

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIA DE MATERIALES



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES BASADOS EN ALCOHOL  
POLIVINÍLICO, NANOPARTÍCULAS DE  $ZnO$  Y EXTRACTOS DE *CALENDULA*  
*OFFICINALIS* Y *CAMELLIA SINENSIS*

TESIS QUE PRESENTA  
ANA ROSA ELORZA ÁVILA

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIA DE MATERIALES

DIRIGIDA POR  
DR. GUSTAVO LÓPEZ TÉLLEZ  
DRA. SUSANA HERNÁNDEZ LÓPEZ

2023.

Contenido de la tesis	
Índice de figuras .....	4
Índice de tablas .....	6
Glosario .....	7
Resumen.....	8
Capítulo I. Introducción.....	9
I.1 Antecedentes.....	9
Hidrogeles .....	9
Clasificación de los hidrogeles .....	10
Hidrogeles como apósitos.....	13
Proceso de curación del cuerpo humano.....	14
Alcohol polivinílico (PVOH) .....	15
Óxido de Zinc (ZnO) .....	16
<i>Calendula officinalis</i> .....	17
<i>Camellia sinensis</i> .....	17
I.2 Planteamiento del problema.....	19
I.3 Hipótesis y Objetivo .....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo .....	21
Capítulo II. Fundamentos de técnicas de caracterización.....	22
Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	22
Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	24
Espectroscopia por dispersión de energía (EDS).....	26
Análisis térmicos .....	27
Termogravimetría (TGA).....	27
Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	28
Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) .....	30
Capítulo III. Desarrollo experimental .....	32
Síntesis de hidrogeles.....	32

Pruebas de hidrogeles.....	33
Técnicas de caracterización.....	35
Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía de dispersión de energía (EDS)...	36
Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	36
Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X.....	36
Análisis térmicos.....	36
Pruebas microbiológicas.....	36
Método Kirby-Brauer.....	37
Ensayo de microdilución.....	37
Capítulo IV. Resultados y Discusión.....	39
Síntesis de hidrogeles.....	39
Pruebas de hidrogeles.....	41
Técnicas de caracterización.....	50
Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS).....	50
Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía por dispersión de energía (EDS)	54
Análisis térmicos.....	58
Espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR).....	60
Pruebas microbiológicas.....	63
Método Kirby-Bauer.....	63
Ensayo de microdilución.....	65
Capítulo V. Conclusiones.....	67
Referencias.....	68

## Índice de figuras

Figura 1. Hidrogeles (JoVE Science Education Database. Ingeniería de los materiales. síntesis de hidrogeles. JoVE, Cambridge, MA, (2023) .....	9
Figura 2. Mecanismo de formación de hidrogel por el método CD [2] .....	12
Figura 3. Analizador XPS.....	22
Figura 4. Microscopio electrónico de barrido .....	24
Figura 5. Analizador térmico simultáneo.....	27
Figura 6. Analizador FTIR .....	30
Figura 7. Muestras varias concentraciones de PVOH con 1 ciclo CD .....	39
Figura 8. Muestra 3 ciclos CD con concentración: a) PVOH 10% CD b) PVOH 15% c) PVOH 20% ..	40
Figura 9. Muestra 5 ciclos CD con concentración a) PVOH 10% b) PVOH 15% c) PVOH 20% .....	40
Figura 10. a) Composito A b) Composito B c) Composito C.....	46
Figura 11. Porcentaje de hinchamiento.....	47
Figura 12. Espectro XPS blanco.....	50
Figura 13. Espectro XPS composito.....	50
Figura 14. Análisis de enlace C1s blanco.....	51
Figura 15. Análisis de enlace O1s blanco .....	51
Figura 16. Análisis de enlace C1s composito .....	52
Figura 17. Análisis de enlace O1s composito.....	52
Figura 18. Estructura química de los polifenoles y catequinas del extracto de <i>Camelia sinensis</i> [83] [98] .....	52
Figura 19. Estructura química de algunos flavonoides y terpenoides componentes del extracto de <i>Calendula officinalis</i> [99].....	53
Figura 20. Micrografía SEM blanco .....	54
Figura 21. Micrografía SEM composito .....	54
Figura 22. Análisis EDS blanco .....	55
Figura 23. Análisis EDS composito .....	55
Figura 24. Mapeo elemental del composito .....	56

Figura 25. Mapeo elemental individual de los elementos del composito .....	57
Figura 26. Análisis térmicos .....	58
Figura 27. FTIR blanco .....	60
Figura 28. FTIR composito.....	60
Figura 29. Espectro FTIR ampliado.....	62
Figura 30. Actividad antibacterial del blanco y del composito contra <i>E.coli</i> : a) Ensayo 1, b) Ensayo 2, c) Ensayo 3 .....	63
Figura 31. Actividad antibacterial del blanco y del compositocontra <i>S. aureus</i> : a) Ensayo 1, b) Ensayo 2, c) Ensayo 3 .....	63
Figura 32. Gráfica del porcentaje de crecimiento bacteriano respecto a las concentraciones del blanco y del composito a) <i>E.coli</i> b) <i>S.aureus</i> .....	66

## Índice de tablas

Tabla 1. Apósitos comerciales .....	19
Tabla 2. Composición de hidrogeles .....	32
Tabla 3. Resultados capacidad libre de absorción .....	42
Tabla 4. Resultados características gelificantes (punto de gel) .....	43
Tabla 5. Características de dispersión.....	44
Tabla 6. Solubilidad o dispersión .....	45
Tabla 7. Composición de muestras.....	46
Tabla 8. Capacidad libre de absorción.....	46
Tabla 9. Resultados .....	47
Tabla 10. Referencias absorción de hidrogeles .....	48
Tabla 11. Composición elemental por EDS del composito .....	56
Tabla 12. Resultados FTIR .....	61
Tabla 13. Tamaño de los halos de inhibición (mm) para ensayos Kirby-Bauer de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	64
Tabla 14. Crecimiento bacteriano respecto a la concentración de cada muestra (+ crecimiento, - inhibición) (CMI, valores marcados con gris).....	65

## Glosario

ATR, reflectancia total atenuada

BE, energía de enlace

BSE, electrones retrodispersados

C1s, nivel 1s del carbono

CONH<sub>2</sub>, grupo amida

CONH, grupo amida secundaria

COOH, grupo carboxilo

DSC, calorimetría diferencial de barrido

EDS, espectroscopía de dispersión de energía

FET, transistor de efecto de campo

FTIR, espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

IR, infrarrojo

MIR, infrarrojo medio

NH<sub>2</sub>, grupo amino

NaCl, cloruro de sodio

O1s, nivel 1s del oxígeno

CaCl<sub>2</sub>, cloruro de calcio

CD, ciclos congelación y descongelación

CMI, concentración mínima inhibitoria

OH, grupo hidroxilo

pH, potencial de hidrógeno

PM, peso molecular

PVOH, alcohol polivinílico

SO<sub>3</sub>H, grupo sulfónico

SE, electrones secundarios

SEM, microscopía electrónica de barrido

TGA, análisis termogravimétrico

VIH, virus de inmunodeficiencia humana

XPS, espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

Zn, Zinc

ZnO, Óxido de Zinc

# Resumen

Con el objetivo de desarrollar un material de curación o apósito para el cuidado de heridas en la piel, en el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de un compuesto de hidrogel basado en alcohol polivinílico mediante el método congelación y descongelación. El compuesto se encuentra además constituido por nanopartículas comerciales de óxido de zinc, extracto de *Calendula officinalis* y extracto de *Camelia sinensis*. Cada uno de estos componentes cumple con una función en el material: las nanopartículas de ZnO aportan propiedades antibacteriales, mientras que los extractos naturales contribuyen para favorecer el proceso de cicatrización y protección antioxidante. Este fue caracterizado mediante algunas técnicas que permitieron evaluar la integración de los componentes, la estructura del material y su estabilidad. Se realizaron análisis de XPS, SEM-EDS, FTIR y análisis térmicos (DSC y TGA). El compuesto se sometió a pruebas con base al estándar británico BS EN 13726-1: 2002 “ Test methods for primary wound dressings- Part 1 Aspects of absorbency”, las cuales permiten determinar la capacidad de absorción de un material, una característica importante en el uso como apósito. También se realizaron análisis microbiológicos, mediante el método Kirbi-Bauer y ensayo de microdilución, para comprobar su actividad antibacterial.

Por medio de las técnicas de caracterización se pudo confirmar una integración exitosa de los componentes y que las interacciones entre ellos ocurren principalmente por fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno, sin que se presentaran modificaciones químicas detectables. Además se observó la dispersión homogénea de las nanopartículas y extractos dentro de la matriz, sin aglomeraciones ni zonas vacías. Las pruebas de absorción demostraron que el material cumplió con los requisitos del estándar de absorción. Las pruebas microbiológicas mostraron notable actividad antibacterial del material frente a bacterias Grammpositivas y Grammnegativas.

Con base a los resultados obtenidos, se propone que el material sintetizado tiene el potencial para funcionar como apósito para heridas, ya que se integraron propiedades biológicas y físicas que podrían contribuir a un buen manejo del proceso de curación de una herida.

# Capítulo I. Introducción

## I.1 Antecedentes

### Hidrogeles

Un hidrogel es una red tridimensional compuesta por polímeros hidrofílicos que tienen la capacidad de hincharse en agua y retener cierta cantidad de ésta, manteniendo su estructura debido a las reticulaciones de las cadenas poliméricas que los componen [1].

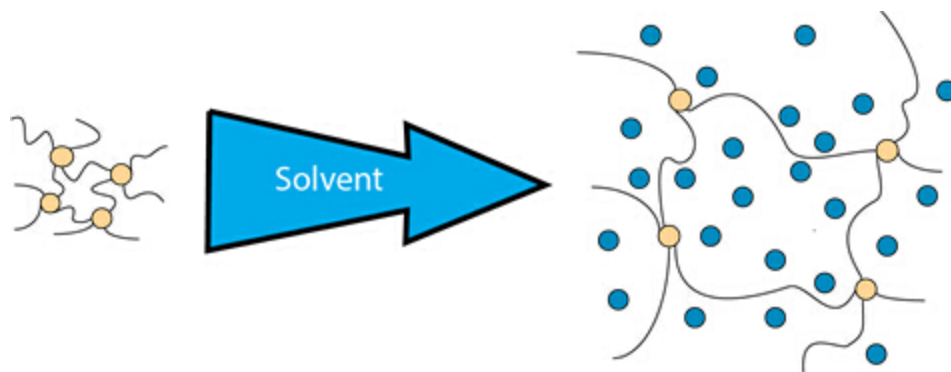


Figura 1. Hidrogeles (JoVE Science Education Database. Ingeniería de los materiales. síntesis de hidrogeles. JoVE, Cambridge, MA, (2023)

La hidrofiliidad en ellos, es debido a la presencia de grupos hidrofílicos como pueden ser:  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONH-$ , y  $-SO_3H$  [1].

Una característica física de los hidrogeles es el hinchamiento. El hinchamiento es un proceso físico en el que el material incrementa su volumen debido a la absorción de agua [4]. El contenido de agua absorbida brinda al hidrogel un grado de flexibilidad [2]. El líquido absorbido actúa como un filtro para permitir la difusión libre de algunas moléculas de soluto, mientras que la red de polímeros actúa como una matriz para unir el líquido. Los hidrogeles pueden absorber agua desde 10-20% hasta miles de veces su peso seco [5]. Otras propiedades mecánicas de un hidrogel son la resistencia a la compresión, la resistencia a la tensión y el módulo de elasticidad [2].

La capacidad de hinchamiento es el parámetro más importante en un hidrogel, ya que confiere otras propiedades como son grado de reticulación, propiedades mecánicas,

degradación, etc [5]. Además de que es la característica principal para que un material pueda ser nombrado así.

### **Clasificación de los hidrogeles**

Los hidrogeles se clasifican de acuerdo con diferentes factores. Por el origen de los polímeros componentes, estos pueden ser sintéticos, naturales o híbridos. De acuerdo con el número de polímeros que los componen pueden ser homopoliméricos, copoliméricos o multipoliméricos. De acuerdo con el tipo de unión o enlaces en la estructura, estos pueden ser físicos o químicos. En los hidrogeles con uniones químicas, ya que estos se forman a partir de reacciones químicas, estas uniones son permanentes e irreversibles. Mientras que, en los hidrogeles con uniones físicas, las uniones son reversibles y temporales. De acuerdo con su degradación, se pueden clasificar en biodegradables o no biodegradables. De acuerdo con la respuesta a estímulos, los hidrogeles pueden ser sensibles a la temperatura, al pH, al sonido, a alguna sustancia etc. De acuerdo con su estructura, se clasifican en amorfos, semicristalinos y cristalinos. [1] [6].

Los hidrogeles presentan distintas características físicas y químicas y es posible modificarlas. Las propiedades mecánicas dependen de la materia prima y se basan en la modificación de la estructura. La porosidad es una propiedad morfológica y se define como cavidades dentro de la estructura, el control de ésta es importante en distintas aplicaciones. Los poros se pueden formar por la separación de fases durante la síntesis. El tamaño de poro promedio, la distribución del tamaño de poro y las interconexiones de los poros son factores importantes de una matriz de hidrogel. [4] [6]

Un hidrogel en estado puro no cuenta con las mejores propiedades físicas, ya que su estructura es frágil. Es por esto, que se busca la adición de distintos materiales para la creación de compositos o nanocompositos, basados en una matriz de hidrogel. Un composito o nanocomposito, es un material compuesto de 2 o más elementos, los cuales llevan a cabo una sinergia, mejorando las propiedades que se podrían presentar originalmente o por separado. Se busca fortalecer la estructura y con esto mejorar algunas propiedades mecánicas, como por ejemplo la dureza o la resistencia a distintos esfuerzos. Lo anterior permite que sean usados en diferentes industrias y aplicaciones especializadas (química, alimentos, médica).

Un nanocomposito de hidrogel se crea a partir de la combinación de nanopartículas u otros materiales, mediante interacciones físicas o químicas. Algunas de estas nanopartículas pueden ser de óxidos metálicos, polímeros, carbono, etc. Estos materiales presentan muchas ventajas como: propiedades mecánicas mejoradas (en comparación del material puro), flexibilidad, buena dispersión, resistencia al ataque por microorganismos, etc [7].

### **Síntesis de hidrogeles por congelación-descongelación**

Para la síntesis de los nanocompositos, según la aplicación y el tipo de material que se use, el método cambia, existen principalmente dos metodologías para crearlos. Los métodos *in-situ*, en los que ocurre algún tipo de reacción para la creación ya sea de la matriz o de las nanopartículas; y los métodos *ex-situ* en los que de manera separada se sintetizan las nanopartículas y la matriz que posteriormente se unen.[8]

Un método de síntesis que no utiliza ningún agente externo adicional o proceso químico es el de congelación-descongelación [9]. El mecanismo de síntesis físico se logra gracias a las interacciones que se presentan entre las cadenas de la matriz y los materiales añadidos, dichas interacciones son principalmente: fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno o fuerzas hidrofóbicas dentro de las cadenas.

El proceso se basa en la separación de fases: una solución que contiene un polímero en un disolvente (agua) se congela y posteriormente se descongela. Durante la congelación, el agua se solidifica y forma cristales, y el polímero se separa de esta fase del agua, formando una red tridimensional que atrapa el agua cuando se descongela. Esto conlleva a la formación de una estructura de gel [10].

En esta técnica, el polímero para formar la red del hidrogel debe tener uniones estables a nivel molecular y permitir la entrada de agua a la estructura reticular. Los polímeros son materiales conformados por largas cadenas de unidades repetidas, esto les brinda una estructura estable. El polímero que se ocupa de matriz debe presentar características adecuadas dependiendo de la aplicación (el alcohol polivinílico, por ser biocompatible, funciona en el área biomédica) [2].

Algunas de las ventajas que presenta este método son una baja toxicidad: ya que no se requiere usar reactivos adicionales, así como mejoras en fuerza mecánica, elasticidad y es posible controlar la porosidad del nanocomposito final [2][8].

La idea principal del método es controlar el proceso de cristalización (congelación) y la formación de una estructura ordenada (descongelación) para que los hidrogeles posean propiedades óptimas dependiendo la aplicación. Las propiedades se pueden controlar, variando diferentes factores durante la síntesis como: el peso molecular del polímero, el número de ciclos al que se somete o la temperatura a la que se congele [2]. Este mecanismo permite la formación de microcristales en la estructura del hidrogel [11] (Figura 2).

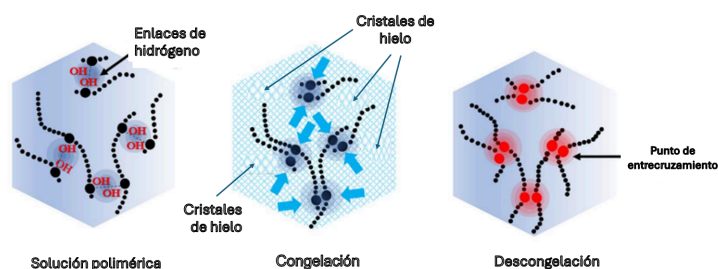


Figura 2. Mecanismo de formación de hidrogel por el método CD [2]

Los primeros estudios para crear hidrogeles por el método congelación-descongelación, iniciaron alrededor del año 1975, Peppas N, demostró que las soluciones de alcohol polivinílico se convierten en geles mediante los ciclos repetidos de congelación y descongelación, como resultado de una separación de fases y cristalización [12]. En el 2007, Paranhos C, et.al. obtuvieron un hidrogel mediante el método mencionado, basados en PVOH y poliéster sulfonado, concluyendo que es posible el uso de este composito en aplicaciones donde la capacidad de hinchamiento sea importante [13]. En el año 2015, Guan Y et al. obtuvieron un hidrogel por medio de la técnica congelación-descongelación a partir de PVOH fosfatado, hemicelulosa y nanofibras de quitina, concluyendo que los hidrogeles preparados por esta técnica cuentan con buenas propiedades mecánicas [10].

Diversos estudios han evaluado los efectos de los ciclos de congelación y descongelación en hidrogeles basados en alcohol polivinílico. R. Hernández et al. investigaron parámetros de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante varias horas y su descongelación a temperatura ambiente, con un rango de 3 a 9 ciclos, destacando la importancia de sellar el molde para evitar la pérdida de agua y la contracción del gel [14]. Stauffer y Peppas N utilizaron temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  con tiempos de congelación de 1 a 24 horas, seguido de descongelación a temperatura

ambiente, y observaron cambios en el peso y grado de hinchazón tras cada ciclo, obteniendo hidrogeles termorreversibles fuertes con integridad mecánica, empleando una solución al 15% y realizando 4 ciclos [9]. Mongias y Peppas N estudiaron ciclos de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 6 a 12 horas, con descongelación a temperatura ambiente por 2 horas, en un total de 2 ciclos, encontrando una mayor capacidad de adhesión en una solución al 20% [15]. Urushizaki F et al. trabajaron con temperaturas de  $-25^{\circ}\text{C}$  por 16 horas y analizaron entre 1 y 4 ciclos, observando que la dureza y rigidez aumentan con el número de ciclos, mientras que el grado de hinchamiento disminuye, utilizando una solución al 15% [16]. Hassan C y Peppas N investigaron hidrogeles con ciclos de  $-20^{\circ}\text{C}$  por 8 horas y descongelación a temperatura ambiente por 4 horas, realizando 3 y 5 ciclos, con soluciones al 15%, y enfocándose en la liberación de proteínas [17]. Hatakeyama et al. estudiaron ciclos de  $-15^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas con descongelación a temperatura ambiente por 3 horas, con un rango de 1 a 5 ciclos y una solución al 10%, observando que el aumento en el número de ciclos incrementa el tamaño de los poros [18]. Finalmente, Peppas N llevó a cabo experimentos con ciclos de  $-20^{\circ}\text{C}$  por 18 horas y descongelación a temperatura ambiente por 6 horas, en un rango de 3 a 5 ciclos, encontrando que los hidrogeles sometidos a 5 ciclos mostraron una estructura y uniones fuertes, utilizando una solución al 15% [19].

