



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BIOLOGÍA BUCAL

“Evaluación Biológica *in vitro* de membranas fibrilares de PCL/Gel adicionadas con Subsalicilato de Bi”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Ximena Vidal Gutiérrez

TUTOR(AS):

Dra. Argelia Almaguer Flores

Facultad de Odontología

Dra. Phaedra Suriel Silva Bermúdez

Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Cd. Universitaria, CDMX, septiembre, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

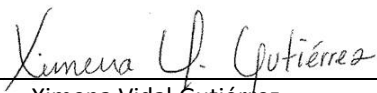


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

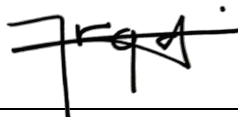
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Ximena Vidal Gutiérrez
Nombre y firma de la alumna



Dra. Argelia Almaguer Flores
Nombre y firma de la tutora



Dra. Phaedra Suriel Silva Bermúdez
Nombre y firma de la tutora



Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez
Nombre y firma
del responsable del campo disciplinario

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Enfermedad periodontal	7
1.1.1 Tejidos periodontales	7
1.1.1.1 Encía	7
1.1.1.2 Ligamento Periodontal	8
1.1.1.3 Cemento radicular	9
1.1.1.4 Hueso alveolar	10
1.1.2 Etiología	10
1.1.3 Terapia periodontal	11
1.2. Regeneración Tisular Guiada (RTG)	12
1.2.1 Principios de la RTG	12
1.2.2 Contaminación bacteriana asociada al fracaso en tratamientos de RTG	13
1.2.3 Estrategias para inhibir la contaminación bacteriana en tratamientos de RTG	14
1.3. Membranas utilizadas en la RTG	14
1.3.1 Membranas fabricadas por la técnica de Electrohilado	16
1.3.2 Policaprolactona (PCL)	17
1.3.3 Gelatina (Gel)	18
1.4. Bismuto	19
1.4.1 Compuestos de bismuto con actividad antimicrobiana	20
1.4.2 Subsalicilato de bismuto (SSB)	21
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	22
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Diseño experimental	24
5.2 Desarrollo y caracterización de membranas de PCL-G-SSB	25
5.2.1 Elaboración de las membranas	25
5.2.2 Caracterización de las membranas	26
5.2.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	26
5.2.2.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	26
5.2.2.3 Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)	27
5.2.2.4 Difracción de Rayos X (XRD)	27
5.2.2.5 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	27
5.2.2.6 Mojabilidad (WCA)	28
5.2.2.7 Propiedades mecánicas	28
5.2.2.8 Propiedades térmicas	28
5.2.2.9 Tasa de degradación	29
5.2.2.10 Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)	29
5.3 Ensayos biológicos	29

5.3.1 Evaluación del efecto antimicrobiano	30
5.3.1.1 Sensibilidad antimicrobiana (Ensayo de difusión con disco).	30
5.3.1.2 Inhibición del crecimiento planctónico (Ensayo de Turbidez y cuantificación del DNA bacteriano)	31
5.3.1.3 Inhibición de la adhesión bacteriana y formación de biopelícula (Ensayo de MTT)	32
5.3.2 Evaluación de citotoxicidad	33
5.3.2.1 Viabilidad celular (Ensayo de MTT)	34
5.3.2.2 Interacción membrana-célula (SEM)	35
VI. ANALISIS ESTADÍSTICO	36
VII. RESULTADOS	37
7.1 Desarrollo y caracterización de membranas de PCL-G-SSB	37
7.1.1 Elaboración de las membranas	37
7.1.2 Caracterización	37
7.1.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	37
7.1.2.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	39
7.1.2.3 Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)	40
7.1.2.4 Difracción de Rayos X (XRD)	41
7.1.2.5 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	42
7.1.2.6 Mojabilidad	43
7.1.2.7 Propiedades mecánicas	43
7.1.2.8 Propiedades térmicas	44
7.1.2.9 Tasa de degradación	47
7.1.2.10 Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)	48
7.2 Ensayos biológicos	49
7.2.1 Evaluación del efecto antimicrobiano	49
7.2.1.1 Sensibilidad antimicrobiana (Ensayo de difusión con disco).	49
7.2.1.2 Inhibición del crecimiento planctónico (Ensayo de Turbidez y cuantificación del DNA bacteriano)	50
7.2.1.3 Inhibición de la adhesión bacteriana y formación de biopelícula (Ensayo de MTT)	53
7.2.2 Evaluación de citotoxicidad	54
7.2.2.1 Viabilidad celular (Ensayo de MTT)	55
7.2.2.2 Interacción membrana-célula (SEM)	56
VIII. DISCUSIÓN	57
IX. CONCLUSIONES	65
X. REFERENCIAS	66
XI. ARTICULOS DERIVADOS DEL PROYECTO	75
Antibacterial composite membranes of PCL/gelatin loaded with ZnO nanoparticles for guided tissue regeneration. <i>Biomedical materials</i> (2020)	
Bismuth subsalicylate incorporated in polycaprolactone-gelatin membranes by electrospinning to prevent bacterial colonization. <i>Biomedical materials</i> (2021)	

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Odontología y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

A mis tutoras, la Dra. Argelia Almaguer Flores y la Dra. Phaedra Suriel Silva Bermúdez, quienes me brindaron la oportunidad de continuar con mi formación académica. Agradezco enormemente su orientación, confianza y apoyo otorgado durante el desarrollo y la ejecución de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Miryam Martínez Hernández y la Dra. Sandra E. Rodil Posada, por su orientación para el desarrollo de este proyecto. En especial a la Dra. Rodil por sus observaciones, apoyo y conocimientos brindados.

