwifery J.* **24**, 33 (2017).

46. Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C. & Xue, M. Inflammation in chronic wounds. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–14 (2016).

47. Zhao, G. *et al.* Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Adv. Wound Care* **2**, 389–399 (2013).

48. King, J. E. & Roberts, I. S. Biophysics of. 129–156 (2016). doi:10.1007/978-3-319-32189-9

49. Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 51–63 (2010).

50. Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Brancal, H., Coutinho, P. & Correia, I. J. Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydr. Polym.* **111**, 366–373 (2014).

51. Castellanos, A., Salinas, F., Arguelles, C., Rodríguez, A. & Sánchez, E. Morfología y estructura bacteriana. *Curr. Raptor Stud. México CIBNOR-CON*, 71–82 (2006).

52. Hamilton, V. *et al.* Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 1373–1381 (2006).

53. Sanandam, M., Salunkhe, A., Shejale, K. & Patil, D. Chitosan Bandage for Faster

Blood Clotting and Wound Healing. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* **4**, 910–913 (2013).

18. Anexos

18.1 Tabla de variables de estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Nivel de medición	Escala de medición	Prueba estadística
INDEPENDIENTES						
Materiales poliméricos	Matrices de polímeros entrecruzados que absorben una gran cantidad de agua u otro fluido sin mostrar alteraciones en su conformación tridimensional.	Composición química del biomaterial: Matriz polimérica de PQ a las concentraciones de quitosano elegidas.	Cuantitativa	Razón de acuerdo a la proporción de quitosano de cada muestra	PQ	No aplica
DEPENDIENTES						
Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Nivel de medición	Escala de medición	Prueba estadística
Hinchamiento	Medición del grado de absorción del medio en el que se colocan las matrices poliméricas.	Peso de las matrices después de dejarlos a diferentes intervalos de tiempo en solución de etanol y PBS (pH=7.2).	Cuantitativa discreta	De razón	Porcentaje de hinchamiento	ANOVA
Viabilidad celular	Proporción de células vivas luego de un procedimiento realizado en ellas.	Conteo celular con ayuda de la técnica con resazurina.	Cuantitativa continua	De razón	Porcentaje de viabilidad celular	ANOVA
Actividad antibacterial	Matrices capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento o proliferación.	Medidas de absorbancia de medio de cultivo No. 3 con bacterias, después del contacto por 24 horas con las matrices poliméricas.	Cuantitativa discreta	De razón	Absorbancia	ANOVA
Hemólisis	Alteración de las membranas de los eritrocitos, lo que provoca la liberación de hemoglobina.	Absorbancia de los eritrocitos en solución con los materiales poliméricos (450/630 nm), con lo que se obtiene un porcentaje de eritrocitos no hemolizados a partir de un control.	Cuantitativa continua	De razón	Porcentaje de eritrocitos no hemolizados	ANOVA
Hemoglobina libre	Cantidad de hemoglobina libre de los eritrocitos no atrapada en un coágulo de sangre.	Medidas de absorbancia (540 nm) de una muestra sanguínea después del contacto directo a diferentes tiempos con los materiales poliméricos.	Cuantitativa continua	De razón	Hemoglobina libre relativa	ANOVA

18.2 Aprobación Comité de ética del CICMED

Toluca, México a 6 de noviembre de 2018,

Q.F.B. CLAUDIA MIRIAM ALONZO DE LA ROSA

Presente

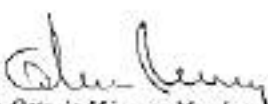
Investigadora responsable del protocolo 2018 P10 de tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Farmacéuticas Evaluación *in vitro* de una matriz polimérica de aplicación transdérmica de polietilenglicol-quitosano como posible apósito para el cierre de heridas.

Por éste conducto se le comunica que fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del CICMED, ya que cumple con los aspectos éticos y metodológicos acorde a la investigación científica, quedando registrado con el número 2018/16. Dicha investigación se desarrollará bajo su responsabilidad, con el compromiso de informar anualmente sus avances; así como hacer llegar al término de la misma un informe a éste Comité.