### **Hidrogeles como apósitos**

Los composites o nanocomposites de hidrogel, debido a las características físicas y químicas que obtienen en conjunto con otros elementos, son ideales para aplicaciones biomédicas. Estas aplicaciones son curación, liberación de medicamentos, diabetes, tratamiento de quemaduras, aplicaciones dentales, regeneración de tejidos, matrices tridimensionales para la ingeniería de tejidos, vehículos de administración de fármacos, biomateriales compuestos y rellenos inyectables en cirugías. Además, es posible diseñar hidrogeles con propiedades físicas y biológicas controladas para modular funciones celulares y tisulares. [11] [3] [20][21]

Una de las aplicaciones más importantes es su uso como apósitos. Un apósito es un elemento encargado de curar heridas sobre la piel, brindando protección a la zona afectada del ambiente exterior y facilitando uno que permita la recuperación del área.

Para que un material pueda ser considerado como apósito debe cumplir ciertos requisitos como: mantener un ambiente húmedo para evitar deshidratación celular y permitir la

cicatrización de la piel, ser una barrera de protección contra infecciones, contaminación o microorganismos, absorber fluidos de la zona, estimular el proceso de cicatrización y crecimiento, se requieren también propiedades mecánicas como flexibilidad para adaptarse al contorno de la herida, cierto grado de resistencia a la tensión y/o elongación para evitar su ruptura por estímulos externos, etc., lo anterior debe lograrse manteniendo cierta comodidad [22]. En general, lo que se busca es que el material que será usado en la zona dañada no afecte el proceso de curación del organismo, sino que por el contrario lo facilite o al menos no interfiera en él.

### **Proceso de curación del cuerpo humano**

El proceso de curación del organismo consta en general de 4 etapas:

- **Coagulación:** en esta etapa se busca crear una barrera física para evitar pérdida de sangre. Las células involucradas aquí son las plaquetas y trombocitos.
- **Inflamación:** etapa de defensa del organismo, donde se realiza una limpieza de la zona afectada por células blancas.
- **Proliferación:** las células se diferencian y continúan la limpieza del área, comienzan a llegar más elementos para secretar enzimas y factores para reducir el posible daño.
- **Cicatrización:** el colágeno es secretado para cerrar la herida y se forma la cicatriz que permanecerá.

Muchos factores pueden interferir en el proceso de curación natural, como las características de la herida, la exposición con el ambiente, estrés, edad, enfermedades independientes. [3] [23]

Actualmente, ya no solo es necesario el proteger la zona dañada físicamente, sino que con la evolución de los materiales se busca el reducir el daño que se considera permanente, como por ejemplo una cicatriz. Esto se puede lograr con la combinación de elementos que permitan mejorar las propiedades de un material base (matriz) y ayuden al organismo a realizar de manera eficiente e incluso rápida procesos naturales como el de curación.

Los apósitos de hidrogel son una aplicación en la que se pueden abordar distintos puntos relacionados al proceso de curación del organismo. Y que además no está limitado a una sola, sino que en conjunto los elementos que lo forman pueden contribuir a cubrir o llenar

el mayor número de requerimientos clínicos y biológicos. Algunas de estas funciones serían monitoreo, auto regeneración, sistemas de liberación de fármacos, respuesta a estímulos, conductividad, entre otras [3].

Un hidrogel puede ser diseñado como apósito con distintos componentes para una curación efectiva [24]. En 2023 Gokaltun A. et. al. diseñaron un apósito basado en un copolímero catiónico y lo reforzaron con cucurbit-7-uril para el tratamiento de quemaduras, con buenas propiedades mecánicas y capacidad de dilución [25]. Los hidrogeles son usados como apósitos ya que mantienen humedad en la zona herida, absorben exudado, disminuyen el dolor en la zona y es posible agregar componentes adicionales como medicamentos [24].

Una de las características más importantes que debe tener un apósito, es ser antibacterial. Proteger la zona afectada de adquirir una infección bacteriana causada por microorganismos y bacterias externas. Una infección bacteriana en una herida en la piel puede tener graves consecuencias en el organismo. Algunas de las formas en las que se ha buscado mejorar las características antibacteriales de los hidrogeles son: la integración de antibióticos, nanopartículas de elementos metálicos, ingredientes que naturalmente cuenten con características antibacteriales, etc. [3].

### **Alcohol polivinílico (PVOH)**

Se ha demostrado que el PVOH puede formar hidrogeles con buena estructura y propiedades a través del método descrito previamente, con ciclos de congelación de entre  $-5^{\circ}$  y  $-20^{\circ}$  C y descongelar a temperatura ambiente [13], este proceso permite que el compuesto adquiriera la apariencia de un gel, esponjoso, suave y elástico [8]. En el 2016, Ou K et al, sintetizaron un hidrogel con PVOH y PAM, por medio del método de congelación y descongelación, concluyendo que estos hidrogeles tenían poros más grandes y mayor capacidad de hinchamiento que los fabricados por otros métodos [26].

El PVOH es un polímero semicristalino, no tóxico, soluble en agua, biodegradable y biocompatible. Además, por su estructura, permite una buena distribución de otros componentes (nanopartículas). La cantidad de grupos -OH libres en PVOH, actúan como una barrera física para la formación de cristales formando puentes de hidrogeno para lograr la dispersión de nanopartículas [8]. El PVOH es utilizado en diversas aplicaciones médicas debido a su biocompatibilidad.

En 2022, Bernal-Chavez et al, analizaron el método de congelamiento-descongelamiento y los cambios en las propiedades de un hidrogel basado en PVOH y goma xantana. Concluyeron que el compuesto contaba con características como: alta cristalinidad, flexibilidad y resistencia. Estas características sugieren que puede ser usado en la ingeniería de tejidos [27].

La formación de hidrogeles de PVOH a través del método congelación y descongelación no requiere agentes químicos adicionales. Se basa en la separación de fases durante los periodos de síntesis. Las propiedades finales del hidrogel se pueden modificar variando parámetros de la síntesis, como el número de ciclos, la temperatura, la concentración del PVOH [28].

En el tratamiento de heridas, el alcohol polivinílico es una buena opción por las características ya mencionadas además de que, por su apariencia transparente, permite la monitorización de la zona afectada.

### **Óxido de Zinc (ZnO)**

El óxido de zinc (ZnO) es un semiconductor usado en varias aplicaciones como, por ejemplo, en pigmentos, protectores solares y elementos antimicrobianos y antifúngicos [8]. El ZnO es un semiconductor de tipo n, cristaliza en dos formas principalmente, wurtzita hexagonal y blenda de Zinc cúbica. La estructura wurtzita es más estable en condiciones estándar y por lo tanto es más común, también es un material piezoeléctrico con propiedades eléctricas, ópticas y químicas [29].

En tamaño nanométrico, el óxido de Zinc presenta diferentes propiedades en comparación de tamaños mayores. Es usado comúnmente, en industrias cosméticas y farmacéuticas [30]. Las nanopartículas de ZnO son eficaces para inhibir bacterias *Grampositivas* y *Gramnegativas*, incluso tienen actividad antibacteriana contra esporas resistentes a altas temperaturas y presiones [31][32].

En el año 2007, Zhang L, et al. realizaron pruebas antibacterianas de *E. coli* incubada en presencia de nanofluidos que contenían diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO, demostrando la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO ya que provocan daños en la pared de la membrana de la bacteria [31]

En comparación con otros nanocompositos, el complemento ZnO/PVOH brinda buenos resultados, debido a que existe una buena dispersión de las nanopartículas en la matriz de PVOH y al mismo tiempo el ZnO agrega propiedades antibacteriales que el PVOH por sí solo no presenta [8].

### ***Calendula officinalis***

La *Calendula officinalis* es una planta de colores amarillo a naranja, su extracto está compuesto entre otros elementos de triterpenoides, flavonoides (pigmentos naturales que brindan protección antioxidante), cumarinas (metabolitos que presentan actividad bactericida y fungicida), esencias, carotenoides (actividad antioxidante) y aminoácidos (unidad estructural de las proteínas) [[33].

Es conocida por su importancia medicinal, ya que contiene diversos elementos químicos como carbohidratos, aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, quinonas, y otros componentes con funciones biológicas como cicatrización de heridas, inmunoestimulante, hepatoprotector, antiinflamatorio, antiedematoso, antibacteriano, antifúngico, antioxidante, antidiabético, anti-VIH, nefroprotector, hipoglucémico [34]. En 2022 Naseriyeh T. et,al. prepararon un apósito de hidrogel de quitosano con aloe vera y nanoliposomas de *Calendula officinalis* para el tratamiento de heridas, estudiaron la liberación controlada y la absorción dérmica, mostrando control en estas [33].

La *Calendula officinalis* puede contribuir a la cicatrización de las heridas incrementando la angiogenesis, la epitelización y el metabolismo de las proteínas y el colágeno, lo que mejora la circulación sanguínea de la zona y la formación del tejido de granulación. Además, en el extracto de esta planta no se ha detectado algún tipo de toxicidad con el ser humano [34].

### ***Camellia sinensis***

La *Camellia sinensis* es un arbusto de hoja perenne de hasta 16 m de altura. El té verde representa alrededor del 20% del té seco que se fabrica anualmente y se consume principalmente en países asiáticos, como Japón, debido a su relativa seguridad y precio más barato en comparación con otras bebidas. Es conocida por ser benéfica para el ser humano, presentando propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, analgésicas, entre otras [35] [36].

La *Camellia sinensis* contiene distintos tipos de polifenoles como catequinas, a las cuales se le atribuyen todas las propiedades descritas [[37]. Los polifenoles de *Camellia sinensis* son antioxidantes naturales que se extraen del extracto las hojas de té, tienen propiedades antioxidantes muy efectivas y además poseen propiedades anticancerígenas y bactericidas [38]. Un antioxidante es una sustancia que neutraliza radicales libres, eliminando así el posible daño que tendrían en el organismo [3]. Luo J, et.al. en el 2020, crearon un hidrogel biodegradable, basado en PVOH y polifenoles por electrohilado, demostrando que las propiedades antioxidantes y antibacteriales del compuesto mejoran con la adición de los polifenoles [38].

### **Interacción Interfacial entre ZnO y Extractos Polifenólicos**




La funcionalidad extendida de este hidrogel compuesto recae en la **interacción interfacial** entre las **nanopartículas de ZnO** y los **polifenoles** (como los flavonoides y las catequinas) presentes en los extractos de *Calendula officinalis* y *Camellia sinensis*. La superficie de las nanopartículas de ZnO está saturada de iones **Zn<sup>2+</sup>** y grupos hidroxilo. Los polifenoles, por su parte, son moléculas ricas en **grupos hidroxilo fenólicos (-OH)** que actúan como **ligandos quelantes**. Se espera que estos grupos funcionales se coordinen directamente con los iones **Zn<sup>2+</sup>** superficiales, creando una **capa de funcionalización orgánica** que recubre las nanopartículas. Esta **complejación superficial** es crucial por dos razones fundamentales para la Ciencia de Materiales: primero, **mejora la dispersión y previene la agregación** del ZnO en la solución de PVOH, lo que garantiza la homogeneidad del hidrogel. Segundo, la capa polifenólica actúa como un **reservorio de moléculas bioactivas**, lo que promueve una **liberación más estable y sostenida** del agente antiinflamatorio y antioxidante, en lugar de una liberación brusca. Esta interacción es clave para asegurar la estabilidad a largo plazo del biomaterial y la eficacia terapéutica del apósito final.

## I.2 Planteamiento del problema

En la actualidad existen tratamientos para la curación de heridas sobre la piel, estos tratamientos incluyen antibióticos, curaciones en la zona afectada, hidratación y la aplicación de apósitos basados en hidrocoloides o hidrogeles. Un ejemplo de este tipo de lesiones en la piel son las úlceras por presión. Las úlceras por presiones son lesiones localizadas en la piel, derivadas de la presión del peso del cuerpo sobre esta. Estas no se desarrollan a partir de enfermedades, sino de factores externos como la edad, el estado nutricional y de alteraciones en la movilidad [39]. Estas lesiones llevan los tratamientos mencionados previamente.

De acuerdo con una revisión acerca de los productos de apósitos de hidrogel actuales (septiembre 2023) de venta en México, se obtiene la tabla 1.

Tabla 1. Apósitos comerciales

Nombre comercial	Marca	Características	Imagen
B0416 Apósito para quemaduras 10X40CM	Waterjel	Gel refrescante formulado científicamente y utilizan almohadillas no tejidas de grado médico.	
Tegaderm hidrogel	3M	Para rellenar heridas, con un apósito secundario	
Aquacel Ag+	Convatec	Apósito para cubrir heridas, con tecnología absorbente e iones de plata para evitar infecciones	

Duoderm extra

Convatec

Apósito para reducir el riesgo de ruptura de la piel, formado por una película delgada de poliuretano



Aquaheal

Spenco

Alivio y prevención para ampollas



Estos productos, presentan ciertas desventajas durante los tratamientos como, por ejemplo: solo representan una barrera física para evitar infecciones y contaminación en la zona afectada sin agregar otro elemento que contribuya al proceso de curación y cicatrización; bajas propiedades mecánicas y pérdida de adhesión con el tiempo por lo cual necesitan ser cambiados frecuentemente; bajas o nulas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, entre otras.

A pesar del progreso en los apósitos basados en hidrogeles de PVOH, el desafío técnico persistente radica en la creación de una matriz que combine de manera efectiva las propiedades antimicrobianas de los nanomateriales con las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de compuestos naturales, garantizando al mismo tiempo la estabilidad a largo plazo y la liberación controlada de los agentes activos. La simple adición de nanopartículas de ZnO a matrices poliméricas convencionales a menudo resulta en la agregación nanométrica y la lixiviación rápida de los iones  $Zn^{2+}$ , limitando la eficacia y la reutilización del apósito.

La brecha de conocimiento actual reside en el diseño de una arquitectura interfacial que resuelva este problema. En este trabajo, se propone que la combinación sinérgica de PVOH, nanopartículas de ZnO y extractos polifenólicos de *C. officinalis* y *C. sinensis* supera este desafío. Los polifenoles actúan como agentes de funcionalización *in situ*, creando un

revestimiento molecular estable en la superficie del ZnO. Esta capa bioactiva no solo previene la **agregación nanométrica** (mejorando la homogeneidad y la dispersión) sino que también media la **liberación controlada** de los componentes, potenciando el efecto **antiinflamatorio/antioxidante** del apósito. Por lo tanto, el problema a resolver es **establecer la metodología de síntesis y caracterizar la interacción interfacial** requerida para lograr esta **sinergia funcional ternaria** que resulta en un apósito avanzado con estabilidad estructural y una bioactividad extendida superior a la de los hidrogeles binarios comerciales.

### I.3 Hipótesis y Objetivo

#### Hipótesis

La combinación de alcohol polivinílico con nanopartículas comerciales de óxido de zinc y extractos de *Camelia sinensis* y *Calendula officinalis* permitirán obtener un hidrogel con características adecuadas para su aplicación como apósito, que será caracterizado por técnicas analíticas, espectroscópicas y pruebas microbiológicas.

#### Objetivo

Obtener y caracterizar un hidrogel a partir de la combinación de alcohol polivinílico, nanopartículas comerciales de óxido de zinc y extractos de *Camelia sinensis* y *Calendula officinalis*, con el fin de evaluar su aplicación como apósito.

# Capítulo II. Fundamentos de técnicas de caracterización

## Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)



Figura 3. Analizador XPS

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X es una técnica analítica de superficie con la cual se puede determinar la composición elemental y estados químicos de los elementos que constituyen a distintos materiales. Se utiliza para estudiar la superficie de una muestra ya que la profundidad del análisis es aproximadamente de 0.5 a 2 nanómetros. Por lo que es importante recalcar que esta es una técnica que analiza la superficie de los materiales. Los límites de detección dependen del elemento componente de la muestra y se encuentran normalmente en un intervalo de 0.1 a 3 %.

Esta técnica se basa en el efecto fotoeléctrico. Una muestra se irradia con rayos X de alta energía, los fotones de los rayos X interactúan con los electrones de la muestra. Si la energía del fotón es mayor para vencer la energía de enlace que mantiene unido un electrón al núcleo atómico, el electrón es expulsado del átomo y liberado. Estos electrones reciben el nombre de fotoelectrones. La energía cinética con la que se libera el electrón es medida y se calcula la energía de enlace. Esta energía de enlace (BE) es característica para cada elemento, excepto hidrógeno y helio los cuales no pueden ser detectados mediante esta técnica.

El espacio que queda al liberarse un electrón es llamado vacancia. El átomo puede llenar esta vacancia con otro electrón de la capa de mayor energía (capa de valencia). Durante este proceso de relajación, la energía liberada puede transferirse a otro electrón, que igualmente es expulsado. Este electrón se denomina electrón Auger. Los electrones Auger son detectados por el analizador y son útiles para el análisis cualitativo de la muestra.

Un analizador XPS está formado por:

- Fuente de rayos X (Al o Mg).
- Cámara de ultra alto vacío. Para permitir el movimiento de los electrones de la muestra, evitar contaminación.
- Analizador
- Sistema de adquisición de datos

En un espectro XPS, cada pico representa un electrón asociado a un elemento en específico. De esta manera, se puede conocer el estado químico de la muestra, analizando los cambios en la BE. Además, el análisis no provoca daños a la muestra. Por medio de esta técnica se pueden analizar distintos tipos de materiales como polímeros, cerámicos, semiconductores, etc. Sin embargo, un aspecto importante es que la muestra no debe contener agua ni algún tipo de líquido. Debido al sistema de ultra alto vacío con el que trabaja el analizador, esto podría provocar contaminación del mismo, destrucción de la muestra o problemas en el sistema de ultra alto vacío. [40] [41]

## Microscopía electrónica de barrido (SEM)



Figura 4. Microscopio electrónico de barrido

La microscopía electrónica de barrido es una técnica de caracterización de materiales que brinda información topográfica, morfológica, superficial, composición química, cristalográfica de un material.

Un equipo de SEM está compuesto por:

- Fuente de electrones, generador del haz de electrones.
- Sistema de lentes, enfocar y controlar el haz de electrones.
- Detectores, para registrar las señales generadas.
- Sistema de adquisición.

El principio se basa en un haz de electrones acelerados que se posiciona sobre la muestra por medio de campos electromagnéticos. Los electrones del haz interactúan con los átomos de la muestra, chocando en distintos puntos de ella. Estas interacciones son de tipo elásticas, donde existe un cambio en la trayectoria de los electrones del haz sin pérdida de energía, e inelásticas, donde la energía se transfiere del haz hacia la muestra. Los electrones normalmente experimentan múltiples interacciones de estos tipos, provocando que el haz de luz se disperse dentro del material y pierda energía, produciendo un volumen de interacción dentro del material. De este volumen de interacción surgen diferentes señales:

- Electrones retrodispersados (BSE). Electrones del haz que rebotan con un choque que puede ser considerado como elástico y salen de nuevo hacia el detector.
- Electrones secundarios (SE). Electrones del haz que impactan y expulsan electrones de baja energía, lo que brinda imágenes y detalles de la topografía de la superficie.
- Rayos X característicos y electrones Auger. Para el análisis composicional de la muestra.

Las imágenes se forman mapeando la intensidad de alguna de estas señales producidas hacia una película de visualización. La información se transfiere punto a punto y se traduce en escala de grises. La imagen es una matriz de pixeles con coordenadas y valor gris proporcional a la intensidad de la señal.

Dos conceptos importantes en el análisis SEM son la resolución y la magnificación. La resolución es la capacidad del sistema para distinguir entre 2 puntos cercanos de la imagen. Esta se modifica dependiendo del diámetro del haz de electrones incidente en la muestra. La magnificación depende del tiempo y el área de la muestra que se barre con el haz de electrones. Ambos aspectos contribuyen a mejorar la calidad de las imágenes adquiridas.