Al apoyo técnico del Dr. Josué Romero Ibarra (TEM), Dr. Omar Novelo Peralta (SEM), Mtra. Adriana Tejeda Cruz (XRD), Ing. Karla Eriseth Reyes Morales (Propiedades térmicas), Mtro. Eliezer Hernández Mecinas (Propiedades mecánicas) del Instituto de Investigación en Materiales, UNAM y al Dr. José Ocotlan Flores-Flores (FT-IR) del Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, LUCE_ICAT_UNAM.

A la laboratorista Xochitl Guerrero Alva del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra y a la laboratorista María Leticia Cruz Fonseca de la Facultad de Odontología, DEPeI, UNAM.

A la Dra. Santa Rita Cruz Arroyo y la Dra. María Verónica Cuevas González por su escucha, consejo, amistad y apoyo. A la Dra. Gina Prado Prone por su disposición para ayudarme en la realización de este proyecto; gracias por su compañía, orientación y amistad. Al Dr. Víctor García Pérez y en especial a las maestras Daniela Morquecho Marín y Lorena Reyes Carmona, por su apoyo y amistad, en especial por hacerme sentir parte de su equipo.

A mis padres por siempre brindarme todo su apoyo y confianza durante estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca nacional otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (CVU 630160). También al financiamiento otorgado por los proyectos CONACyT CB-2016-01 288101 y DGAPA-PAPIIT IT200319, IT20112, para la realización de esta tesis.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La periodontitis es una enfermedad inflamatoria, crónica y multifactorial asociada al desarrollo de biopelículas disbióticas y caracterizada por la destrucción progresiva de los tejidos periodontales. La Regeneración Tisular Guiada (RTG) es un procedimiento quirúrgico-clínico para la terapia periodontal que implica el uso de membranas para prevenir el crecimiento de células epiteliales en el defecto periodontal, permitiendo que las células del periodonto migren y regeneren el defecto. A pesar del éxito de las membranas utilizadas en tratamientos de RTG, la rápida degradación y las infecciones asociadas a la exposición de la membrana al medio oral, se consideran dos de las principales razones del fracaso clínico. Recientemente, el uso de materiales antimicrobianos alternativos al uso de antibióticos ha surgido como una estrategia novedosa para enfrentar el desafío de las infecciones bacterianas.

OBJETIVO. Elaborar membranas compuestas de policaprolactona (PCL) y gelatina (Gel) mediante la técnica de electrohilado adicionadas con subsalicilato de bismuto (SSB) y evaluar su capacidad antibacteriana y citotoxicidad *in vitro* para determinar su potencial uso en tratamientos odontológicos de RTG.

MATERIALES Y MÉTODOS. Mediante la técnica de electrohilado, se elaboraron membranas compuestas por PCL, Gel y tres concentraciones diferentes de SSB (2, 4 y 6 wt/v %) como agente antibacteriano. Las membranas desarrolladas se evaluaron en su morfología, composición, humectabilidad, propiedades térmicas, mecánicas, tasa de degradación y liberación de bismuto. Se estudió la citotoxicidad *in vitro* de las membranas utilizando osteoblastos humanos (hFOB) y fibroblastos gingivales humanos (HGF-1); y se evaluó su actividad antibacteriana utilizando *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* y *Staphylococcus aureus*.

RESULTADOS. Las membranas demostraron tener propiedades físico-químicas, y mecánicas adecuadas para la aplicación clínica, mientras que su tasa de degradación mostró ser apropiada para permitir la regeneración de defectos periodontales. Las pruebas biológicas y antibacterianas indicaron que las membranas eran biocompatibles para hFOB y HGF-1 y, en general, mostraron actividad antibacteriana contra las cuatro cepas de bacterianas probadas.

CONCLUSIONES. La caracterización físico-química, las pruebas mecánicas, la tasa de biodegradación, así como las pruebas biológicas y antibacterianas realizadas en las membranas experimentales, demostraron que cuentan con un gran potencial para tratamientos periodontales de RTG.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Periodontitis is a chronic multifactorial inflammatory disease associated with dysbiotic plaque biofilms and characterized by the progressive destruction of the periodontal tissues. The Guided Tissue Regeneration (GTR) is a clinical procedure for periodontal therapy involving the use of barrier membranes to prevent the ingrowth of epithelial cells into the tissue defect, allowing native cells to migrate and fill the defect. Despite the success of barrier membranes in GTR, rapid degradation of the membranes and membrane-related infections are considered two of the major reasons of clinical failure. Recently, the use of alternative antimicrobial materials has emerged as a novel strategy to face the bacterial infection challenge.

AIM. To fabricate polycaprolactone (PCL) and gelatin (Gel) composite membranes by electrospinning technique added with bismuth subsalicylate (BSS), in order to evaluate their antibacterial effect and biocompatibility *in vitro* to determine their potential use in GTR periodontal treatments.