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2018, Año del 199 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"

Comité de Ética de la Investigación
Centro de Investigación en Ciencias Médicas


Dr. Octavio Márquez Mendoza
Presidente del CEI

Registro CONBYOÉTICA-15-CEI-005-20180731.

Registro COFEPRIS CI: ES CI 15 166 014

Registro COFEPRIS CB: ES CB 15 106 413.

c.c.p. Archivo


M. en C.S. Julio Basilio Robles Navarrete
Coordinador del CICMED

Av. Jesús Carranza n° 205,
Col. Universidad, Toluca, Méx.
C.P. 50138
Tels. (01722) 212 80 27
219 41 22



18.3 Consentimiento informado



Universidad Autónoma del Estado de México

Centro de Investigación en Ciencias Médicas

Su decisión, sea cual fuere, no comportará penalización alguna, ni afectará en ningún modo a los cuidados médicos y a la asistencia que usted pueda necesitar en el futuro.

RIESGOS

Los tipos de muestra donados serán de la sangre periférica que se le toma para el estudio de biometría hemática: su obtención es en principio un procedimiento exento de riesgo, y sus posibles complicaciones son las mismas que las de cualquier extracción de sangre habitual.

BENEFICIOS

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que Ud. no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en este estudio.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información que se obtenga al analizar las muestras que nos ha donado, así como toda la información clínica referente a usted, será considerada confidencial y tratada en consecuencia. Para garantizar el anonimato de su identidad (asegurar que la información de su muestra de sangre no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde el momento mismo de la extracción con un código. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por alguna persona autorizada del equipo investigador, adoptándose medidas estrictas para que tal información no esté disponible más que para este personal autorizado, que en ningún caso podrá develar su identidad a terceros. Así, podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras biológicas será confidencial. Le Agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.

Yo, Sr./Sra _____ de _____ años de edad. (Nombre y dos apellidos del paciente).

Manifiesto que he recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto. Por ello, manifiesto que me considero satisfecho/a con la información recibida.

Firma	Fecha
-------	-------

Este documento debe ser remitido a:

CICMED –Jefa del Laboratorio de Biología Molecular y Celular. Ph. D. Miriam Verónica Flores Merino
Toluca, Edo. de México - México.

18.6 Productos

Durante el desarrollo del proyecto de investigación, se obtuvieron los siguientes productos:

- Presentación modalidad cartel:
 - “Polyethylene glycol-chitosan hydrogels as an alternative for wound closure” durante el 7th International Symposium on Surfaces and Interfaces of Biomaterials (ISSIB), en julio de 2019 en ciudad de Quebec, Canadá.

- Presentación modalidad oral (ponencias):
 - “Polyethylene glycol-chitosan hydrogels as an alternative for wound closure” durante el 7th International Symposium on Surfaces and Interfaces of Biomaterials, en julio de 2019 en Quebec, Canadá.

- Artículos y capítulos de libros:
 - “Variantes genéticas que influyen en el desarrollo de úlcera de pie diabético y neuropatías en pacientes con diabetes mellitus tipo 2” en el libro “Retos actuales de la farmacia” dentro de la serie “tópicos selectos en ciencias y tecnología farmacéuticas”.

18.7 Abreviaturas

AIBA: Dihidrocloreuro de 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina)

ANOVA: Análisis de varianza

CICMED: Centro de Investigación en Ciencias Médicas

E. coli: Escherichia coli

FT-IR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

K₂HPO₄: Fosfato dipotásico

KH₂PO₄: Fosfato monopotásico

LSD: Diferencia Mínima Significativa

NaCl: Cloruro de sodio

PBS: Buffer Fosfato Salino

PEG: Polietilenglicol

PEGDA: Polietilenglicol diacrilado

PQ: Polietilenglicol-quitosano

S. aureus: Staphylococcus aureus

SEM: Microscopia Electrónica de Barrido

UV-Vis: Ultravioleta visible