Es posible analizar en SEM diferentes tipos de materiales. Sin embargo, las muestras deben ser conductoras y secas. En caso de que no sea así, que el material no sea conductor, deberá estar recubierta por una capa conductora para protegerla y mejorar la calidad de la imagen. [42] [43] [44]

## **Espectroscopia por dispersión de energía (EDS)**

La espectroscopía de dispersión de energía de rayos X es una técnica de caracterización que se basa en la medición de la intensidad de la emisión de rayos X en función de la energía de los fotones de rayos X.

Esta técnica permite analizar tanto de manera cuantitativa como cualitativa una muestra. El análisis cualitativo de la muestra se basa en la identificación de los picos en el espectro y la asignación de cada uno a un elemento específico. Este análisis se realiza de manera automática instalando un detector especial a la columna del microscopio y también un software especializado que es automático o bien de manera manual es posible realizar la asignación de cada pico. El análisis cuantitativo se refiere a la intensidad de estos picos.

La principal ventaja de un sistema EDS está en que se puede acoplar con otros sistemas (por ejemplo SEM). Un analizador EDS está compuesto por:

- Detector de cristal semiconductor. Instalado con un preamplificador de transistor de efecto de campo (FET) y un sistema de enfriamiento.
- Fuente de alimentación de alto voltaje
- Amplificadores
- Sistema de cómputo

Para analizar una muestra por EDS, esta debe ser plana y delgada para reducir los posibles errores en la adquisición de las señales. [45] [46][47]

## Analisis térmicos



Figura 5. Analizador térmico simultáneo

Los análisis térmicos son un conjunto de técnicas usadas para determinar las propiedades físicas o químicas de un material cuando experimenta cambios de temperatura. Es decir, cuando este se calienta, enfría o permanece a una temperatura constante. Estos análisis son aplicados en una gran cantidad de áreas de investigación donde el propósito principal es determinar el efecto de los cambios de temperatura en un material.

Mediante los análisis térmicos se pueden evaluar una gran cantidad de propiedades de los materiales. Permiten detectar cambios de fase, estudios cinéticos, encontrar transiciones térmicas, mediciones de entalpía, capacidad calorífica, entre otras.

TGA y DSC son de las técnicas más útiles en los análisis térmicos. Aunque cada una proporciona información distinta, en conjunto permiten obtener un perfil térmico completo de un material. Además, el uso simultáneo permite una visión integral del comportamiento térmico de un material.

Los diagramas obtenidos mediante análisis térmicos llevan el nombre de termogramas.

[48] [49] [50]

### **Termogravimetría (TGA)**

En la termogravimetría se mide el cambio de masa de un material en función de la temperatura, mientras el material se somete a un programa de temperatura controlado.

Un analizador cuenta con los siguientes elementos:

- Balanza con alta sensibilidad

- Horno
- Programador de temperatura
- Sistema de atmósfera controlada
- Sistema de monitoreo de temperatura
- Sistema de adquisición y análisis de datos

El termograma obtenido representa el cambio de masa dependiendo del programa de temperatura que experimenta la muestra. Algunas de las características de un material que se pueden conocer a partir de él son la estabilidad térmica, la estabilidad oxidativa, acerca de la vida útil del material, procesos de descomposición, entre otras. A medida que la temperatura aumenta, la muestra puede perder masa debido a distintos fenómenos como evaporación de solventes, descomposición térmica, etc.

Las limitaciones en analizadores principalmente son por el tamaño y peso de la muestra, ya que usualmente se trabaja con muestras de entre 5-20 mg.

[51] [49]

### **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera un material, a una temperatura constante, por tiempo establecido o cuando sufre cambios de temperatura a velocidad constante. El propósito de esta técnica es analizar la influencia de un tratamiento térmico en las propiedades y estructura de un material. El fundamento se basa en que cuando la muestra experimenta una transición térmica, esta absorbe o libera calor. El analizador ajusta el flujo de calor para mantener a la muestra y a una referencia a la misma temperatura. El analizador registra el flujo de calor y así es posible conocer las transiciones térmicas del material.

Mediante la calorimetría diferencial de barrido es posible conocer las transiciones térmicas de un material como fusión, cristalización, transición vítrea, etc. También es posible conocer la estabilidad térmica y la cinética de cristalización de un material.

Un analizador normalmente consta de:

- Horno con control de temperatura

- Sensores de flujo de calor
- Crisoles para la muestra y referencia
- Sistema de cómputo

El análisis se realiza bajo una atmósfera controlada de nitrógeno o argón para asegurar la estabilidad del análisis.

La curva DSC que genera el analizador representa la variación del flujo de calor entre la muestra y la referencia en función del tiempo o la temperatura y con un programa térmico controlado. Mediante la gráfica, se pueden identificar las transiciones endotérmicas o exotérmicas y reacciones del material. El eje horizontal representa la temperatura o el tiempo y el eje vertical el flujo de calor. [52] [49] [50] [53]

## Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)

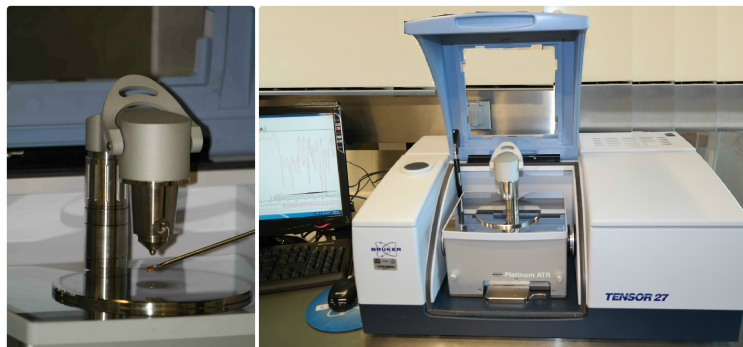


Figura 6. Analizador FTIR

La espectroscopía infrarroja mide la absorción o transmisión de la radiación infrarroja (IR) en un material, en función de la longitud de onda. Es una técnica para analizar cuantitativa y cualitativamente compuestos orgánicos, ya que brinda información acerca de la estructura molecular, enlaces químicos y ambiente químico de un material.

La absorción de IR en un material, generará transiciones entre estados de energía vibracional de una molécula. Cuando una molécula es expuesta a IR, absorbe la energía de la radiación igual a la energía de una transición vibracional de la molécula. Una sola transición de energía vibracional está acompañada por varios estados de energía rotacional, los cuales, todos juntos, forman las bandas de absorción en IR. La longitud de onda de la absorción depende de la masa de los átomos, de la geometría y las fuerzas de unión.

Los grupos de átomos unidos entre sí, absorben IR en una región espectral o en un rango de frecuencias que es característico del grupo. Estas bandas de frecuencia características son útiles para la identificación de grupos funcionales presentes en moléculas más grandes. La presencia de una banda de absorción IR en una región específica indica la presencia de un grupo funcional específico en una molécula. Además brinda información relacionada con la conformación del grupo funcional. El entorno químico del grupo funcional, como la conjugación, enlaces de hidrógeno y la unión de los grupos de electrones, causan cambios en el rango de frecuencia de la absorción del grupo funcional.

Otra de las aplicaciones de la técnica FTIR es para determinar la estructura de compuestos. Existen tablas de absorción característica en frecuencia de grupos funcionales.

Un espectrómetro consta de los siguientes elementos:

- Fuente de radiación electromagnética
- Analizador espectral
- Detector de radiación
- Instrumentación óptica (divisores de haz, espejos)
- Interferómetros o monocromador

Existen distintos tipos de espectrómetros según la interacción de la radiación con la muestra.

- La espectroscopía de transmisión es la medición de la radiación transmitida a través de una muestra absorbente.
- La espectroscopía de reflexión ocurre cuando hay un cambio en el índice de refracción del material. La IR se refleja en la superficie de la muestra.
- La espectroscopía de reflexión atenuada, donde el haz entra a un cristal con alto índice de refracción y rebota internamente tocando la muestra.
- La espectroscopía de reflectancia difusa mide la radiación dispersada a muchas direcciones al rebotar en la muestra. [54] [55]

# Capítulo III. Desarrollo experimental

En este capítulo se describe el desarrollo experimental que se llevó a cabo para la obtención del material compuesto, el hidrogel, cuya aplicación potencial sea material de curación conocido como “apósito”.

## Síntesis de hidrogeles

Para obtener la matriz (blanco) de hidrogel se emplea lo siguiente:

- Agua desionizada
- Alcohol polivinílico (PM 40000 g/mol)

Los parámetros establecidos a evaluar después de una extensa revisión bibliográfica fueron:

- El porcentaje de alcohol polivinílico en solución acuosa
- El número de ciclos de congelamiento-descongelamiento

Las distintas combinaciones se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Composición de hidrogeles

Agua desionizada (ml)	PVOH (g)	Concentración de la solución (%)	Numero de ciclos CD
30	3	10	1
30	4.5	15	1
30	6	20	1
30	3	10	3
30	4.5	15	3
30	6	20	3
30	3	10	5
30	4.5	15	5
30	6	20	5

La metodología específica para la obtención de los hidrogeles consistió en:

1. Pesar la cantidad correspondiente de PVOH en polvo por medio de una balanza analítica
2. Agregar dicha cantidad en agua desionizada (30 ml)
3. Agitación magnética durante 1 hora a una temperatura de 85° C.
4. Una vez obtenida una solución, esta se vierte (10 ml) en moldes circulares de 5 cm de diámetro e iniciar el proceso de ciclos de congelación y descongelación. Un solo ciclo comprende un proceso de congelación de 24 horas, a una temperatura de -15° C y de descongelación de 24 horas a temperatura ambiente. Dando en total de 48 horas de duración.
5. Almacenamiento (a temperatura ambiente) en el mismo molde hasta su uso.

### **Pruebas de hidrogeles**

Con base al estándar británico BS-1372-1-2002 "Test methods for primary wound dressings Part 1: Aspects of absorbency"[56] se realizaron pruebas a las muestras descritas en la tabla 2 para determinar la capacidad de absorción y elegir que combinación de parámetros es la óptima. Del estándar británico, se tomaron 4 puntos a evaluar. Siendo estos 4 puntos requisitos importantes que deber cumplir un material de curación.

Para estos puntos, se utiliza una solución que pretende simular al suero humano (solución A), la cual se prepara con 8.298 g de NaCl y 0.368 g de  $CaCl_2$  para 1 litro de solución acuosa en un matraz aforado. De igual modo, se trabaja con una solución de referencia preparada por 5g/l de  $CaCl_2$  en agua desionizada.

#### **1. Capacidad libre de absorción (hinchamiento)**

Por medio de este punto se evaluará el grado de hinchamiento de las muestras. La prueba está destinada a evaluar el rendimiento de los apósitos, que normalmente se utilizan en heridas con exudado moderado a intenso, donde la capacidad de absorción total es una característica importante. Esto permite diseñar un material que se mantenga en su lugar por periodos prolongados, sin necesidad de ser cambiado frecuentemente y manteniendo la herida en condiciones óptimas.

El procedimiento es:

1. Una muestra de 0.1 g es sumergida en la solución A, a una temperatura de 37° C, durante 30 minutos.
2. La muestra es retirada y secada durante 30 segundos.
3. Se registra el peso nuevamente.

El procedimiento se repite 9 veces. Los resultados serán la capacidad de absorción expresada como la masa media de solución retenida por 100  $cm^2$ .

## **2. Características gelificantes (punto de gel)**

Por medio de esta prueba, se evaluará el punto de gel de las muestras. Esta prueba está diseñada para verificar si los apósitos gelifican o no. El conocimiento sobre la tasa de gelificación ayuda a seleccionar el apósito más apropiado para diferentes tipos de heridas en particular.

El procedimiento es:

1. Rallar una muestra hasta obtener 0.2 g
2. Colocarla en un matraz cónico
3. Añadir 20 ml de solución A y agitar durante 60 segundos para permitir la gelificación
4. Filtrar a vacío y transferir a otro matraz cónico.

Este proceso se repite una vez más, reteniendo el residuo final en un papel de filtro. Finalmente, se repiten los pasos mencionados, utilizando una solución de referencia en lugar de la solución A, con el objetivo de producir un residuo no gelificado para comparación.

Al final, se observan los residuos del procedimiento: si la muestra está gelificada o no gelificada, lo que es evidente en comparación con la muestra de referencia no gelificada.

## **3. Características de dispersión**

Esta prueba está diseñada para distinguir entre los apósitos que se dispersan o no cuando se agitan suavemente en exceso de líquido. La prueba es útil para evaluar el rendimiento de los apósitos, que normalmente se utilizan en heridas con exudado moderado a intenso, en las que normalmente se produce una saturación total del apósito. Distinguirá entre los apósitos que pierden fácilmente la integridad y se dispersan y los que permanecen intactos

La prueba consiste en:

1. Una muestra de 5 cm x 5 cm, se introduce en un matraz con 500 ml de solución A
2. Agitar sin provocar vórtice durante 60 segundos
3. Inspeccionar visualmente el contenido del matraz. La separación de la estructura original indica dispersión.

#### **4. Solubilidad o dispersión**

Esta prueba sirve para determinar si la muestra solubiliza en exceso de líquido o si solo dispersa. El procedimiento es:

1. En un vaso añadir 20 ml de solución A y 1.5 g de muestra
2. Agitar durante 2 minutos para permitir la dispersión o disolución de la muestra
3. Dejar reposar durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Inspeccionar visualmente el contenido

Si la muestra se disuelve, se describe como soluble. Si permanece en 2 fases distintas o se dispersa y luego se asienta para formar 2 capas distintas, se describe como dispersa. Si la muestra conserva su estructura, se describe como no dispersable.

#### **Porcentaje de hinchamiento**

La prueba se realizó con un blanco y un composito cada uno de 4 cm de diámetro. Se pesó inicialmente y se sumergió en 10 mm de agua desionizada. Posteriormente la muestra fue pesada cada hora por 10 horas. Se dejó sumergir 8 horas continuas y a partir de ahí fue pesada nuevamente cada hora por 10 horas más.

#### **Técnicas de caracterización**

Las técnicas de caracterización se realizaron con un blanco y un composito.

### **Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía de dispersión de energía (EDS)**

El análisis se realizó utilizando un microscopio marca: JEOL modelo: JSM-6510LV, con un voltaje de aceleración de 15 kV. El detector de EDS es un Bruker XFlash 6-30. Debido a la naturaleza de las muestras, estas requirieron un recubrimiento de platino. Las imágenes fueron adquiridas a diferentes aumentos para obtener la información necesaria en la investigación.

### **Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)**

El análisis se realizó en un espectrómetro marca: Bruker, Modelo TENSOR 27 con una fuente MIR y con el accesorio de ATR modelo Platinum ATR, Bruker con cristal de diamante.

El espectro fue adquirido en un intervalo de 4000 a 550  $cm^{-1}$ , con una resolución de 4  $cm^{-1}$ , y 64 barridos.

Las muestras no requirieron algún tratamiento especial previo al análisis.

### **Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X**

El análisis se realizó en un analizador modelo JEOL JPS-9200 con fuente estándar de Aluminio y Magnesio, fuente monocromática de Aluminio, fuente de iones Argón para erosionado superficial iónico.

Las muestras no requirieron algún tratamiento especial previo al análisis.

### **Análisis térmicos**

Los análisis térmicos se realizaron en un analizador simultáneo PerkinElmer modelo STA 8000, operando bajo atmósfera controlada de nitrógeno. Las muestras fueron sometidas a un programa de calentamiento lineal a una velocidad de 20° C/min desde temperatura ambiente hasta 650° C.

Las muestras no requirieron algún tratamiento especial previo al análisis.

### **Pruebas microbiológicas**

## **Método Kirby-Brauer**

El método Kirby-Brauer es un procedimiento estándar para la evaluación de la sensibilidad antimicrobiana de fármacos o sustancias.

Se emplearon dos cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* una bacteria Grampositiva y Gramnegativa, respectivamente. Estas bacterias fueron propagadas en el medio de cultivo sólido agar Mueller-Hinton, el cual es utilizado en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana debido a su capacidad para permitir un crecimiento bacteriano óptimo y uniforme, garantizando la fiabilidad de los resultados obtenidos en los ensayos de difusión.

Para la realización de las pruebas, se emplearon los estándares de McFarland, que son soluciones de referencia utilizadas para ajustar la concentración bacteriana en la placa de cultivo. Estas soluciones permiten garantizar que las bacterias inoculadas en la placa tengan una densidad uniforme. Los ensayos se realizaron por triplicado, para asegurar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en cada prueba.

El procedimiento consistió en:

1. Preparar el cultivo bacteriano. Se inocula una placa de agar Mueller-Hinton con una suspensión de bacterias, se ajusta la turbidez al estándar 0.5 McFarland.
2. Colocar sensidiscos en la placa. Los discos se impregnan con el material y se colocan en la superficie del agar, asegurando buen contacto.
3. Incubar la placa. La placa se incuba a 36.5° C durante 18-24 horas para permitir el crecimiento bacteriano.
4. Retirar, observar y medir los halos de inhibición obtenidos.

Esos ensayos se realizaron con las soluciones del blanco y del composito antes de ser sometidos a los ciclos de congelación y descongelación.

## **Ensayo de microdilución**

El ensayo de microdilución es un procedimiento para determinar la concentración media inhibitoria de un material en un cultivo bacteriano. Se observa si el material provoca la inhibición del crecimiento bacteriano.

Se realizó con las mismas 2 bacterias mencionadas previamente. El procedimiento consiste en:

1. Preparar diluciones en caldo Muller-Hinton de las bacterias a experimentar y se vierten sobre la placa de microdilución.
2. Agregar concentraciones conocidas seriadas del material a la placa.
3. Incubación de la placa por un periodo de 18-24 horas a temperatura de 37° C aproximadamente para permitir el crecimiento o inhibición bacteriana.
4. Cuantificar el crecimiento bacteriano mediante la medición de la absorbancia a 570 nm.

Esos ensayos se realizaron con las soluciones del blanco y del composito antes de ser sometidos a los ciclos de congelación y descongelación.

# Capítulo IV. Resultados y Discusión

## Síntesis de hidrogeles

De acuerdo con la metodología establecida y descrita previamente, se obtuvieron las siguientes muestras.

Se trabajó con concentraciones en peso del 10%, 15% y 20% de PVOH en un volumen de agua desionizada. Con las 3 concentraciones, se logró crear una solución homogénea y preparada para la siguiente etapa de la síntesis, los ciclos de congelación y descongelación. Este es un método físico con gran interés en la investigación para obtener hidrogeles de PVOH ya que no se necesita un agente entrecruzante, que algunas veces pueden ser tóxicos [26]. El cambio en la consistencia de la solución, de líquida a una estructura sólida y flexible, después de los ciclos de congelación y descongelación confirmó que se lograron formar los hidrogeles. Sin embargo, un ciclo de congelación-descongelación no fue efectivo. En lugar de obtener una estructura sólida, la mezcla permaneció en un estado líquido-gelatinoso. Debido a esto, dichas soluciones fueron descartadas desde las etapas iniciales del proceso. (Figura 7)

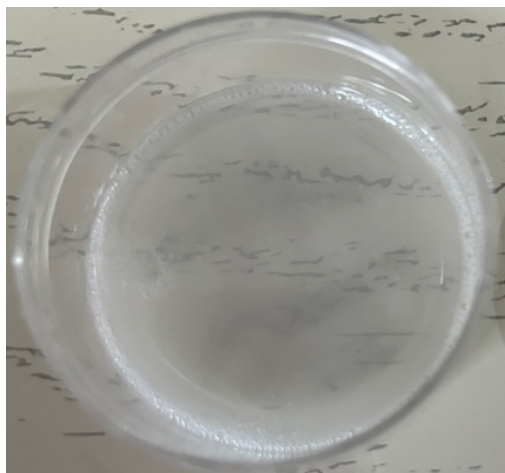


Figura 7. Muestras varias concentraciones de PVOH con 1 ciclo CD

Para las soluciones de PVOH con concentraciones del 10 %, 15 % y 20 %, sometidas a 3 y 5 ciclos de congelación-descongelación, se lograron obtener las estructuras sólidas esperadas, como se muestra en las figuras 8 y 9.