MATERIALS AND METHODS. We developed by electrospinning technique GTR membranes, composed of PCL, Gel and using three different BSS concentrations (2, 4 and 6 wt./v %). The developed membranes were evaluated in their morphology, composition, wettability, thermal and mechanical properties, degradation rate and bismuth delivery. The biocompatibility of the membranes was studied *in vitro* using human osteoblast (hFOB) and human gingival fibroblasts (HGF-1), and their antibacterial activity was tested against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* and *Staphylococcus aureus*.

RESULTS. The membranes exhibited adequate mechanical properties for clinical application, while their degradation rates showed to be appropriate for allowing periodontal defects regeneration. Biological and antibacterial tests indicated that the membranes were biocompatible for hFOB and HGF-1, and, in general, displayed antibacterial activity against the four bacteria strains tested.

CONCLUSIONS. The physical-chemical characterization of the experimental membranes, the mechanical properties and biodegradation rate, as well as the biological and antibacterial tests, showed that the experimental membranes have the potential for being used in GTR periodontal treatments.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal comprende una amplia gama de afecciones inflamatorias. El inicio y propagación de la enfermedad periodontal se produce a través de una disbiosis de la microbiota oral que se acumula en el surco gingival, afectando los tejidos de soporte del diente (Kinane, Stathopoulou & Papapanou, 2017).

Histológicamente podemos hallar pérdida de fibras de colágenas, una elevada concentración de leucocitos polimorfonucleares en la unión y bolsa epitelial, y una migración del infiltrado inflamatorio hacia el tejido conectivo (Meyle & Chapple, 2015; Zappa, 1995). Sus principales manifestaciones clínicas incluyen sangrado, movilidad dental, recesión gingival, formación de bolsa periodontal, disfunción masticatoria, y puede llevar a la pérdida del diente (Lindhe & Lang, 2017). Para entender la enfermedad, es necesario comprender la composición y funcionamiento de los tejidos periodontales.

1.1.1 Tejidos periodontales.

Están conformados por cuatro tejidos, dos tejidos blandos (encía y ligamento periodontal) y dos tejidos duros (cemento y hueso alveolar)(Nanci & Bosshardt, 2006).

La principal característica de estos tejidos es su capacidad de funcionar en forma integral, manteniendo la homeostasis de los órganos dentarios. Brindan protección contra agentes patógenos externos, actúan como amortiguador de las fuerzas masticatorias dispersándolas e impidiendo la reabsorción de los tejidos duros y además participan en la inervación, irrigación y vascularización de los dientes(Newman, Takei, Klokkevold & Carranza, 2014).

1.1.1.1 Encía.

La encía es una porción de la mucosa oral que cubre el hueso alveolar y el cuello de los órganos dentarios, a los que se adhiere a través de la unión dentogingival (Nanci & Bosshardt, 2006). Se puede clasificar en encía libre, encía interdental y encía insertada. Cumple la función principal de proteger los dientes de las fuerzas de masticación y de abrasión. En estado de salud periodontal, el margen gingival forma un sello hermético del medio exterior a partir de la unión cemento-esmalte, evitando que los microorganismos de la biopelícula dental penetren más allá de esta zona (Gomez, Dutra & Moreira, 2009).

Histológicamente el epitelio que compone la encía muestra variaciones morfológicas de acuerdo con la ubicación. La mayoría es epitelio plano queratinizado o paraqueratinizado, a excepción del epitelio de unión que se encuentra en contacto directo con el diente, el cual es un epitelio plano estratificado no queratinizado. Estas células epiteliales tienen una mayor capacidad proliferativa que permite una descamación constante. Además, conforman una membrana basal interna que está en contacto directo con el diente y una membrana basal externa que está en contacto directo con el tejido conectivo gingival, cumpliendo funciones de compartimiento, permeabilidad selectiva, adhesión y migración celular (Bosshardt & Lang, 2005).

1.1.1.2 Ligamento periodontal.

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado ubicado entre el cemento radicular y el hueso alveolar formando un espacio virtual (Nanci & Bosshardt, 2006). Está conformado por diversos tipos de células y matriz extracelular colágena y no colágena. Entre las células que lo conforman están los fibroblastos, células epiteliales de Malassez, monocitos, macrófagos, células mesenquimales indiferenciadas, osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos y odontoclastos (Xiong, Gronthos & Bartold, 2013).

La matriz extracelular está compuesta por fibras de colágena embebidas en un material conocido como sustancia fundamental (proteoglicanos, glicoproteínas, factores de crecimiento, citocinas y metaloproteinasas). Estas fibras de colágena pueden clasificarse por su disposición en: fibras de la cresta alveolar, fibras horizontales, fibras oblicuas y fibras apicales (Lindhe & Lang, 2017; Xiong et al., 2013). La principal función del ligamento periodontal es dar soporte al diente y al mismo tiempo permitirle distribuir las fuerzas de masticación. Además, tiene la capacidad de actuar como un receptor sensorial necesario para posicionar los maxilares durante la masticación y más importante actúa como reservorio celular para la homeostasis, regeneración y reparación tisular (Lindhe & Lang, 2017).

En los años 70's, Anthony Melcher desarrolló una teoría sobre el papel central del ligamento periodontal en la regeneración de la zona. Observó que, en defectos periodontales, si el epitelio prolifera a lo largo de la superficie dental antes de que otros tejidos lleguen al área, el resultado es un epitelio de unión largo, en cambio, si las células del tejido gingival son las primeras en poblar el área, resultan fibras paralelas a la superficie dental y la remodelación del hueso alveolar no tiene inserción en el cemento. Por otro lado, si las células óseas llegan primero, puede presentarse una reabsorción radicular y anquilosis (Melcher, 1976). Solo cuando las células del ligamento

periodontal proliferan coronalmente hay una formación de ligamento y cemento radicular (Melcher, Feng & Chan, 1976). Es así como se describió por primera vez el potencial de regeneración de las células provenientes del ligamento periodontal.

1.1.1.3 Cemento radicular.

El cemento es un tejido conectivo avascular mineralizado que cubre por completo la superficie radicular del diente; forma una interfaz entre la dentina radicular y el ligamento periodontal (Bosshardt & Lang, 2005; Gomez et al., 2009). Este tejido juega un papel importante en la nutrición y estabilización del diente a través del ligamento periodontal. También permite mantener la relación con los dientes adyacentes.

A diferencia del hueso, el cemento radicular no tiene vasos sanguíneos o linfáticos, inervación, remodelación o resorción fisiológica; sin embargo, se caracteriza por la continua deposición a través de la vida (Lindhe & Lang, 2017). El cemento se compone 50% de material mineral, principalmente fosfato de calcio presentado como cristales de hidroxiapatita, y 50% de matriz orgánica, el 90% compuesta por colágena tipo I, el resto por colágenas tipo III, V, VI, XII y XIV, además de proteínas no colágenas como sialoproteína ósea, proteína de matriz de dentina, sialoproteína dentinaria, osteocalcina, fibronectina, osteopontina y proteínas cemento específicas (proteína de adhesión del cemento y la proteína del cemento 1) (Bosshardt, Stadlinger & Terheyden, 2015; Newman et al., 2014).

Además, contiene factores de crecimiento como factor de crecimiento transformante beta y la proteína morfogénica ósea 2, glucosaminoglucanos y un 32% de agua (Bosshardt et al., 2015; Cho & Garant, 2000).

Entre las funciones del cemento están, mantener ancladas las fibras del ligamento periodontal a la superficie radicular y contribuir al proceso de reparación cuando la superficie radicular está dañada (Lindhe & Lang, 2017).

El cemento puede ser clasificado como celular y acelular dependiendo de la presencia de cementocitos y se ubica de acuerdo con la presencia de fibras intrínsecas o extrínsecas formadas por los cementoblastos o fibroblastos. Existen diferentes formas de cemento: el cemento afibrilar acelular, fibras extrínsecas del cemento acelular, cemento celular mixto estratificado y fibras intrínsecas del cemento celular (Lindhe & Lang, 2017; Nanci & Bosshardt, 2006).

1.1.1.4 Hueso alveolar.

El hueso alveolar junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal constituye el sistema de inserción dental, que tiene como principal función distribuir las fuerzas generadas por la masticación y otros contactos dentales (Nanci & Bosshardt, 2006). El hueso alveolar de los maxilares se puede subdividir en tablas alveolares libres (vestibular, palatina y lingual) y tabiques alveolares (interdentario o interradicular), y se estructura por dos capas de hueso cortical separadas por hueso esponjoso (Gulabivala & Ng, 2014).

Está conformado por un 65% de materia inorgánica en forma de cristales de hidroxiapatita y un 35% de materia orgánica, principalmente colágena tipo I en un 90% y en menor medida colágena tipo III. Numerosos factores sistémicos y locales regulan su metabolismo como la 1,25 dihidroxivitamina D, la hormona paratiroidea (PTH), las interleucinas 6 y 11 (IL-6 e IL-11), el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β s), el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL), el factor de diferenciación de osteoclastos (ODF), las proteínas morfogénicas óseas 2, 4 y 7 (BMPs-2, -4, -7) (Sims & Vrahnas, 2014).

Las superficies inorgánicas del hueso están revestidas por osteoblastos. En la matriz mineral encontramos a los osteocitos, y los responsables de la reabsorción del hueso son los osteoclastos (Newman et al., 2014).

1.1.2 Etiología.

La etiología de la enfermedad periodontal es multifactorial ya que es producida por la interacción de microorganismos patógenos considerados como el factor etiológico primario necesario, pero no suficiente, un huésped susceptible y factores ambientales que influyen sobre ambos (Slots, 2017).

Se ha reportado que todos los tipos de enfermedad periodontal están asociados a la presencia de microorganismos patógenos en la biopelícula subgingival, principalmente especies anaerobias Gram negativas, que colonizan y proliferan en el tejido periodontal, esto sumado a la susceptibilidad del hospedero. El resultado, en el caso de la periodontitis, es la formación de una bolsa periodontal y una reacción inflamatoria del tejido dañando estructuras del periodonto (Papapanou & Susin, 2017).

La enfermedad periodontal con mayor impacto nocivo en la salud del individuo es la periodontitis la cual afecta a más del 50% de los adultos a nivel mundial; sin embargo, también

puede presentarse en adolescentes y niños (Kinane et al., 2017). Es un importante problema de salud pública, causando pérdida dental, discapacidad y un estado nutricional deficiente en el individuo que la padece. La periodontitis compromete el habla, reduce la calidad de la vida y es una carga creciente para la economía (Chapple et al., 2015).