Figura 8. Muestra 3 ciclos CD con concentración: a) PVOH 10% CD b) PVOH 15% c) PVOH 20%

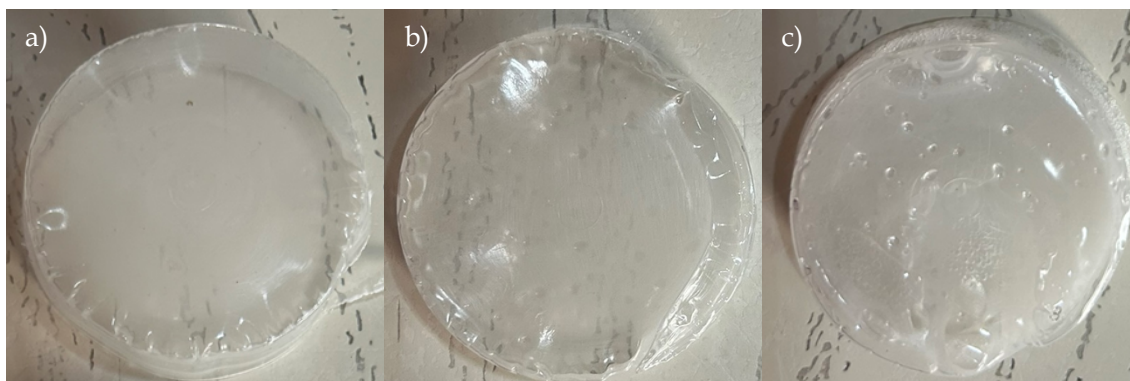


Figura 9. Muestra 5 ciclos CD con concentración a) PVOH 10% b) PVOH 15% c) PVOH 20%

Las propiedades de un hidrogel cambian en función del número de ciclos de congelación y descongelación a los que sean sometidos durante la síntesis [57]. Esto se puede atribuir a la presencia de zonas cristalinas de mayor tamaño que contribuyen a la resistencia y estructura de la red a medida que aumenta el número de ciclos de congelación y descongelación [58]. En los ciclos de congelación y descongelación, la separación de fases del agua y la unión de las cadenas del polímero son claves para el proceso de gelificación [12].

Durante la congelación, se forman cristales de hielo, separándose del PVOH promoviendo una separación de fases [26]. En esta etapa, los cristales de hielo formados, empujan a las cadenas del PVOH juntándolas unas con otras, formando una fase rica en polímero separada del agua [59]. Los cristales actúan como enlaces físicos entrecruzados y estabilizan la estructura del hidrogel [57]. A medida que aumentan los ciclos, estas regiones ricas en polímero, son enriquecidas con más cadenas y mayor cercanía entre ellas, lo que le da al

hidrogel mayor estructura en la red mediante un mayor número de puentes de hidrógeno [12]. Estas interacciones del polímero permiten o facilitan la creación de puentes de hidrógeno y la cristalización, lo que constituye las uniones físicas de la estructura [60]. El movimiento de las cadenas para juntarse, es un proceso lento por lo que una mayor cantidad de ciclos permitirá que un mayor número de cadenas se junten e interactúen [61]. Las zonas de cristales de hielo se derriten durante la descongelación, y se mantienen rodeando la estructura de PVOH o atrapados entre ella [28]. Se ha demostrado que existe un mayor grado de entrecruzamiento físico y un mayor nivel de cristalinidad en la estructura asociado con el aumento en los ciclos de congelación-descongelación [62] La repetición de los ciclos de congelación y descongelación lleva al hidrogel a contener una cantidad cada vez mayor de PVOH en la estructura de red y permite una formación de geles más fuertes [60].

En conclusión, el número de ciclos de congelación y descongelación fue el factor determinante para la formación de los hidrogeles. Este proceso físico permitió la transformación de las soluciones líquidas en materiales con consistencia sólida, lo que indica que se formó una red tridimensional interna con forma con capacidad para retener líquidos. El proceso con un solo ciclo de congelación y descongelación fue descartado ya que no generó el hidrogel deseado, lo que sugiere que no fue suficiente el tiempo para formar la estructura.

En cuanto a las concentraciones de PVOH en cada una de las soluciones, una de las características observadas fue la apariencia visual de los hidrogeles. Al compararlos visualmente se observaron diferencias en cuanto a la transparencia. Se pudo observar que a menor concentración de PVOH (10%) los hidrogeles presentaban mayor transparencia. Esto se puede atribuir a una menor rigidez en la estructura, con menor interacción de cadenas poliméricas lo que facilita el paso de la luz a través del hidrogel. En comparación con el hidrogel con concentración de 20% de PVOH, el cual presenta un color blanco y opaco. Esta apariencia, se asocia a mayor densidad de cadenas poliméricas en la estructura del hidrogel.

### **Pruebas de hidrogeles**

Las pruebas que se realizaron con base al estándar británico BS-1372-1:2002 [56] , se obtuvieron los siguientes resultados.

### **Capacidad libre de absorción (hinchamiento)**

En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos en la prueba. Estos se expresan como la masa promedio de solución retenida por  $100 \text{ cm}^2$ .

Tabla 3. Resultados capacidad libre de absorción

Ciclos CD	Concentración PVOH (%)	$\text{g}/100 \text{ cm}^2$
3	10	15.51
3	15	21.77
3	20	19.54
5	10	14.79
5	15	21.46
5	20	20.79

Un apósito de hidrogel debe tener la capacidad de absorción, ya que así se garantiza un entorno equilibrado y húmedo y se promueve la proliferación celular, lo que facilita el proceso de curación [63]. La capacidad libre de absorción se expresa como la masa promedio de solución retenida por  $100 \text{ cm}^2$ . Los valores establecidos para apósitos comerciales se encuentran en intervalos de  $15\text{-}20 \text{ g}/100\text{cm}^2$  [64].

Los resultados obtenidos en esta primera prueba se encuentran dentro del intervalo reportado en la literatura, lo que sugiere que, en general, cualquiera de las combinaciones de concentración y ciclos está funcionando de manera adecuada, en cuanto a absorción.

La presencia de los grupos hidrofílicos (-OH) es lo que permite a los hidrogeles interactuar con las moléculas de agua [65]. Un apósito debe permitir la absorción del exudado de la herida, evitando el exceso de humedad para no provocar una maceración y al mismo tiempo la zona herida no debería permanecer demasiado seca, ya que se puede retrasar el proceso de cicatrización y regeneración del tejido [66]. La capacidad de absorción en un hidrogel, al entrar en contacto con agua, les permite absorber eficazmente el exudado de la superficie de una herida, mientras mantienen también un ambiente húmedo para favorecer el proceso de cicatrización [67]. Un entorno húmedo en la zona herida, acelera el proceso de cicatrización de 3 a 5 veces, aumenta la actividad de las células y enzimas, facilita la división de células cutáneas y es benéfico para la formación del tejido de granulación, promoviendo así este proceso [65]. De igual modo, esta absorción también le brinda a los hidrogeles la capacidad de mantener limpia la zona herida [68].

### **Características gelificantes (punto de gel)**

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos. Estos se expresan como la muestra gelificó (en comparación con la referencia no gelificada) o no. Además, se agrega la comparación del peso con respecto a la referencia, debido a la absorción.

Tabla 4. Resultados características gelificantes (punto de gel)

Ciclos CD	Concentración PVOH (%)	Resultado	Peso (%)
3	10	NO	27.49
3	15	NO	-48.39
3	20	NO	65.48
5	10	NO	-47.69
5	15	NO	135.11
5	20	NO	-69.21

Las características gelificantes se reportan con una comparación observada de la muestra con la referencia, la cual no gelifica. Por lo que, de acuerdo con las observaciones, ninguna de las muestras gelificó y no se observan diferencias notables entre ambas. Además, se agrega un parámetro de peso, previo y posterior a la prueba, para compararlos.

Según la literatura consultada, para aplicaciones de curación de heridas, un apósito de hidrogel debería comenzar a gelificar después de 30 segundos de estar en contacto con líquido, para favorecer la adhesión superficial y facilitar su aplicación [69]. De acuerdo con esto y con la prueba, todas las muestras cumplieron el tiempo establecido, ya que ninguna de ellas gelificó durante el periodo de prueba de 30 segundos.

### **Características de dispersión**

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos que son la inspección visual de la muestra, si ésta dispersa o conserva la estructura.

Tabla 5. Características de dispersión

Ciclos CD	Concentracion PVOH (%)	Observación
3	10	No dispersa, conserva estructura
3	15	No dispersa, conserva estructura
3	20	No dispersa, conserva estructura
5	10	No dispersa, conserva estructura
5	15	No dispersa, conserva estructura
5	20	No dispersa, conserva estructura

Esta prueba busca someter a saturación el hidrogel para observar su comportamiento, si conserva la estructura o se dispersa. La capacidad de un hidrogel para absorber grandes cantidades de líquido sin disolverse es de las características más importantes y de mayor interés en este tipo de materiales [70]. Esto se establece desde la definición de hidrogel, la cual lo define como un material polimérico que tiene la habilidad de hincharse y retener una parte importante de agua en su estructura sin disolverse [71]. Además, la estabilidad del apósito, al no dispersarse instantáneamente, proporciona una barrera física efectiva que protege la herida, reduciendo el riesgo de daños adicionales como infecciones o heridas secundarias.

### **Solubilidad o dispersión**

En la tabla 6, se muestran los resultados obtenidos. Estos se reportan por la observación de la muestra final. Si la muestra se disuelve, se reporta como soluble; si permanece en 2 fases, como dispersable; y si conserva su estructura como no dispersable.

Tabla 6. Solubilidad o dispersión

Ciclos CD	Concentración PVOH (%)	Observación
3	10	Dispersable
3	15	Dispersable
3	20	Dispersable
5	10	Dispersable
5	15	Dispersable
5	20	No dispersable

En relación a las pruebas de solubilidad y dispersión, ninguna de las muestras analizadas mostró solubilidad en la solución de referencia. Esto representa múltiples ventajas en la aplicación final del apósito. La diferencia de este apartado de la norma [56] y el anterior 3.6, está en el periodo de exposición dentro de la solución. Mientras que en el punto anterior, características de dispersión, se evalúa la respuesta inmediata a una saturación de hinchamiento para inspeccionar su integridad física; en esta sección, se busca llevar al hidrogel también a una saturación pero en un periodo mayor (2 horas). De esta manera, se podrá evaluar la integridad después del tiempo establecido. La capacidad del apósito para mantener la humedad es importante en el proceso de cicatrización. Un ambiente húmedo favorece la regeneración celular y acelera la curación, mientras que al mismo tiempo protege la herida de contaminación externa. Esto brindaría menor probabilidad de infecciones y una recuperación más eficiente. Otro aspecto a considerar es la facilidad en el manejo y aplicación del apósito. La consistencia del material permitirá una manipulación más sencilla, lo que facilita su colocación y cambio. Así se podría minimizar el dolor y las molestias para el paciente al retirar o reemplazar el apósito. Los apósitos deben ser capaces de mantener una integridad suficiente para evitar el dolor a la hora de ser removidos [72].

Por lo que se concluye que cualquiera de las muestras es adecuada para continuar con las pruebas. Sin embargo, para optimizar recursos y avanzar de manera eficiente en el proceso, se optó por continuar con la muestra de 15% concentración de PVOH.

A estas muestras (15% concentración de PVOH), se le agregaron los demás componentes, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 7. Composición de muestras

Muestra	A	B	C
PVOH (g)	9.5	9.1	8.7
Extracto de <i>camellia sinensis</i> (g)	0.1	0.3	0.5
Extracto de <i>Calendula officinalis</i> (g)	0.1	0.3	0.5
Nanoparticulas de ZnO (g)	0.3	0.3	0.3

Posteriormente, se sometieron a 3 y a 5 ciclos de congelación y descongelación. Las muestras que estuvieron en 3 ciclos CD, no consiguieron la estructura deseada. Esto podría deberse al aumento de elementos en estado líquido que dificulta la organización y la interacción de las cadenas poliméricas durante el proceso. Con las muestras sometidas a 5 ciclos CD, si se formaron las estructuras buscadas. Estas se observan en las imágenes de la figura 10.

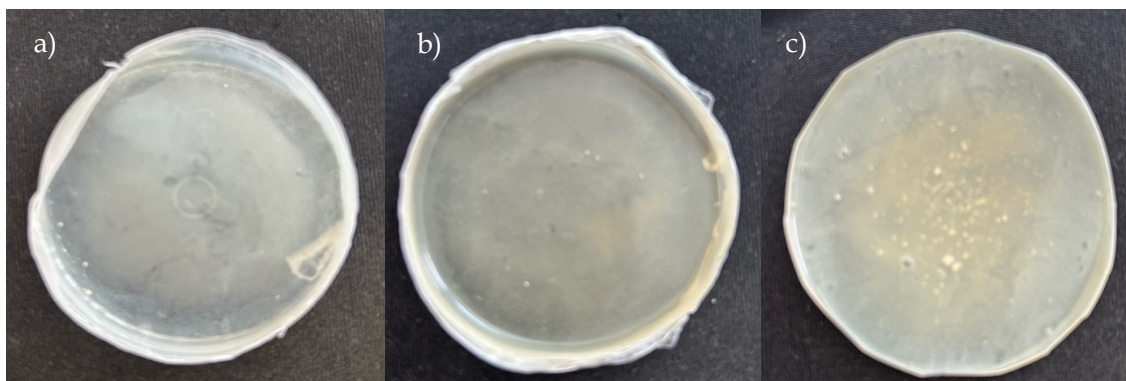


Figura 10. a) Composito A b) Composito B c) Composito C

A estas 3 muestras compuestas, se les realizaron las pruebas del estándar británico obteniendo los siguientes resultados para la capacidad libre de absorción:

Tabla 8. Capacidad libre de absorción

Composito	Capacidad libre de absorción ( $g/100cm^2$ )
A	15.26
B	15.87
C	15.82

Al obtener valores similares entre las 3 muestras, el composito C (con composición 8.7 g de PVOH, 0.3 g de nanopartículas de óxido de zinc, 0.5 g de extracto de *Calendula officinalis* y 0.5 g de extracto de *camellia sinensis*) es seleccionado para continuar con las otras 3 pruebas pertenecientes al estándar británico, debido a que contiene la mayor cantidad de extractos naturales, lo que podría significar una ventaja en las siguientes etapas del proceso. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados

Composito	Caract. Gelificantes (punto de gel)	Caract. de dispersión	Solubilidad de dispersión
C	No gelifica	No dispersable	Dispersable

Al obtener resultados dentro de lo esperado, se decidió que el composito C, será analizada por las técnicas de caracterización descritas previamente y con ella también se realizaran las pruebas microbiológicas igualmente descritas.

### Porcentaje de hinchamiento

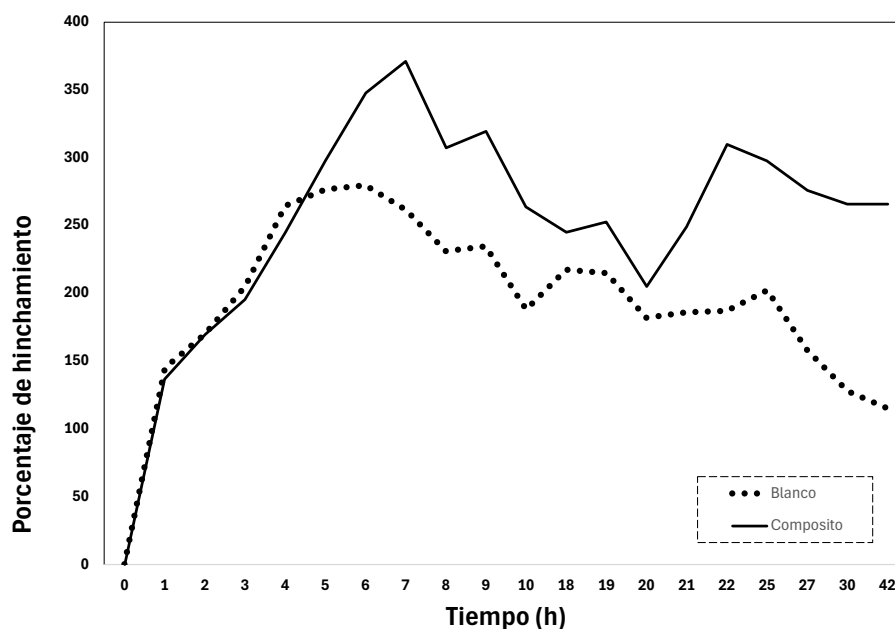


Figura 11. Porcentaje de hinchamiento

En la figura 11 se observa el comportamiento de hinchamiento (swelling) del blanco (PVOH) de color azul y del composito (PVOH + nanopartículas de ZnO + extracto de *Calendula officinalis* + extracto de *Camellia sinensis*) de color naranja. En las 2 gráficas se observa un comportamiento similar, alcanzando un máximo de hinchamiento de 250% para el blanco y 360% para el composito, para despues disminuir y tener un ligero aumento posterior. El blanco alcanzó el máximo de hinchamiento aproximadamente 4 horas después de la sumerción, mientras que el composito 7 horas despues, a lo que sigue un decaimiento en la absorción. En el blanco, las cadenas polimericas del PVOH se encuentran en una estructura compacta y rígida, el agua provoca que las cadenas entren en un estado de relajación [73] se expanden y estiran, lo que provoca un aumento en el tamaño del hidrogel y el ingreso de agua entre ellas. En el blanco las cadenas se encuentran en un estado de mayor rigidez en comparacion con el composito, ya que en el se agregaron los extractos y las nanopartículas en fase líquida. Estos componentes ya provocaron una relajación en las cadenas al integrarse con ellas, por lo tanto los poros y el espacio entre ellas ha aumentado, lo que representa un mayor espacio para que el agua, en la que se está sumergiendo el hidrogel, ingrese a este y debido a esto se observa un mayor hinchamiento en el composito en comparación con el blanco. Además de acuerdo a diferentes estudios, a mayor concentración de PVOH en un hidrogel, menor sera el índice de hinchamiento debido a una mayor cantidad de enlaces cruzados y menor espacio para el ingreso de agua a la estructura [26]. Con base a esto, el blanco tiene una mayor concentración de PVOH. También con el aumento de la densidad de enlaces cruzados, se dispone de un espacio limitado para que el agua entre en los espacios vacíos de la red de enlaces cruzados [74]. En el composito, se tienen menos enlaces cruzados entre las cadenas del polímero, pues estas están separadas por interacciones con las biomoléculas añadidas, esto aumenta el tamaño de la estructura del composito, lo que resulta en mayor hinchamiento.

Si bien no existen estándares oficiales para medir el porcentaje de hinchamiento que debería tener un aposito de hidrogel, en la tabla 10 se muestra lo encontrado en la literatura respecto a estos valores.

Tabla 10. Referencias absorción de hidrogeles

Autor	Material del hidrogel	Porcentaje de hinchamiento	Aplicación	Año	Referencia
-------	-----------------------	----------------------------	------------	-----	------------

Mohamed A., et al	PVOH	150%	Curación de heridas	2022	[75]
Quispe-Siccha R., et al	PVOH	90-150%	Liberación de medicamento	2024	[76]
Li X., et al	PVOH/PU/Ag	100-350%	Curación de heridas	2017	[77]
Tamahkar Irmak E., et al	PVOH/PEI/Glu	220-321%	Curación de heridas	2023	[78]
Mandru M., et al	PU/PVOH	600%	Liberación de medicamento	2019	[79]
Shahrousvand M., et al	PAA/PVP/ZnO	400-1000%	Curación de heridas	2023	[80]
Liang Y., et al	HA-DA-rGO	300%	Curación de heridas	2019	[81]
Feng W., et al	Varios	>150%	Regeneración de tejidos	2023	[82]

Los valores obtenidos en la prueba coinciden y se encuentran dentro de los intervalos recabados de la literatura. Con esto, se puede concluir que en cuestión de absorción e hinchamiento, el composito tiene potencial para ser utilizado como apósito.