Adicionalmente, existe evidencia que vincula a la periodontitis con otras enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cardiovascular y ciertos tipos de cáncer, entre otras. Por consiguiente esta patología es considerada según la Organización Mundial de la Salud, como uno de los dos principales problemas de salud bucal a nivel mundial (Petersen & Baehni, 2012; Petersen & Ogawa, 2012). Además, la distribución de esta enfermedad muestra una fuerte asociación con desigualdades sociales debido a que afecta en mayor proporción a los grupos con desventajas de tipo social y económico (Sischo & Broder, 2011).

1.1.3 Terapia periodontal.

La terapia de pacientes con enfermedad periodontal se divide en tres fases diferentes de tratamiento. La primera fase (Fase inicial) va dirigida a controlar la enfermedad y tiene como objetivo detener la progresión de la destrucción de los tejidos periodontales. El raspado y alisado radicular es, en la mayoría de los casos, junto con instrucciones de higiene oral, la terapéutica utilizada.

La segunda fase (Fase correctiva), está dirigida a establecer la función y la estética, el objetivo de esta fase es crear acceso para el desbridamiento de las superficies radiculares infectadas y establecer una morfología gingival adecuada que facilite el autocontrol de la biopelícula por parte del paciente, pretendiendo así mejorar el pronóstico de sus dientes a largo plazo (Falcao & Bullon, 2019; Lindhe & Lang, 2017). Involucra el uso de técnicas quirúrgicas como gingivoplastia, gingivectomía, colgajo periodontal, procedimientos de cuña distal, cirugía ósea y procedimientos quirúrgicos regenerativos que incluyen técnicas como la regeneración tisular guiada (Alshams, Othman, Haddad & Abou Sulaiman, 2019; Lindhe & Lang, 2017). Las técnicas periodontales quirúrgicas deben evaluarse cuidadosamente basándose en su potencial para facilitar la eliminación de los depósitos subgingivales, así como para facilitar el autocontrol de la biopelícula y mejorar la preservación del periodonto (Falcao & Bullon, 2019).

Después de haber completado tanto la fase inicial como la correctiva, los pacientes pasan a una tercera fase de soporte periodontal (Fase de mantenimiento) caracterizada por la adopción de medidas para prevenir la reaparición de la enfermedad periodontal (Heitz-Mayfield & Lang, 2013).

1.2 Regeneración Tisular Guiada (RTG).

La RTG es una técnica quirúrgica empleada para restaurar el tejido periodontal dañado directamente en el sitio del defecto. Esta técnica se basa en el uso de membranas que, en conjunto con biomateriales de relleno óseo, guían el crecimiento de los tejidos periodontales dañados (Ferris, 1998). La RTG consiste en la implantación mediante cirugía de una membrana entre el defecto periodontal en reparación del tejido gingival (epitelio y tejido conectivo) y el hueso alveolar en crecimiento, de manera que la membrana se desempeña como una barrera para prevenir la infiltración de las células del tejido gingival en el sitio de regeneración ósea, permitiendo así la regeneración del tejido óseo y periodontal (Raina et al., 2019).

1.2.1 Principios de la RTG.

La técnica de regeneración tisular guiada se basa principalmente en los datos reportados por Melcher en 1976. Donde describe que la inserción del tejido periodontal a la raíz después de la cirugía periodontal estaba determinada por el tipo de células que se adhieren primero a la superficie radicular. De este modo, Melcher consideró que eran cuatro tipos de células las que podían repoblar la zona luego de la cirugía periodontal: células epiteliales, células derivadas del tejido conectivo gingival, células derivadas del hueso y células derivadas del ligamento periodontal. Bajo este principio se desarrollan las técnicas de regeneración tisular guiada (McCulloch, 1999).

Es así que la RTG puede ser definida como una técnica que involucra la utilización de una membrana de barrera (Danesh-Meyer & Wikesjo, 2001). El propósito de esta barrera física es evitar la migración apical del tejido conjuntivo gingival y del epitelio oral lejos de la superficie de la raíz y crear un espacio protegido sobre el defecto óseo que permita a las células restantes del ligamento periodontal repoblar selectivamente la superficie de la raíz (Needleman, Tucker, Giedrys-Leeper & Worthington, 2002).

Las funciones que desempeñan las membranas son: soporte y aislamiento de los tejidos blandos, creación de un espacio ocupado por el coágulo, exclusión de células no osteogénicas y acumulación de factores locales de crecimiento y de sustancias que favorecen la formación de hueso (Raina et al., 2019).

Las membranas pueden ser no reabsorbibles o reabsorbibles. Dentro del grupo de las no reabsorbibles tenemos a las membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) y politetrafluoretileno denso (d-PTFE). Las membranas reabsorbibles pueden ser fabricadas con polímeros naturales o sintéticos (Bottino et al., 2012).

Para que la RTG tenga éxito se debe conocer: la anatomía dentaria, el tipo de defecto óseo, los factores y bases biológicas de los tratamientos; así como los factores sistémicos de los pacientes (Bartold, Gronthos, Ivanovski, Fisher & Hutmacher, 2016).

La RTG requiere de materiales que cumplan con ciertas características estructurales y funcionales, por lo tanto, el material usado debe ser:

- Biocompatible.
- Oclusivo.
- No tóxico.
- Biodegradable.
- Flexible.
- Antibacteriano.

1.2.2 Contaminación bacteriana asociada al fracaso en tratamientos de RTG.

La exposición de las membranas al medio oral propicia la contaminación bacteriana. Se ha demostrado que las bacterias orales pueden colonizar las membranas a los 3 minutos de manipulación intraoral, propiciando la contaminación desde el procedimiento quirúrgico de colocación de la membrana (Ling, Hung, Lee, Chen & Wu, 2003). Durante el proceso de regeneración, el espacio entre la superficie externa de la membrana y el tejido gingival permite que las bacterias colonicen el área subgingival (MacDonald et al., 1998).

La contaminación se relaciona estrechamente con el fracaso del tratamiento, debido a que disminuye la capacidad del material para funcionar como membrana propiciando el colapso de los tejidos periodontales. Principalmente se relaciona con la presencia y recuentos altos de bacterias como *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (DeSanctis, Zucchelli & Clauser, 1996).

La acumulación de bacterias sobre las membranas para RTG puede formar una biopelícula de grosor variable, la cual contiene bacterias formadoras de matriz bacteriana, células inflamatorias, células epiteliales y eritrocitos; ocasionalmente pueden observarse algunas islas de cálculo (Ling et al., 2003).

Algunos reportes indican que las bacterias colonizan inicialmente la porción expuesta de la membrana y posteriormente se extienden hacia la porción no expuesta. Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran la presencia de bacterias aerobias y anaerobias como: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Selenomonas sputigena*,

las cuales forman una biopelícula sobre las membranas para RTG en un periodo de 3 días (Machtei, 2001)). También se ha descrito que existe diferencia entre la cantidad de las bacterias acumuladas en las membranas dependiendo del tipo de material con que están elaboradas, haciendo hincapié en características como la textura y propiedades de la superficie (MacDonald et al., 1998). Estos estudios indican la importancia de controlar o eliminar la contaminación bacteriana durante los procedimientos de RGT (Machtei, 2001).

1.2.3 Estrategias para la inhibición de bacterias en tratamientos de RTG.

Después de realizar procedimientos de RTG se prescriben antibióticos sistémicos para prevenir infecciones; sin embargo, este efecto no es totalmente predecible ya que aun con la terapia antibiótica existe la posibilidad de presentar infecciones persistentes que conducen al fracaso del tratamiento y a la pérdida dental (Shi et al., 2019).

Otra estrategia utilizada en la RTG para inhibir el crecimiento bacteriano, es la aplicación local de soluciones antibióticas o antisépticas, por medio de irrigación, gel o fibras; por ejemplo: la irrigación con tetraciclina, doxiciclina y clorhexidina en la zona de intervención (Bottino et al., 2012).

También, se han desarrollado algunas membranas que contienen antibióticos como: metronidazol, doxiciclina, tetraciclina y amoxicilina que han mostrado éxito contra la presencia de agentes periodontopatógenos como *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, aumentando el nivel de inserción clínica hasta 2 mm aumentando así el éxito del tratamiento (He, Jiang, Wang, Xie & Zhao, 2017; Lee et al., 2008; Shi et al., 2019; Xue, He, Liang, et al., 2014; Xue, He, Liu, et al., 2014).

Sin embargo, los antibióticos pueden producir efectos secundarios importantes, se ha reportado que las bacterias se están volviendo resistentes a varias terapias con antibióticos (Abe, Bergamaschi, Figueiro & Lopes, 2018; Stein et al., 2018).

1.3. Membranas utilizadas en la RTG.

Las membranas que han sido utilizadas como barreras quirúrgicas para RTG en terapia periodontal, se clasifican por su composición en (Ausenda, Rasperini, Acunzo, Gorbunkova & Pagni, 2019):

- *Membranas no reabsorbibles:*
 - a) *Celulosa.*
 - b) *Politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) con o sin reforzamiento de titanio.*

c) *Politetrafluoroetileno denso (d-PTFE).*

d) *Politetrafluoroetileno de alta densidad con reforzamiento de titanio (Ti-d-PTFE).*

- *Membranas reabsorbibles:*

a) *Naturales.*

b) *Sintéticas.*

- *Membranas híbridas.*

Membranas no reabsorbibles.

Históricamente, fueron las primeras membranas en utilizarse para RTG hechas a partir de acetato-celulosa (Millipore®) (Melcher, 1976). Sin embargo, por sus limitadas propiedades clínicas, las membranas de e-PTFE fueron desarrolladas. El e-PTFE tiene una estructura porosa que permite el crecimiento tisular y sus propiedades mecánicas le permiten crear poros microestructurados al expandirse tras exponerse a altas fuerzas de tensión. Además, este material ha demostrado ser biocompatible y resistente a la degradación enzimática. Por otro lado, el d-PTFE es un polímero sintético no poroso que no permite el crecimiento tisular, así que junto con las barreras elaboradas de Ti-d-PTFE solo se utiliza para elaborar membranas que permitan mantener el espacio del defecto (Ausenda et al., 2019).