## Técnicas de caracterización

### Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS)

En la figura 12 y 13 se muestran los resultados del espectro survey del blanco y del composito respectivamente.

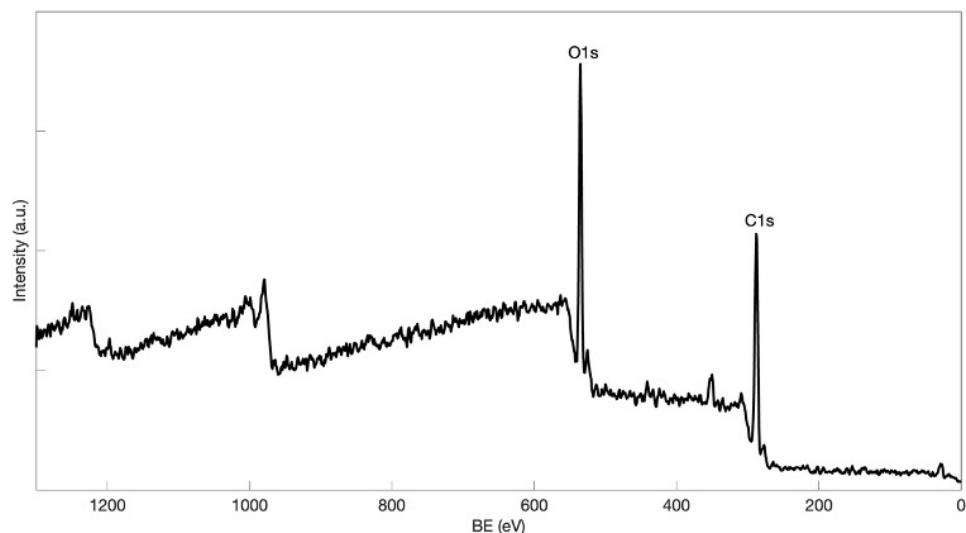


Figura 12. Espectro XPS blanco

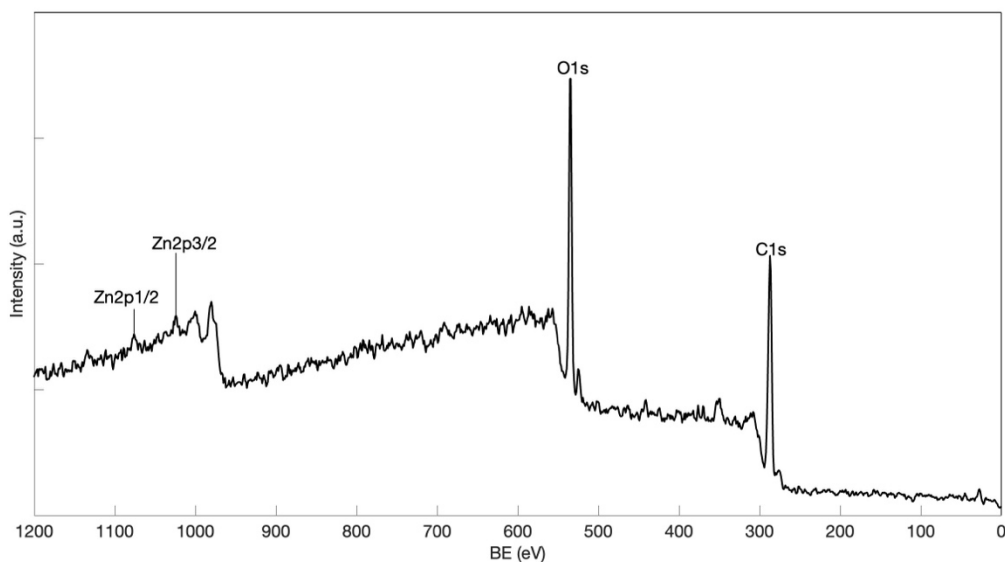


Figura 13. Espectro XPS composito

Se puede observar la aparición de señales características de la composición del PVOH, cuya estructura está compuesta por los elementos carbono, hidrógeno y oxígeno, estos conforman la base molecular del PVOH, aunque por el principio físico de la técnica solo es posible

identificar al carbono y al oxígeno, que aparecen en regiones de 287 eV para el C1s y de 529 a 534 para el O1s. Por otro lado, en el espectro del composito, se aprecian los mismos elementos C y O, que corresponden a los componentes de los extractos añadidos al PVOH, estos aparecen en las mismas regiones ya mencionadas. Adicionalmente, se observan picos adicionales que corresponden a las regiones características de Zn, alrededor de 1021 eV para Zn 2p, dado que la única fuente posible de zinc en el compuesto proviene de la adición de las nanopartículas de ZnO, esto sugiere la presencia del enlace O-Zn en las nanopartículas, y se sustenta con el análisis específicos de la región O1s mas adelante.

En las siguientes figuras se muestra la deconvolución de los picos del blanco. El espectro C1s se devonvolucionó en 5 señales (Figura 14). La primera señal en 283.782 ev se asocia al carbono de la cadena lineal C-C, la de 284.545 ev está asociada al carbono contiguo al carbono que está unido al grupo hidroxilo C-C-OH, la siguiente en 285.548 ev al carbono contiguo al carbono unido con doble ligadura de oxígeno, que proviene de los grupos residuales del acetato de polivinilo que no se transformaron en grupos alcohol C-C=O. La cuarta señal en 286.448 ev al carbono unido al hidroxilo C-OH y la última señal identificada en 287.675 ev se asocia al carbono unido con doble ligadura a oxígeno C=O.

En la Figura 15, se observa la deconvolución del espectro O1s, en 3 señales. La primera señal en 531.799 ev se asocia a los grupos C-OH, la segunda en 532.833 ev a los grupos C=O y la última en 533.666 se puede asociar a la interaccion de puentes de hidrógeno O:H entre las cadenas del polímero.

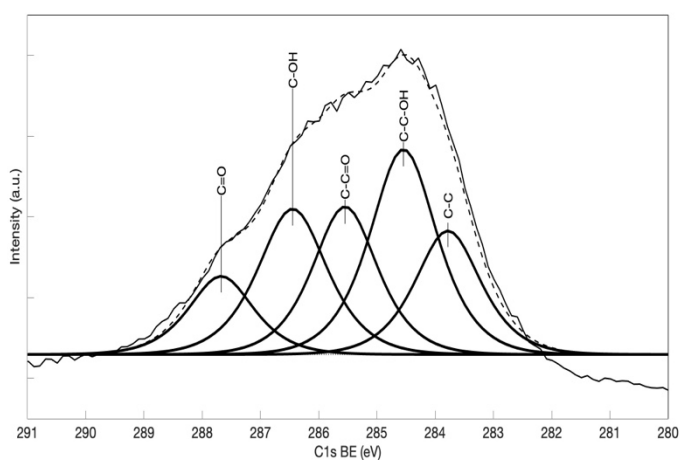


Figura 14. Análisis de enlace C1s blanco

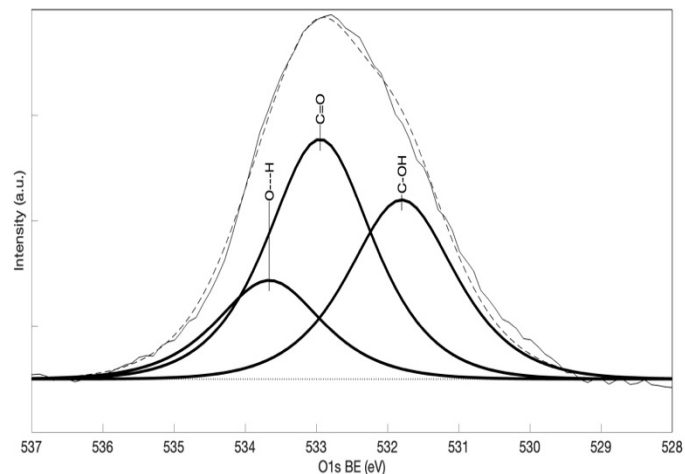


Figura 15. Análisis de enlace O1s blanco

En las siguientes figuras se muestra la deconvolución de los picos del compuesto:

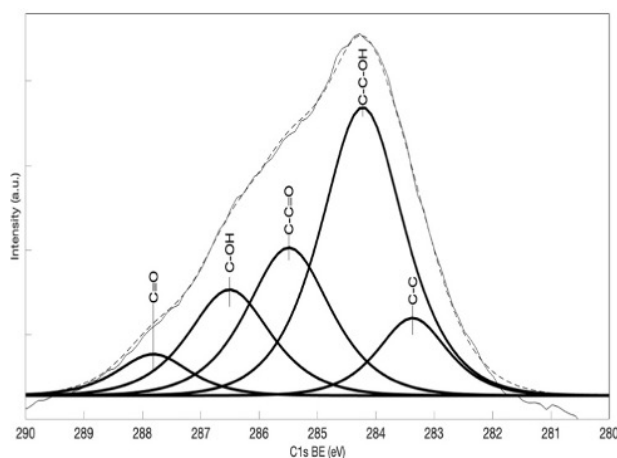


Figura 16. Análisis de enlace C1s compuesto

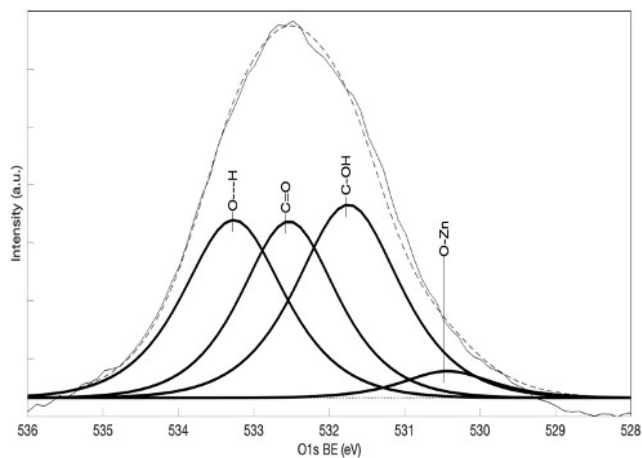


Figura 17. Análisis de enlace O1s compuesto

En las figuras 16 y 17 se observan los espectros deconvolucionados C1s y O1s del compuesto. En la región del C1s se observan las mismas 5 señales que en el blanco. El extracto de *Camellia sinensis* está compuesto por polifenoles, y dentro de ellos los principales son los flavonoides, los cuales poseen propiedades antioxidantes y los grupos catequinas [83], entre otros. En la figura 18 se muestra la estructura de los principales flavonoides y de las catequinas de *Camelia sinensis*. El extracto de *Calendula officinalis* está compuesto principalmente por distintos polifenoles como saponoides, triterpenoides, flavonoides y carotenoides, entre otros [84]. En la figura 19, se observa la estructura química de los triterpenoides y algunos flavonoides.

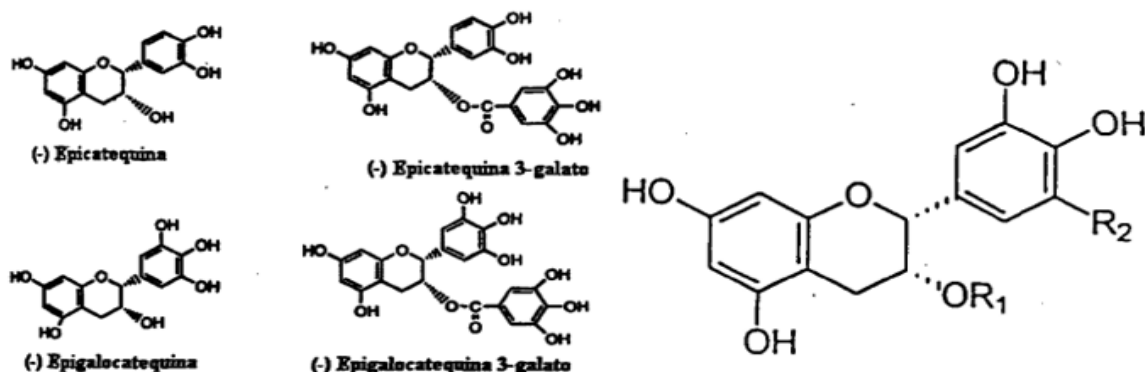


Figura 18. Estructura química de los polifenoles y catequinas del extracto de *Camelia sinensis* [83] [98]

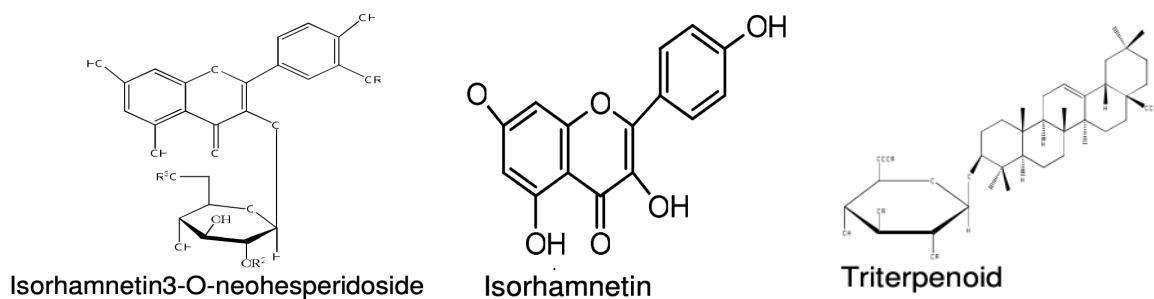


Figura 19. Estructura química de algunos flavonoides y terpenoides componentes del extracto de *Calendula officinalis* [99]

Como se observa en las figuras 18 y 19, los componentes de los extractos de *Camelia sinensis* y *Calendula officinalis* están compuestos principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno. Los polifenoles están compuestos por múltiples grupos fenólicos, anillos de benceno con grupos -OH, lo que les da estructura y propiedades antioxidantes, igual que los saponoides. Los triterpenoides contienen en su estructura átomos de carbono y grupos funcionales con hidroxilos (-OH) o cetonas (C=O). Los flavonoides están formados por una estructura de carbono, anillos bencénicos y grupos hidroxilo. Los carotenoides son una estructura de carbono con enlaces dobles, y algunos contienen también grupos hidroxilo o cetonas. La distribución y forma de estos elementos junto con la interacción con la estructura del PVOH, es por lo que en ambos espectros deconvolucionados se observan las mismas señales pues el ambiente químico de los átomos de carbono es esencialmente el mismo. Sin embargo se observan los cambios en intensidad en los espectros al alterarse la proporción de ciertos grupos con respecto al blanco, dichos cambios sustentan la incorporación de los extractos en el material compuesto.

La diferencia entre los espectros deconvolucionados del blanco y el compuesto, para la región del O1s, se observa en una cuarta señal obtenida (Figura 17). Esta se encuentra en 530.432 eV, la cual se asocia a las interacciones O-Zn [85]. De acuerdo a la composición del compuesto, las nanopartículas de ZnO se encuentran en una proporción de 3% en peso (Tabla 7). Un analizador XPS tiene una sensibilidad en la superficie de 0.5 a 2 nm y un límite de detección de 1% [86]. Es por eso que la intensidad de la señal O-ZnO es baja en comparación con los otros componentes de la muestra.

## Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía por dispersión de energía (EDS)

Para obtener imágenes de la superficie del blanco y del compuesto, se realizó un estudio por SEM. Con esta técnica se logró observar la morfología y topografía. Ésta se complementó con un análisis EDS para conocer la distribución de los componentes en el compuesto, en comparación con el blanco.

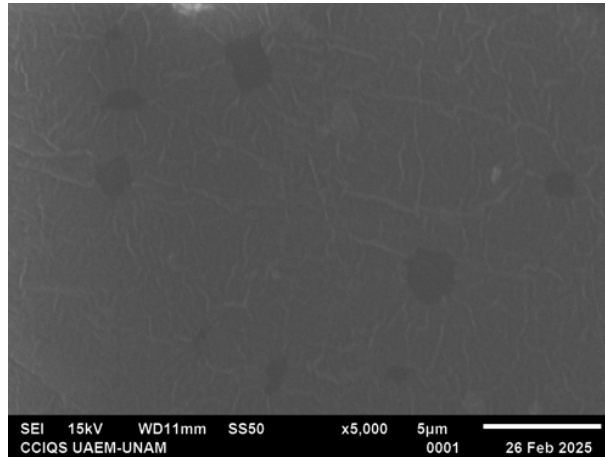


Figura 20. Micrografía SEM blanco

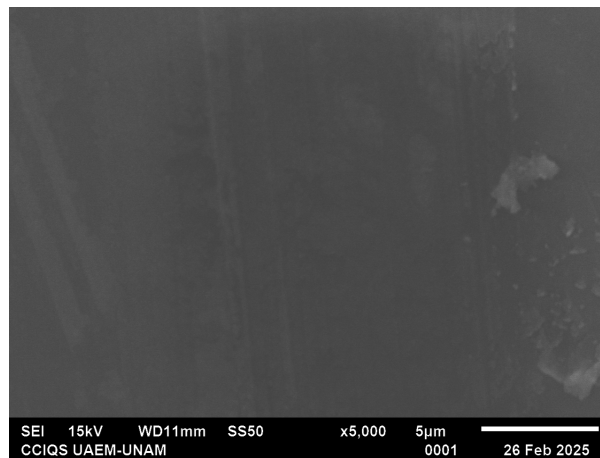


Figura 21. Micrografía SEM compuesto

En las figuras 20 y 21 se presentan las micrografías obtenidas mediante SEM correspondientes al blanco y al compuesto. Al realizar una comparación entre ambas imágenes, se observa que no existen diferencias significativas en la morfología superficial de las muestras. La topografía se mantiene homogénea y continua en las 2, no hay presencia

de irregularidades, agrietamientos, acumulaciones o cambios en general que se pueda relacionar con los elementos añadidos en el composito.

Esto sugiere que, a pesar de la modificación en la composición del composito, la incorporación de nuevos elementos no generó alteraciones visibles en la estructura superficial. Los elementos se incorporaron a la matriz del PVOH sin provocar la formación de compuestos diferentes morfológicamente.