Membranas reabsorbibles.

Las membranas reabsorbibles son fabricadas a partir de polímeros naturales (colágena) o sintéticos (poli-ácido láctico o poli-ácido glicólico) (Susin & Wikesjo, 2013). La mayor ventaja de este tipo de membranas es que no requieren de una intervención quirúrgica para removerlas, lo cual reduce la morbilidad y el riesgo de daño tisular, además de disminuir tiempo y costos (Ausenda et al., 2019).

Las membranas fabricadas a partir de colágena permiten una buena integración tisular, vascularización, hemostasia y promueven la migración de fibroblastos del ligamento periodontal (Rasperini, Acunzo, Barnett & Pagni, 2013).

Dentro de las limitaciones que presentan este tipo de membranas son su grado impredecible de reabsorción, sus bajas propiedades mecánicas que las hacen susceptibles a la ruptura, colapsando y perdiendo su habilidad como barrera (Susin & Wikesjo, 2013). El mayor obstáculo para este tipo de membranas es su tasa de degradación, la cual depende principalmente

de su origen (bovino, porcino, humano). Para evitar el colapso y retrasar la tasa de degradación, las membranas de colágena se entrecruzan por medio de procesos químicos (Bottino et al., 2012).

Membranas híbridas.

Estas membranas combinan polímeros naturales y sintéticos que mejoran las propiedades mecánicas y biológicas de las membranas para RTG (Ausenda et al., 2019).

Se ha propuesto la elaboración de membranas híbridas a partir de técnicas de electrohilado o impresión 3D utilizando materiales como carbonato de trimetileno, quitosano recubierto de hidroxiapatita y ácido poliláctico-co-glicólico (Bottino et al., 2012).

1.3.1 Membranas fabricadas por la técnica de Electrohilado.

La técnica de electrohilado consiste en someter soluciones poliméricas a campos eléctricos intensos que permite obtener fibras. Esta técnica es versátil ya que se puede modificar la orientación de las fibras (ordenadas o al azar), el tipo de polímero (natural y/o sintético), se pueden fabricar multicapas de fibras de diferentes polímeros o combinaciones para ampliar las aplicaciones, e inclusive elaborar fibras compuestas como las fibras coaxiales (Persano, Camposeo & Pisignano, 2017).

El equipo de electrohilado consta de un capilar (aguja) a través del cual es expulsada la solución polimérica, una bomba de inyección que dispensa la solución polimérica a cierta velocidad y una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al lugar de salida de la solución y otro directamente al plato colector (elaborada de un metal conductor) donde se depositarán las fibras tras la evaporación del disolvente. Es recomendable que el disolvente solubilice completamente al polímero, presente alta conductividad y constante dieléctrica y sea volátil (Tan & Zhou).

Para la obtención de las fibras poliméricas, las cargas eléctricas se acumulan promoviendo la formación de una gota en la punta del capilar. A medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota se alarga para crear una forma cónica conocida como cono de Taylor (Rodríguez-Tobias, Morales & Grande, 2019). Cuando la fuerza del campo eléctrico supera las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado, el polímero es expulsado desde la punta del capilar hasta el plato colector. Durante el recorrido de la fibra, el disolvente se evapora y finalmente las fibras se solidifican a su llegada al plato colector formando membranas fibrilares (Persano et al., 2017).

Las ventajas de la técnica de electrohilado son: bajo costo, sencillez, escalabilidad y adaptabilidad, permitiendo la fabricación de fibras de escala nanométrica hasta micrométrica que semejan la estructura y porosidad de la matriz extracelular. Estas propiedades pueden ser modificadas dependiendo de tres grupos de parámetros señalados en la **tabla 1** (Barnes, Sell, Boland, Simpson & Bowlin, 2007).

Tabla 1. Parámetros del electrohilado que influyen en las propiedades de las membranas.

Parámetro	Característica
Propiedades de la solución:	Viscosidad, conductividad, peso molecular, tensión superficial.
Condiciones de producción:	Campo eléctrico aplicado, distancia entre aguja y colector, velocidad de flujo.
Condiciones ambientales:	Humedad, temperatura y presión.

Para la elaboración de membranas de RTG por la técnica de electrohilado se han utilizado una variedad de polímeros como lo muestra la **tabla 2** (Aldana & Abraham, 2017; Li et al., 2014; Zhuang, Lin & Yu, 2019)).

Tabla 2. Polímeros electrohilados para la fabricación de membranas de RTG.

Polímeros Naturales	Polímeros Sintéticos
Colágena	Ácido Poliglicólico
Gelatina	Policaprolactona
Quitosano	Ácido poli-láctico-co-glicólico
Celulosa	Poli (butyleno succinateco-glicolato)
Fibrina	Óxido Polietileno
	Polivinil Alcohol

1.3.2 Policaprolactona (PCL).

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático, que se obtiene mediante la polimerización por apertura de anillo de la ϵ -caprolactona, con el uso de octoato de estaño como catalizador. Es un polímero semicristalino, que tiene un peso molecular variable entre 3,000 y

80,000 g/mol. Tiene una temperatura de fusión baja, alrededor de 55-60 °C, y una temperatura de transición vítrea de -60 °C (Gill & Gwathmey, 2018).