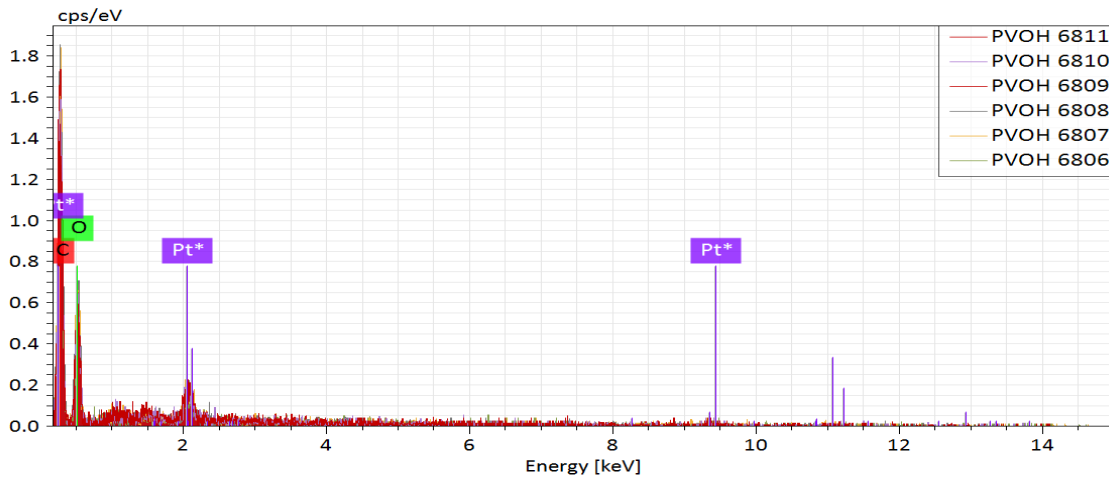


Figura 22. Análisis EDS blanco

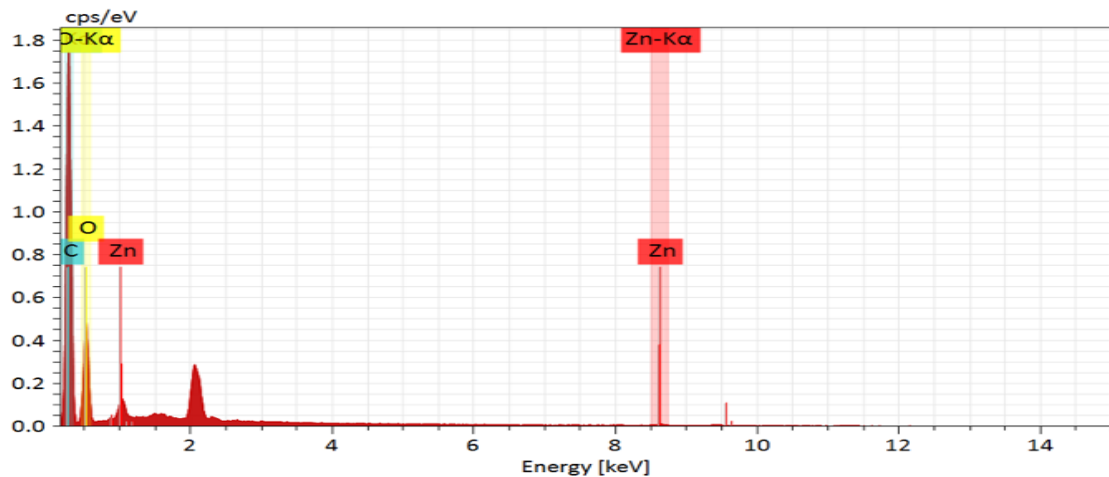


Figura 23. Análisis EDS composito

Para evaluar la composición elemental del blanco y del composito, y para evaluar si la distribución de nps de ZnO es uniforme en todo el material compuesto, se realizó el análisis EDS, acoplado al SEM para obtener información de los elementos presentes en cada una. En el composito, se identificó adicionalmente a los componentes del PVOH, de los extractos (C

y O) y el Zn de las nanopartículas. Los picos que se observan en los espectros corresponden a C en 0.282 keV, O en 0.523 keV y Zn en 8.631 keV.

En la tabla 11, se presentan los elementos detectados en el compuesto y su proporción estimada.

Tabla 11. Composición elemental por EDS del compuesto

Elemento	No. Atómico	Masa (%)	Masa Norm (%)	Atom (%)	Error abs. (%) (1 sigma)	Error rel. (%) (1 sigma)
C	6	59.17	59.17	66.51	2.58	4.36
O	8	39.30	39.30	33.17	1.92	4.88
Zn	30	1.53	1.53	0.32	0.06	4.13
	Sum	100.00	100.00	100.00		

Se realizó también el mapeo elemental del compuesto, figura 24. en el cual se puede observar la distribución espacial de los elementos presentes en él. Cada color corresponde a un elemento, identificado en la parte inferior de la imagen, lo que nos permite observar la dispersión de ellos. Con esto se pueden complementar los análisis cuantitativos del espectro, e interpretar visualmente la reacción entre la composición del PVOH y la integración de los componentes de los extractos y del Zn presente en las nanopartículas.

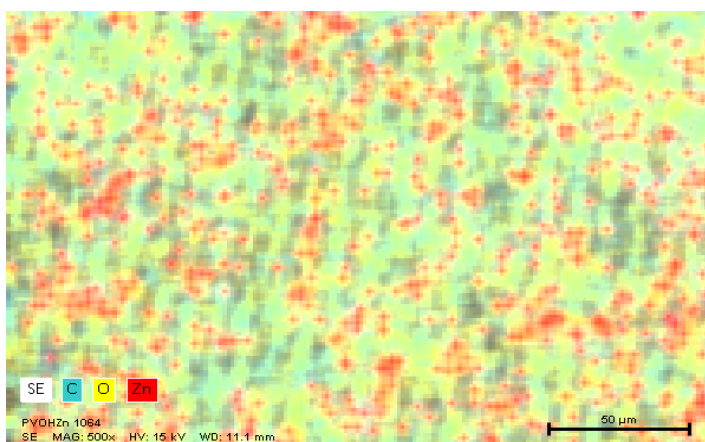


Figura 24. Mapeo elemental del compuesto

De manera individual, se obtuvieron los mapas de distribución elemental (Figura 25). Cada elemento se representa por un color especificado en la parte inferior de la imagen. Con esto se puede observar con mayor claridad que la presencia de cada elemento es uniforme.

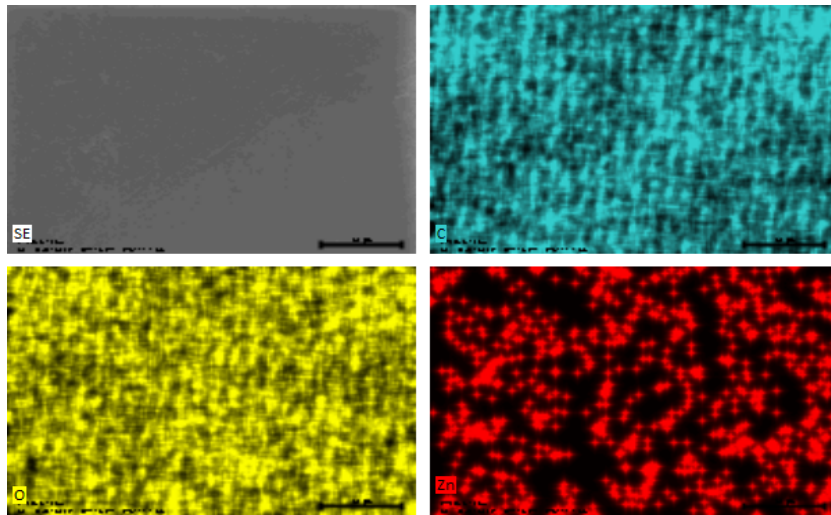


Figura 25. Mapeo elemental individual de los elementos del compuesto

A partir de este mapeo, se observa la mayor presencia de C y O, distribuidos de forma abundante sobre la superficie de la muestra. Esto se debe a que estos elementos constituyen principalmente la matriz de PVOH y de los extractos naturales añadidos, lo cual también coincide con el análisis cuantitativo elemental presentado previamente. Por otro lado, el Zn aparece en menor proporción en la imagen correspondiente, debido a la baja concentración en la composición del compuesto, lo que también se observa en el análisis cuantitativo. Estas imágenes corroboran la presencia y la incorporación de los extractos y las nanopartículas al PVOH del blanco. Es importante mencionar que la distribución homogénea de ZnO en la superficie del material compuesto es importante debido a la aplicación propuesta como apósito, es necesario que la actividad antibacteriana y antifúngica esperada del ZnO esté en todo el material y no concentrado en puntos específicos por medio de aglomeraciones, dejando otras zonas desprotegidas.

## Análisis térmicos

### Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA)

En la figura 26 se muestran los resultados de los análisis térmicos, realizados tanto al blanco como al compuesto.

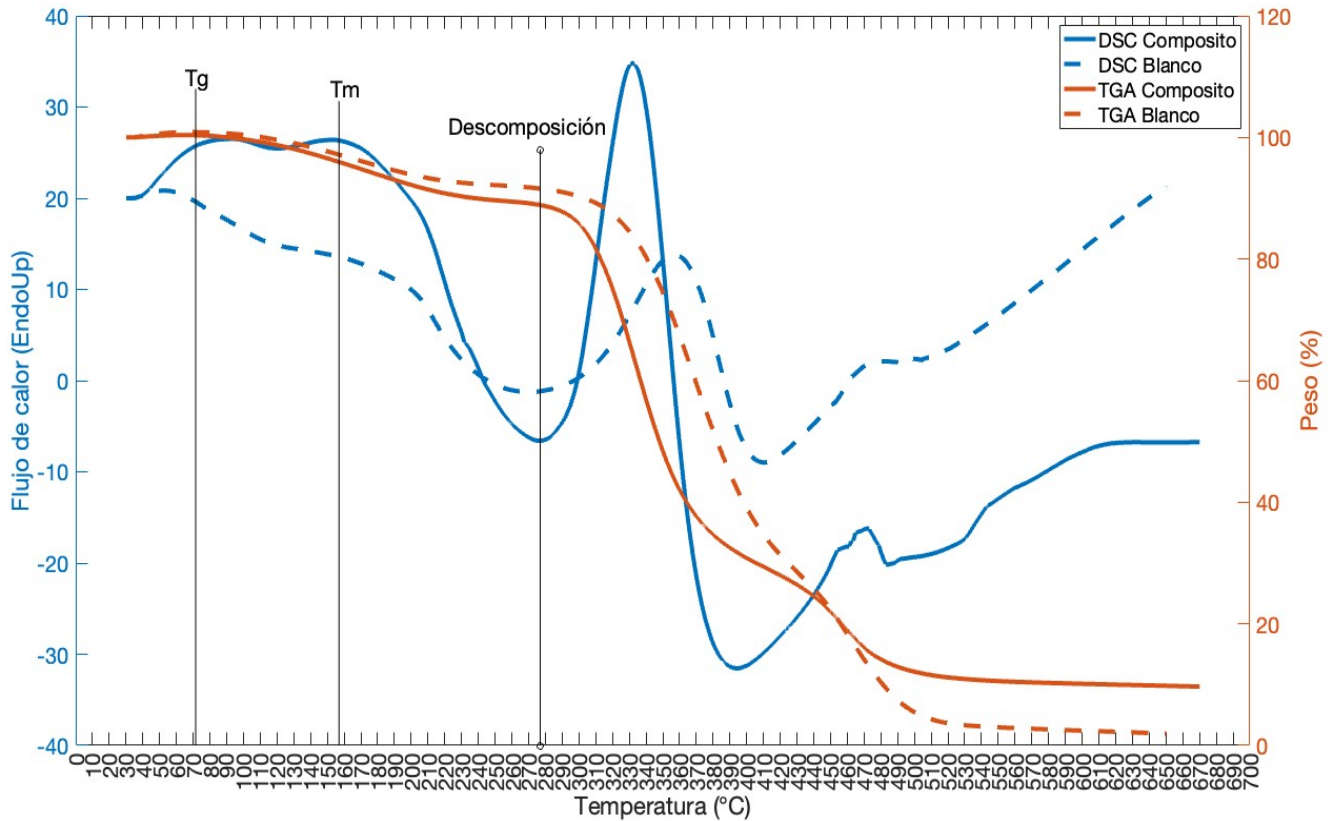


Figura 26. Análisis térmicos

En el TGA del blanco y del compuesto, se observa una primera pérdida de peso comenzando alrededor de 90° C, lo que se atribuye a la pérdida de agua libre presente en ambos, la cual no está interaccionando directamente con las cadenas del polímero [62]. Esto también se comprueba con el cambio en la pendiente de las gráficas del DSC de las 2 muestras, lo cual también indica la transición vítrea del polímero, donde podría experimentar mayor movilidad molecular. Alrededor de 170° C, se observa una segunda pérdida de masa, la cual se ve reflejada en las curvas DSC. Esta pérdida está atribuida a agua atrapada dentro de la estructura del polímero formando puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de las cadenas, esta interacción evita que el agua atrapada se libere a una temperatura menor. Este cambio en la curva DSC, está asociada a la temperatura

de fusión y se puede atribuir al cambio de fase de las partes cristalinas del material hacia una fase líquida. Una tercera pérdida de masa y que se relaciona también en las curvas DSC, se observa alrededor de 320° C, lo que corresponde a la descomposición térmica del polímero y a la pérdida del agua, CO y CO<sub>2</sub> [87] [88]. En el compuesto, se observa un remanente de 10% aproximado de masa, esto debido a la presencia de las nanopartículas de ZnO, las cuales no sufren una descomposición a ese intervalo de temperatura y también a la presencia de los extractos que contribuyen a una mayor cantidad de masa residual de cenizas producto de la descomposición.

El pico endotérmico en el DSC se observa con mayor altura y más ancho en el compuesto (color azul) en comparación con el del blanco (color negro). Se puede atribuir a que en el compuesto, las cadenas poliméricas están interactuando con los componentes de los extractos y las nanopartículas lo que hace que requiera mayor cantidad de energía para romper estas interacciones y descomponer la muestra; mientras que en el blanco las cadenas del polímero solo están interactuando con el agua, lo que permite su descomposición con una menor cantidad de energía.

Es importante destacar, que a temperatura corporal no ocurre ningún tipo de transición térmica, aproximadamente 37° C. Esto nos indica que el material no sufrirá ningún cambio estructural ni pérdida de estabilidad en condiciones fisiológicas, manteniendo su integridad a temperatura corporal, lo que lo hace apto para el tipo de aplicación que se busca.

## Espectroscopia de infrarojo de transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica se utilizó para caracterizar los grupos funcionales en el compuesto y el blanco.

En las figuras 27 y 28 se muestran los resultados.

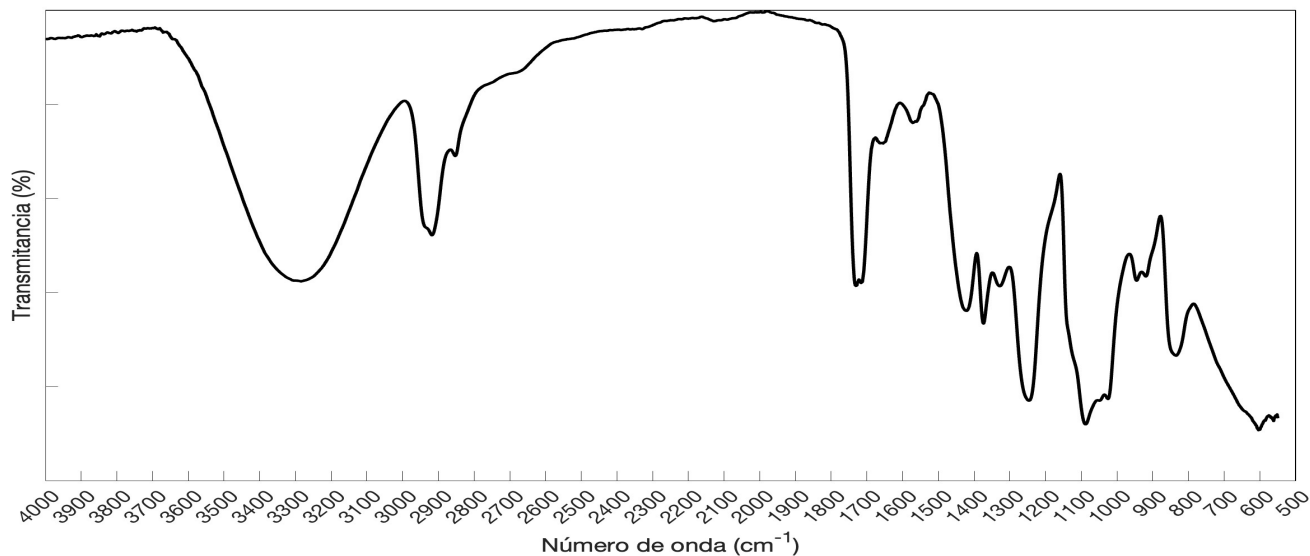


Figura 27. FTIR blanco

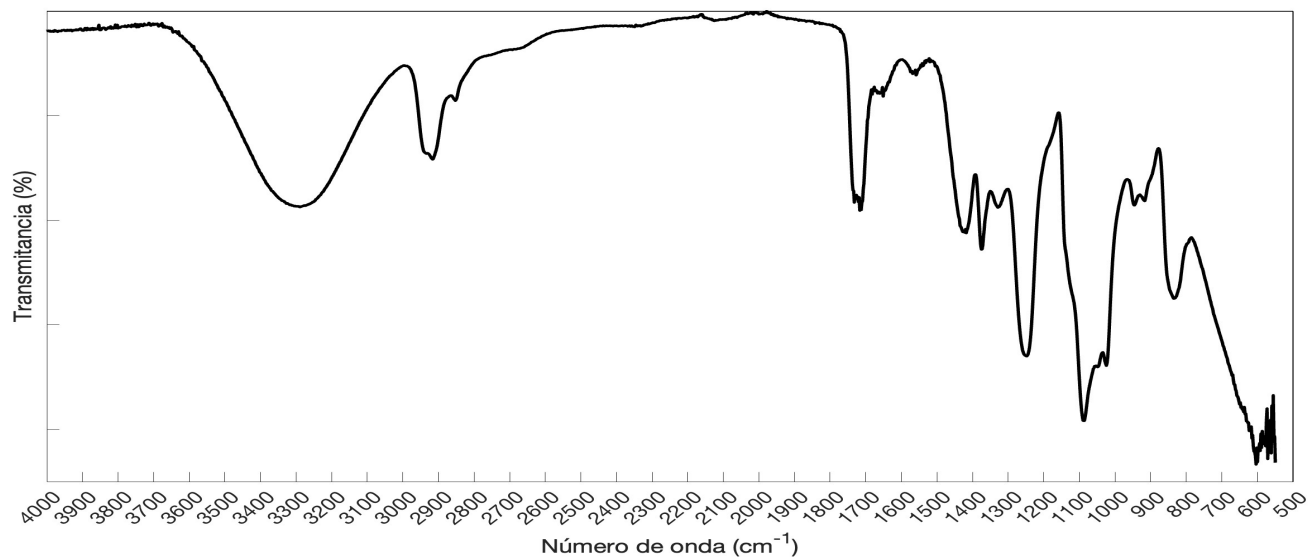


Figura 28. FTIR compuesto

En ambos espectros se observan las vibraciones de los grupos funcionales del PVOH. Se observa una banda ancha de absorción en el rango de  $3200-3000\text{ cm}^{-1}$ , lo que es característico de la vibración de estiramiento del grupo  $-OH$  [89]. Esta puede estar asociada

a la formación de puentes de hidrógeno y la presencia de los grupos hidroxilo del polímero y de agua absorbida. La banda que se observa en la región de 2900-2800  $cm^{-1}$ , corresponde al estiramiento de los enlaces C-H. Entre 1750 a 1700  $cm^{-1}$ , se observan las vibraciones de los enlaces C=O [90]. Las vibraciones de los enlaces C=C y C-O se observan en las bandas de absorción en las regiones de 1600 a 1500  $cm^{-1}$  y de 1300 a 1000  $cm^{-1}$  respectivamente [89].

Además, en el espectro de la figura 24, se observa una serie de bandas en la región de 600-500  $cm^{-1}$ , que corresponde a la vibración de los enlaces del ZnO [91] [92].

En la tabla 12 se resumen los números de onda de las bandas observadas, las vibraciones asociadas a cada una de ellas y los elementos a los que se pueden atribuir.

Tabla 12. Resultados FTIR

$cm^{-1}$	Grupo funcional	
3200-3000	-OH	PVOH, <i>Calendula officinalis</i> , <i>Camellia sinensis</i>
2900-2800	C-H	PVOH, <i>Calendula officinalis</i> , <i>Camellia sinensis</i>
1750-1700	C=O	PVOH, <i>Calendula officinalis</i> , <i>Camellia sinensis</i>
1600-1500	C=C	PVOH, <i>Calendula officinalis</i> , <i>Camellia sinensis</i>
1300-1000	C-O	PVOH, <i>Calendula officinalis</i> , <i>Camellia sinensis</i>
600-500	Zn-O	Nanopartículas de ZnO

Al comparar los espectros obtenidos de las dos muestras, se observa un cambio en la intensidad (señalados en la figura 29) en los valores aproximados de 1700  $cm^{-1}$ . Esta variación puede ser interpretada como un efecto físico que refleja las interacciones electrostáticas entre las moléculas del PVOH, agua y los extractos agregados, sin implicar algún cambio químico en la estructura del material [93]. Las interacciones físicas electrostáticas, afectan la frecuencia de vibración de los enlaces de los grupos funcionales de la muestra, desplazando las bandas hacia números de onda más bajos o altos. Estas interacciones son causadas por la adición de los extractos al PVOH, los cuales se componen de elementos como C, O e H, y puede atribuirse a una redistribución de las cargas en la estructura del material. Estas variaciones no están asociadas con la ruptura o formación de nuevos enlaces químicos, lo que confirma que el proceso de interacción de los componentes

adicionales es físico. Además, no se observa la formación de nuevas bandas de vibraciones de enlaces (solo las de ZnO), lo que corrobora que no está ocurriendo alguna reacción química entre los componentes.

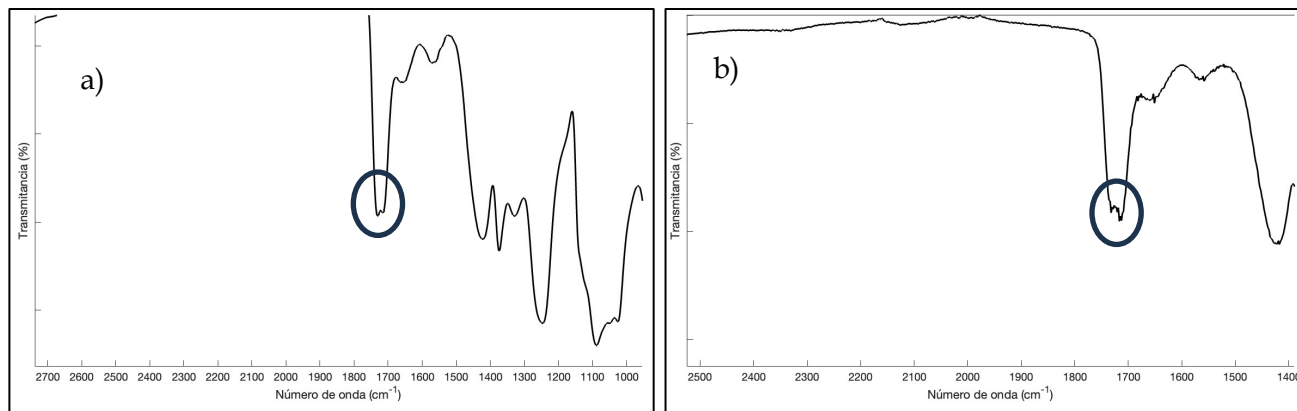


Figura 29. Espectros FTIR ampliados a) Blanco, b) Composito

## Pruebas microbiológicas

### Método Kirby-Bauer

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo utilizando el método Kirby-Bauer. En la figura 30 se muestran los resultados de los ensayos con la bacteria Grampositiva *Escherichia coli*.

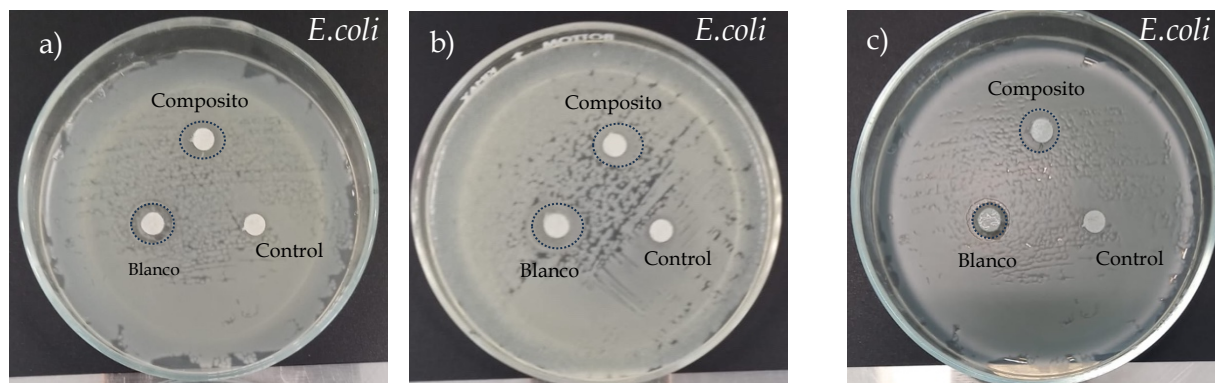


Figura 30. Actividad antibacteriana del blanco y del composito contra *E. coli*: a) Ensayo 1, b) Ensayo 2, c) Ensayo 3

En la figura 31, se muestran los resultados de los ensayos con la bacteria Gramnegativa *Staphylococcus aureus*.

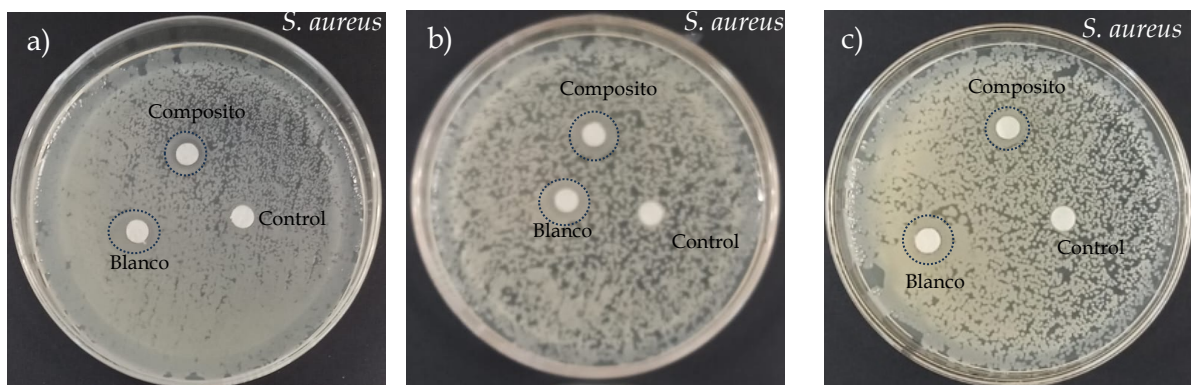


Figura 31. Actividad antibacteriana del blanco y del composito contra *S. aureus*: a) Ensayo 1, b) Ensayo 2, c) Ensayo 3

En la tabla 13 se muestran los resultados de los ensayos con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, estos corresponden al tamaño (milímetros) del halo de inhibición formado en cada uno de los discos de difusión en cada uno de los ensayos.

Tabla 13. Tamaño de los halos de inhibición (mm) para ensayos Kirby-Bauer de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Blanco	Composito	Blanco	Composito
Ensayo 1	7.83 ± 0.87	7.94 ± 0.63	8.1 ± 0.34	9.2 ± 0.20
Ensayo 2	8.22 ± 0.87	8.75 ± 0.63	8.4 ± 0.34	9.6 ± 0.20
Ensayo 3	9.49 ± 0.87	9.17 ± 0.63	7.73 ± 0.34	9.47 ± 0.20

De acuerdo a los resultados y a los halos formados, se observó que la respuesta de *E. coli* al composito fue menos susceptible que con el microorganismo *S.aureus*. Aunque el composito tuvo actividad antibacteriana contra ambas cepas, mostrando halos de inhibición, *E. coli* presentó mayor resistencia. Esto se debe a la doble membrana que presentan las bacterias Grampositivas, respecto a las bacterias Gramnegativas como *Staphylococcus aureus* [94] donde se observan zonas de inhibición con mayor diámetro.

El óxido de Zinc se ha identificado como un agente antimicrobiano de amplio espectro, especialmente contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas. El mecanismo de acción del óxido de zinc contra las bacterias se atribuye a la capacidad que tiene para generar especies reactivas de oxígeno (ROS), estas pueden dañar las membranas celulares bacterianas, lo que resulta en la muerte celular. Las nanopartículas de ZnO pueden aumentar la síntesis de citocinas que causan inflamación. Estas citocinas interfieren en fases tempranas de la curación de las heridas. Las nanopartículas de ZnO pueden promover la proliferación de fibroblastos, un tipo de célula que produce colágeno y otras proteínas necesarias para el proceso de curación. Además, tienen actividad antioxidante porque pueden eliminar los radicales libres que son causados por bacterias e inflamación [80] [95].

Sin embargo, el blanco también mostró halos de inhibición. Aunque el PVOH por sí solo no se le atribuyen propiedades antibacteriales, los halos observados podrían estar ocurriendo debido a ciertos mecanismos indirectos que favorecen la inhibición del crecimiento bacteriano debido a la presencia residual de compuestos biocidas provenientes de la materia prima, el acetato de polivinilo previo a la transformación de este en PVOH.

Tomando en cuenta la aplicación del material como apósito, las 2 presentan características favorables para esto. La protección antibacteriana en una zona herida es de las características

más importantes para prevenir otro tipo de infecciones que afecten y deterioren aún más la salud de los pacientes.

### Ensayo de microdilución

Tabla 14. Crecimiento bacteriano respecto a la concentración de cada muestra (+ crecimiento, - inhibición) (CMI, valores marcados con gris)

Concentración (mg/ml)	Blanco		Composito		Concentración (mg/ml)
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	
150	-	-	-	-	130.5
75	-	-	-	-	65.25
37.5	-	-	-	-	32.625
18.75	+	-	-	-	16.3125
9.375	-	-	-	-	8.15625
4.6875	-	-	-	-	4.078125
Control	+	+	+	+	Control

A partir de las lecturas de absorbancia, se calculó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada muestra. Los resultados se observan en la Tabla 14. En el caso de *E.coli*, se puede observar que para el blanco la CMI fue 37.5 mg/ml, mientras que para el composito fue de 4.07 mg/ml. La CMI es la concentración más baja de un agente antibacteriano, que en condiciones in vitro controladas, previene el crecimiento visible de una cepa bacteriana, esta se puede determinar mediante ensayos de microdilución [96].

Para el tratamiento con *S.aureus* en el blanco la CMI fue de 4.68 mg/ml mientras que para el composito fue de 4.07 mg/ml. Con estos resultados se sugiere que el composito si presenta actividad antibacteriana, además de que con una menor cantidad de material se obtiene una mejor inhibición del crecimiento bacteriano, lo que resulta benéfico ya que representa una disminución en costos y hasta en generación de residuos.

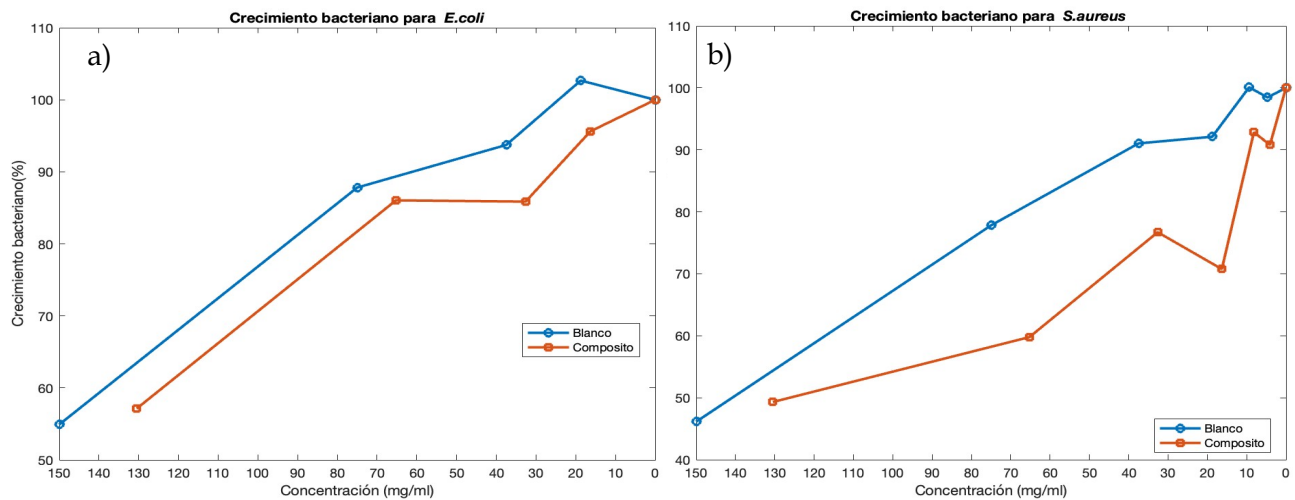


Figura 32. Gráfica del porcentaje de crecimiento bacteriano respecto a las concentraciones del blanco y del composito a) *E.coli* b) *S.aureus*

Del mismo modo, a partir de las lecturas de absorbancia se obtuvieron los porcentajes de crecimiento bacteriano que se presentan en la figura 32. Con la concentración más alta de los materiales, se observa menor crecimiento bacteriano, lo cual era de esperarse. Sin embargo, un aspecto relevante de este resultado es que, a pesar de que la inhibición fue alta en ambas condiciones, el composito logró una inhibición comparable utilizando una menor cantidad de material: 130.5 mg en el composito frente a 150 mg en el blanco. Esta diferencia es importante si se analiza desde la perspectiva de eficiencia y optimización de recursos.

A partir de la segunda dilución de la concentración, al 50%, se observan mayores diferencias entre ambas muestras. El crecimiento bacteriano del blanco aumenta de manera progresiva y el composito mantiene la capacidad inhibitoria mayor. Este comportamiento se presenta en las siguientes diluciones de concentración, lo cual indica que el composito es más eficiente en la cantidad de material necesario para lograr el efecto inhibitorio y continúa presentando actividad a concentraciones reducidas, es decir, presenta mejores niveles de respuesta con una menor cantidad de material.

También se observa mayor inhibición contra *S. aureus*. Este tipo de bacterias son las principales causantes de infecciones y lesiones en la piel. Un tipo de lesión común que generan son los relacionados a zonas heridas, es decir, secundaria a una herida [97]. Es por esto por lo que el composito tiene potencial para ser usado como apósito.

## Capítulo V. Conclusiones

En la síntesis de hidrogeles, 1 ciclo de congelación y descongelación no funcionó para formar el blanco. Con 3 y 5 ciclos CD sí se formó la estructura esperada. No se observaron cambios significativos de 3 a 5 ciclos CD durante las pruebas realizadas, por lo que se determinó no ser necesario probar con un número mayor de ciclos CD.

Con base al estándar británico, todas las combinaciones de solución (variando concentración PVOH + agua desionizada) tuvieron resultados favorables para la aplicación. Se seleccionó la combinación de 15% de concentración de PVOH para optimizar recursos. A esta muestra se le agregaron los demás componentes, variando 3 y 5 ciclos CD para la síntesis del composito. Se determinaron distintas combinaciones de los extractos y un valor fijo para las nanopartículas. Con 3 ciclos CD no se formó la estructura deseada, con 5 ciclos CD sí.

Los componentes adicionales se integraron de manera adecuada a la matriz de PVOH formando un composito. No se observaron interacciones químicas entre ellos que pudieran advertir la formación o reacción de ellos.

La integración de las nanopartículas en la matriz de PVOH fue eficiente, ya que se observó una distribución uniforme a lo largo del material. No se detectaron aglomeraciones ni zonas vacías, lo que indica una dispersión homogénea y una buena compatibilidad entre las nanopartículas y la matriz polimérica.

Los resultados de las pruebas del estándar británico para el composito tuvieron resultados favorables y muy cercanos entre sí. Los compositos cumplen con los requisitos de absorción específicos para la aplicación final. Por esta razón, se seleccionó el composito con mayor cantidad de extractos naturales, ya que esto podría ser benéfico en la aplicación de apósito.

El material se mantiene estable y sin cambios estructurales a temperatura corporal (37 °C), lo que confirma su resistencia térmica y compatibilidad para uso en condiciones fisiológicas.

Existe actividad antibacterial, tanto en el blanco como en el composito, mostrando una ligera mejora en este último, esto es un parámetro importante en la aplicación final. La actividad antibacterial del composito fue más efectiva contra *S. aureus*, lo que también resulta benéfico para la aplicación.

En el presente trabajo se aporta evidencia experimental para el posible uso del composito de hidrogel de PVOH, nanopartículas de óxido de Zinc, extractos de *Calendula officinalis* y *Camelia sinensis* como apósito, siendo una alternativa a los productos comerciales existentes. Sin embargo, aún se requieren estudios adicionales y ensayos clínicos para confirmar su rendimiento y seguridad en un ambiente real.

## Referencias

- [1] M. Bahram, N. Mohseni, and M. Moghtader, "An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications," in *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*, InTech, 2016. doi: 10.5772/64301.
- [2] W. X. Waresindo *et al.*, "Freeze-thaw hydrogel fabrication method: basic principles, synthesis parameters, properties, and biomedical applications," *Mater Res Express*, vol. 10, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.1088/2053-1591/acb98e.
- [3] Y. Liang, J. He, and B. Guo, "Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing," Aug. 24, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsnano.1c04206.
- [4] A. Chyzy and M. E. Plonska-Brzezinska, "Hydrogel Properties and Their Impact on Regenerative Medicine and Tissue Engineering," Dec. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules25245795.
- [5] Lh. Yahia, "History and Applications of Hydrogels," *Journal of Biomedical Sciences*, vol. 04, no. 02, 2015, doi: 10.4172/2254-609x.100013.
- [6] S. Garg Guru, R. Khalsa, and A. Garg Guru, "Hydrogel: Classification, Properties, Preparation and Technical Features," 2016. [Online]. Available: [www.ajbr.in](http://www.ajbr.in)
- [7] Md. A. R. Azady, S. Ahmed, and Md. S. Islam, "A review on polymer nanocomposite hydrogel preparation, characterization, and applications," *European Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 3, pp. 329-339, Sep. 2021, doi: 10.5155/eurjchem.12.3.329-339.2100.

- [8] S. Asadpour, A. Raeisi vanani, M. Kooravand, and A. Asfaram, "A review on zinc oxide/poly(vinyl alcohol) nanocomposites: Synthesis, characterization and applications," Aug. 15, 2022, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.jclepro.2022.132297.
- [9] S. R. Stauffer and N. A. Peppas, "Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing," *Polymer (Guildf)*, vol. 33, no. 18, pp. 3932–3936, Sep. 1992, doi: 10.1016/0032-3861(92)90385-A.
- [10] Y. Guan, X.-M. Qi, B. Zhang, G.-G. Chen, F. Peng, and R.-C. Sun, "Hemicellulosic hydrogels," 2015.
- [11] S. K. H. Gulrez, S. Al-Assaf, and G. O. Phillips, "Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications," in *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*, A. Carpi, Ed., 2011. [Online]. Available: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>
- [12] H. Adelnia, R. Ensandoost, S. Shebbrin Moonshi, J. N. Gavgani, E. I. Vasafi, and H. T. Ta, "Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future," Feb. 05, 2022, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110974.
- [13] C. Marcio Paranhos, R. Nunes Oliveira, B. Guenther Soares, and L. Antônio Pessan, "Poly(vinyl alcohol)/sulfonated Polyester Hydrogels Produced by Freezing and Thawing Technique: Preparation and Characterization," 2007.
- [14] R. Hernández, A. Sarafian, D. López, and C. Mijangos, "Viscoelastic properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels and ferrogels obtained through freezing-thawing cycles," *Polymer (Guildf)*, vol. 45, no. 16, pp. 5543–5549, Jul. 2004, doi: 10.1016/J.POLYMER.2004.05.061.
- [15] N. A. Peppas and N. K. Mongia, "Ultrapure poly(vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics," 1997.

- [16] F. Urushizaki', H. Yamaguchi', K. Nakamura, S. Numajiri, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto, "Swelling and mechanical properties of poly( vinyl alcohol) hydrogels," 1990.
- [17] C. M. Hassan, J. E. Stewart, and N. A. Peppas, "Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogels: Applications to protein controlled release from multilaminate devices." [Online]. Available: [www.elsevier.com/locate/ejphabio](http://www.elsevier.com/locate/ejphabio)
- [18] T. Hatakeyema, J. Uno, C. Yamada, A. Kishi, and H. Hatakeyama, "Gel-sol transition of poly(vinyl alcohol) hydrogels formed by freezing and thawing," in *Thermochimica Acta*, Jun. 2005, pp. 144–148. doi: 10.1016/j.tca.2005.01.062.
- [19] N. A. Peppas and J. E. Scott, "Controlled release from poly (vinyl alcohol) gels prepared by freezing-thawing processes," *Journal of Controlled Release*, vol. 18, pp. 95–100, Oct. 1992.
- [20] Q. Chai, Y. Jiao, and X. Yu, "Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them," Mar. 01, 2017, *MDPI AG*. doi: 10.3390/gels3010006.
- [21] N. Annabi *et al.*, "25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine," Jan. 08, 2014. doi: 10.1002/adma.201303233.
- [22] A. Khalilipour and A. Paydayesh, "Characterization of Polyvinyl Alcohol/ZnO Nanocomposite Hydrogels for Wound Dressings," *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, vol. 58, no. 2, pp. 371–384, Feb. 2019, doi: 10.1080/00222348.2018.1560936.
- [23] S. H. Aswathy, U. Narendrakumar, and I. Manjubala, "Commercial hydrogels for biomedical applications," Apr. 01, 2020, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03719.
- [24] P. Wang *et al.*, "Emerging trends in the application of hydrogel-based biomaterials for enhanced wound healing: A literature review," Mar. 01, 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129300.

- [25] A. A. Gokaltun *et al.*, "Supramolecular hybrid hydrogels as rapidly on-demand dissoluble, self-healing, and biocompatible burn dressings," *Bioact Mater*, vol. 25, pp. 415–429, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.09.003.
- [26] K. Ou, X. Dong, C. Qin, X. Ji, and J. He, "Properties and toughening mechanisms of PVA/PAM double-network hydrogels prepared by freeze-thawing and anneal-swelling," *Materials Science and Engineering C*, vol. 77, pp. 1017–1026, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.287.
- [27] S. A. Bernal-Chávez, S. Alcalá-Alcalá, Y. S. Tapia-Guerrero, J. J. Magaña, M. L. Del Prado-Audelo, and G. Leyva-Gómez, "Cross-linked polyvinyl alcohol-xanthan gum hydrogel fabricated by freeze/thaw technique for potential application in soft tissue engineering," *RSC Adv*, vol. 12, no. 34, pp. 21713–21724, Aug. 2022, doi: 10.1039/d2ra02295h.
- [28] T. Abitbol, T. Johnstone, T. M. Quinn, and D. G. Gray, "Reinforcement with cellulose nanocrystals of poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by cyclic freezing and thawing," *Soft Matter*, vol. 7, no. 6, pp. 2373–2379, Mar. 2011, doi: 10.1039/c0sm01172j.
- [29] A. C. Manna, "Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles," in *Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects*, vol. 9783642244285, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012, pp. 151–180. doi: 10.1007/978-3-642-24428-5\_5.
- [30] A. Kareem, M. Al Maamori, and S. N. K. Al-Thomir, "Preparation and Characterization of Antimicrobial PVA/ZnO Nanocomposite for Biomaterial Applications," *Journal of University of Babylon*, vol. 26, 2018, [Online]. Available: <https://iasj.rdd.edu.iq/journals/uploads/2024/12/31/d86f690177a834b3eb2c219821e7e4db.pdf>
- [31] L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, "Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 9, no. 3, pp. 479–489, Jun. 2007, doi: 10.1007/s11051-006-9150-1.

- [32] L. Zhang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, "ZnO nanofluids-A potential antibacterial agent," *Progress in Natural Science*, vol. 18, no. 8, pp. 939–944, 2008, doi: 10.1016/j.pnsc.2008.01.026.
- [33] T. Naseriyeh *et al.*, "Preparation of liposomal hydrogel containing Calendula and application as a wound dressing," *Cell Mol Biol*, vol. 68, no. 11, pp. 1–7, 2022, doi: 10.14715/CMB/2022.68.11.1.
- [34] R. John and N. Jan, "Calendula Officinalis-An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties," *Proceedings of the Indian National Science Academy*, vol. 93, no. 0, Aug. 2017, doi: 10.16943/ptinsa/2017/49126.
- [35] Chopade V. and Phatak A., "Green tea (*Camellia sinensis*): Chemistry, Traditional, Medicinal uses and its Pharmacological activities- a review," *Pharmacogn Rev*, vol. 2, pp. 157–162, 2008.
- [36] M. M. Aboulwafa, F. S. Youssef, H. A. Gad, A. E. Altyar, M. M. Al-Azizi, and M. L. Ashour, "A comprehensive insight on the health benefits and phytoconstituents of camellia sinensis and recent approaches for its quality control," Oct. 01, 2019, *MDPI*. doi: 10.3390/antiox8100455.
- [37] Kensuke YAGI, Keiichi GOTO, and Fumio NANJO, "Identification of a Major Polyphenol and Polyphenolic Composition in Leaves of *Camellia irrawadiensis*," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 57, no. 11, pp. 1284–1288, 2009, Accessed: Jun. 03, 2024. [Online]. Available: 10.1248/cpb.57.1284
- [38] J. Luo, D. Zuo, Z. Deng, A. Ji, and G. Xia, "Effects of heat treatment and tea polyphenols on the structure and properties of polyvinyl alcohol nanofiber films for food packaging," *Coatings*, vol. 10, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/coatings10010049.
- [39] E. M. Stegensek Mejía, A. Jiménez Mendoza, L. E. Romero Gálvez, and A. Aparicio Aguilar, "Úlceras por presión en diversos servicios de un hospital de segundo nivel de atención," *Enfermería Universitaria*, vol. 12, no. 4, pp. 173–181, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.reu.2015.08.004.

- [40] F. A. Stevie and C. L. Donley, "Introduction to x-ray photoelectron spectroscopy," *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 38, no. 6, Dec. 2020, doi: 10.1116/6.0000412.
- [41] S. Oswald, "X-Ray Photoelectron Spectroscopy in Analysis of Surfaces Update based on the original article by Steffen Oswald, Encyclopedia of Analytical Chemistry, © 2000, John Wiley & Sons, Ltd.," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, 2013. doi: 10.1002/9780470027318.a2517.pub2.
- [42] D. N. Leonard, G. W. Chandler, and S. Seraphin, "SCANNING ELECTRON MICROSCOPY."
- [43] S. D. Gallegos-Cerda, J. D. Hernández-Varela, B. Arredondo-Tamayo, and J. J. Chanona Pérez, "A review of advanced microscopy techniques for the development of nanotechnology in agriculture, food, and the environment," *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, vol. 16, no. 30, pp. 1e-33e, Aug. 2022, doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69723.
- [44] J. Clavijo, "Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM)."
- [45] D. E. Newbury, "ENERGY DISPERSIVE SPECTROMETRY."
- [46] E. N. La, C. De Materiales, M. Ipohorski, and P. B. Bozzano, "MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO."
- [47] E. Wyroba, S. Suski, K. Miller, and R. Bartosiewicz, "Biomedical and agricultural applications of energy dispersive X-ray spectroscopy in electron microscopy," Sep. 01, 2015, *Walter de Gruyter GmbH*. doi: 10.1515/cmble-2015-0028.
- [48] S. B. Warrington, "Thermal Analysis and Calorimetry", doi: 10.1002/14356007.b06.
- [49] A. M. Zambrano Arévalo, G. C. Castellar, W. Vallejo Lozada, I. Piñeres Ariza, J. S. Valencia Ríos, and M. M. Cely Bautista, "Conceptual approach to thermal analysis and its main applications/Aproximación conceptual al análisis térmico y sus principales aplicaciones," *Prospectiva*, vol. 15, no. 2, pp. 117-125, Jul. 2017, doi: 10.15665/rp.v15i2.1166.

- [50] N. Saadatkhan *et al.*, "Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA," Jan. 01, 2020, Wiley-Liss Inc. doi: 10.1002/cjce.23673.
- [51] G. R. Heal, "Thermogravimetry and Derivative Thermogravimetry," in *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*, The Royal Society of Chemistry, 2007, pp. 10–54. doi: 10.1039/9781847551764-00010.
- [52] S. Suriñach, M. D. Baro, S. Bordas, N. Clavaguera, and M. T. Clavaguera-mora, "La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales."
- [53] A. Riga and R. Collins, "Differential Scanning Calorimetry and Differential Thermal Analysis," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, 2000. doi: 10.1002/9780470027318.a6602.
- [54] K. Gerwert and C. Kötting, "Fourier Transform Infrared ( FTIR ) Spectroscopy," in *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, 2010. doi: 10.1002/9780470015902.a0003112.pub2.
- [55] J. S. Gaffney, N. A. Marley, and D. E. Jones, "FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY."
- [56] British Standard Institution, "BS EN 13726-1:2002 Test methods for primary wound dressings- Part 1: Aspects of absorbency," 2002.
- [57] M. M. Mahamoud, T. M. Ketema, Y. Kuwahara, and M. Takafuji, "Enhancement of Mechanical Properties of Benign Polyvinyl Alcohol/Agar Hydrogel by Crosslinking Tannic Acid and Applying Multiple Freeze/Thaw Cycles," *Gels*, vol. 10, no. 8, Aug. 2024, doi: 10.3390/gels10080527.
- [58] S. Gupta, S. Goswami, and A. Sinha, "A combined effect of freeze-thaw cycles and polymer concentration on the structure and mechanical properties of transparent PVA gels," in *Biomedical Materials*, Institute of Physics Publishing, 2012. doi: 10.1088/1748-6041/7/1/015006.

- [59] E. Yokoyama, I. Masada, K. Shimamura, T. Ikawa, and K. Monobe, "Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting."
- [60] F. Soto-Bustamante, G. Bassu, E. Fratini, and M. Laurati, "Effect of Composition and Freeze-Thaw on the Network Structure, Porosity and Mechanical Properties of Polyvinyl-Alcohol/Chitosan Hydrogels," *Gels*, vol. 9, no. 5, May 2023, doi: 10.3390/gels9050396.
- [61] J. L. Holloway, A. M. Lowman, and G. R. Palmese, "The role of crystallization and phase separation in the formation of physically cross-linked PVA hydrogels," *Soft Matter*, vol. 9, no. 3, pp. 826–833, Jan. 2013, doi: 10.1039/c2sm26763b.
- [62] C. M. Hassan and N. A. Peppas, "Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels," *Macromolecules*, vol. 33, no. 7, pp. 2472–2479, Apr. 2000, doi: 10.1021/ma9907587.
- [63] M. Ribeiro, M. Simões, C. Vitorino, and F. Mascarenhas-Melo, "Hydrogels in Cutaneous Wound Healing: Insights into Characterization, Properties, Formulation and Therapeutic Potential," Mar. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/gels10030188.
- [64] Mennini N and Greco A, "Quality of wound dressings: a first step in establishing shared criteria and objective procedures to evaluate their performance," *J Wound Care*, vol. 25, 2016, doi: 10.12968/jowc.2016.25.8.428.
- [65] M. Ribeiro, M. Simões, C. Vitorino, and F. Mascarenhas-Melo, "Hydrogels in Cutaneous Wound Healing: Insights into Characterization, Properties, Formulation and Therapeutic Potential," Mar. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/gels10030188.
- [66] A. Alberts, E. T. Moldoveanu, A. G. Niculescu, and A. M. Grumezescu, "Hydrogels for Wound Dressings: Applications in Burn Treatment and Chronic Wound Care," Mar. 01, 2025, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/jcs9030133.

- [67] X. Lin, X. Zhang, Y. Wang, W. Chen, Z. Zhu, and S. Wang, "Hydrogels and hydrogel-based drug delivery systems for promoting refractory wound healing: Applications and prospects," Jan. 01, 2025, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.138098.
- [68] A. G. Niculescu and A. M. Grumezescu, "An Up-to-Date Review of Biomaterials Application in Wound Management," Feb. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/polym14030421.
- [69] D. Goder Orbach, I. Roitman, G. Coster Kimhi, and M. Zilberman, "Formulation-Property Effects in Novel Injectable and Resilient Natural Polymer-Based Hydrogels for Soft Tissue Regeneration," *Polymers (Basel)*, vol. 16, no. 20, Oct. 2024, doi: 10.3390/polym16202879.
- [70] T. P. D. Truong *et al.*, "Gelation time characterization method for polyvinyl alcohol-based hydrogel," *Science and Technology Development Journal*, 2021, doi: 10.32508/stdj.v24i3.2530.
- [71] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review," 2015, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [72] M. Uzun, S. C. Anand, and T. Shah, "In Vitro Characterisation and Evaluation of Different Types of Wound Dressing Materials," *Journal of Biomedical Engineering and Technology*, vol. 1, no. 1, pp. 1-7, 2013, doi: 10.12691/jbet-1-1-1.
- [73] N. Asy-Syifa, Kusjuriansah, W. X. Waresindo, D. Edikresnha, T. Suciati, and K. Khairurrijal, "The Study of the Swelling Degree of the PVA Hydrogel with varying concentrations of PVA," in *Journal of Physics: Conference Series*, Institute of Physics, 2022. doi: 10.1088/1742-6596/2243/1/012053.
- [74] M. T. Islam and N. Dafader, "Studies on Swelling and Absorption Properties of they-Irradiated Polyvinyl Alcohol (PVA)/Kappa-Carrageenan Blend Hydrogels," *Journal of Advanced Chemical Engineering*, vol. 06, no. 02, 2016, doi: 10.4172/2090-4568.1000153.

- [75] M. A. Elblbesy, T. A. Hanafy, and M. M. Shawki, "Polyvinyl alcohol/gum Arabic hydrogel preparation and cytotoxicity for wound healing improvement," *E-Polymers*, vol. 22, no. 1, pp. 566–576, Jan. 2022, doi: 10.1515/epoly-2022-0052.
- [76] R. M. Quispe-Siccha *et al.*, "Development of Polyvinyl Alcohol Hydrogels for Controlled Glucose Release in Biomedical Applications," *Gels*, vol. 10, no. 10, Oct. 2024, doi: 10.3390/gels10100668.
- [77] X. Li *et al.*, "Preparation of polyurethane/polyvinyl alcohol hydrogel and its performance enhancement via compositing with silver particles," *RSC Adv*, vol. 7, no. 73, pp. 46480–46485, 2017, doi: 10.1039/c7ra08845k.
- [78] E. Tamahkar Irmak, B. Özkahraman, G. Bayrak, I. Perçin Demirçelik, Z. Ciğeroğlu, and F. Boran, "Polyvinylalcohol/Polyethyleneimine Hydrogels: Evaluation of Swelling, Dehydration and Antibacterial Activity," *Hittite Journal of Science and Engineering*, vol. 11, no. 4, pp. 181–189, Dec. 2024, doi: 10.17350/HJSE19030000345.
- [79] M. Mandru *et al.*, "Polyurethane/poly(vinyl alcohol) hydrogels: Preparation, characterization and drug delivery," *Eur Polym J*, vol. 118, pp. 137–145, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.05.049.
- [80] M. Shahrousvand *et al.*, "Polyacrylic acid/ polyvinylpyrrolidone hydrogel wound dressing containing zinc oxide nanoparticles promote wound healing in a rat model of excision injury," *Heliyon*, vol. 9, no. 8, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e19230.
- [81] Y. Liang *et al.*, "Adhesive Hemostatic Conducting Injectable Composite Hydrogels with Sustained Drug Release and Photothermal Antibacterial Activity to Promote Full-Thickness Skin Regeneration During Wound Healing," *Small*, vol. 15, no. 12, Mar. 2019, doi: 10.1002/sml.201900046.
- [82] W. Feng and Z. Wang, "Tailoring the Swelling-Shrinkable Behavior of Hydrogels for Biomedical Applications," Oct. 06, 2023, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/advs.202303326.
- [83] E. González De Mejía, "El efecto quimioprotector del té y sus compuestos," 2003.

- [84] A. E. Al-Snafi, "THE CHEMICAL CONSTITUENTS AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF CALENDULA OFFICINALIS-A REVIEW," vol. 3, pp. 2015-172, [Online]. Available: [www.ijpsrjournal.com](http://www.ijpsrjournal.com)
- [85] L.-J. Meng, C. P. Moreira De Sh, and M. P. Dos Santos, "Study of the structural properties of ZnO thin films by X-ray photoelectron spectroscopy," 1994.
- [86] S. Oswald, " X-Ray Photoelectron Spectroscopy in Analysis of Surfaces Update based on the original article by Steffen Oswald, Encyclopedia of Analytical Chemistry , © 2000, John Wiley & Sons, Ltd. ," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, 2013. doi: 10.1002/9780470027318.a2517.pub2.
- [87] D. P. de Castro, V. Z. Kieffer, and R. M. C. Santana, "Incorporation of organic acids in the crosslinking of polyvinyl alcohol hydrogels," *Polimeros*, vol. 33, no. 3, 2023, doi: 10.1590/0104-1428.20230075.
- [88] C. E. Echeverri, C. Vallejo, and M. Elena, "Síntesis y caracterización de hidrogeles de alcohol polivinílico por la técnica de congelamiento/descongelamiento para aplicaciones médicas synthesis and characterization of polyvinyl alcohol hydrogels by freezing/thawing technique for medical applications," *Revista EIA*, vol. 12, pp. 59-66, 2009, [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=149212815004>
- [89] J. Coates, "Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach," *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. pp. 10815-10837, 2000.
- [90] H. S. Mansur, C. M. Sadahira, A. N. Souza, and A. A. P. Mansur, "FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde," *Materials Science and Engineering C*, vol. 28, no. 4, pp. 539-548, May 2008, doi: 10.1016/j.msec.2007.10.088.
- [91] N. Jayarambabu, A Nj., B. Siva Kumari A, K. Venkateswara Rao B, and Y. Prabhu B A, "Germination and Growth Characteristics of Mungbean Seeds (*Vigna radiata* L.) affected by Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles," 2014. [Online]. Available: <http://inpressco.com/category/ijcet>

- [92] D. D. Thongam, J. Gupta, and N. K. Sahu, "Effect of induced defects on the properties of ZnO nanocrystals: surfactant role and spectroscopic analysis," *SN Appl Sci*, vol. 1, no. 9, Sep. 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1058-3.
- [93] N. Kumar, A. Dixit, and D. S. Bag, "Synthesis of highly swellable silver nanocomposite ionic double network (Ag-IDN) hydrogels and study of their characteristic properties," *Polymer Bulletin*, vol. 79, no. 8, pp. 6759–6776, Aug. 2022, doi: 10.1007/s00289-021-03816-5.
- [94] J. A. Cuervo-Parra, J. E. Aparicio-Burgos, V. H. Pérez-España, M. A. Morales-Ovando, M. Peralta-Gil, and T. Romero-Cortes, "Bioquímica de la pared celular de Gram positivas y Gram negativas," *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, vol. 12, no. 23, pp. 1–8, Jul. 2024, doi: 10.29057/icbi.v12i23.11450.
- [95] D. M. Rata *et al.*, "Biocomposite hydrogels for the treatment of bacterial infections: Physicochemical characterization and in vitro assessment," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13122079.
- [96] B. Kowalska-Krochmal and R. Dudek-Wicher, "The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance," Feb. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/pathogens10020165.
- [97] P. Del Giudice, "Skin infections caused by staphylococcus aureus," *Acta Derm Venereol*, vol. 100, no. 100-year theme Cutaneous and genital infections, pp. 208–215, 2020, doi: 10.2340/00015555-3466.
- [98] D. A. Balentine, S. A. Wiseman, and L. C. M. Bouwens, "The chemistry of tea flavonoids," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 37, no. 8, pp. 693–704, 1997, doi: 10.1080/10408399709527797.
- [99] B. P. Muley, S. S. Khadabadi, and N. B. Banarase, "Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review," 2009. [Online]. Available: <http://www.tjpr.org>