La PCL cuenta con la aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos para ciertas aplicaciones en humanos, incluyendo suturas, dispositivos de liberación de fármacos, recubrimiento de heridas y dispositivos de fijación ortopédica (Mochane, Motsoeneng, Sadiku, Mokhena & Sefadi, 2019).

También se ha utilizado la PCL para la fabricación de reemplazo de tejidos como hueso, cartílago, tendones, sistema cardiovascular, piel y nervios, esto debido a sus propiedades físicas y mecánicas, ya que resiste fuerzas de tracción de entre 12 y 30 MPa, es fácil de obtener y puede combinarse con otros polímeros sintéticos o naturales. Otra característica importante de la PCL es su lenta velocidad de degradación en comparación con otros polímeros sintéticos (Abedalwafa, Wang, Wang & Li, 2013).

1.3.3 Gelatina (Gel).

La gelatina (Gel) es una proteína soluble obtenida por la hidrólisis parcial de la colágena, por lo cual, la colágena es calentada en agua a temperaturas superiores a 45 °C, este procedimiento rompe los enlaces no covalentes, posteriormente se emplea otro tratamiento térmico para romper los enlaces covalentes y los puentes de hidrógeno para desestabilizar la triple hélice, dando como resultado la transición de hélice a hebras y con esto la obtención de la gelatina (Gomez-Guillen, Gimenez, Lopez-Caballero & Montero, 2011).

Dependiendo del pretratamiento que se le dé a la colágena, ácido o básico, se pueden obtener dos tipos de Gel: tipo A y tipo B. La gelatina tipo A se obtiene por un pretratamiento ácido con un punto isoeléctrico de 7-9, por este método se obtienen pequeñas cantidades de cadenas α . Por otro lado, la gelatina tipo B se obtiene por un tratamiento alcalino con un punto isoeléctrico de 4-5.5, mediante este procedimiento se desnaturalizan las cadenas α en solución (Gorgieva & Kokol, 2011).

La gelatina es el producto de la hidrólisis de la colágena que contiene todos los aminoácidos esenciales, excepto el triptófano. Es un polímero natural, de alto peso molecular, reabsorbible, fácil de obtener, no tóxico, y a diferencia de la colágena, es de bajo costo y no es antigénica (Gomez-Guillen et al., 2011). La gelatina, conserva los motivos RGD (arginina-glicina-aspartato), los cuales activan vías de señalización intracelular para activar la proliferación, diferenciación y migración

celular, por lo tanto, es un material con gran potencial para la fabricación de membranas para RTG (Gaspar-Pintiliescu, Stanciuc & Craciunescu, 2019).

1.4. Bismuto (Bi).

El bismuto fue uno de los primeros 10 metales descubiertos. Su nombre se deriva del inglés bismuth, que a su vez proviene de los términos alemanes weisse masse, que significa “masa blanca” (Hampel & Gerards, 1973). Es un metal blanco cristalino, quebradizo con matices rosados, es insoluble en agua, pero puede disolverse en ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrado a temperaturas altas. Es un elemento que se encuentra en el grupo VA, con el número atómico 83, tiene una masa molar de 208.98 g/mol y su punto de fusión es de 271.4 °C (Otálora Barrero, 2014).

Se encuentra en el lugar número 73 en abundancia terrestre, la mayor parte del Bi procede de los subproductos del refinado de metales como plomo, cobre, estaño, plata y oro, y se purifica por refinación electrolítica (Gitsu, Muntyanu & Fedorko, 1970).

México ocupa el tercer lugar a nivel mundial como productor de este metal, aportando el 6.86% del total global. Pasta de Conchos, Coahuila es el estado minero de Bi. Las especies de bismuto que se han reconocido en México son: el bismuto nativo, bismuto sulfurado, bismuto telurado, seleniuro de bismuto, ocre y carbonato de bismuto (INEGI 2010). Además, el Bi posee la designación de "elemento verde" porque puede sustituir en casi todos los usos al plomo y al cadmio, ya que éstos son muy tóxicos y contaminantes (Gitsu et al., 1970).

El bismuto es un metal diamagnético y tiene la conductividad térmica más baja de los metales después del mercurio. Así mismo, se emplea como aditivo en la fundición de acero y aluminio y como aleación fusible para la fabricación de maquinarias especiales y herramientas para el control de incendio, catalizadores, pigmentos y electrónica (Iram et al., 2019).

En el área de la medicina, se han utilizado compuestos de bismuto como agentes antimicrobianos, por su alta efectividad y baja toxicidad en tratamientos para infecciones microbianas del sistema gastrointestinal, que incluyen diarrea, gastritis y colitis (Iram et al., 2019). Se ha demostrado el efecto antibacteriano que tiene el bismuto en dispersiones coloidales otorgando protección antimicrobiana en la superficie de dispositivos biomédicos contra especies como *Staphylococcus* sp. y en *Pseudomonas aeruginosa* (Schindler et al., 2010).

1.4.1 Compuestos de bismuto con actividad antimicrobiana.

Dentro de los compuestos de bismuto que se consideran para el tratamiento de infecciones gastrointestinales causadas por *Helicobacter pylori*, se usan compuestos como el subsalicilato de bismuto ($C_7H_5BiO_4$) (PeptoBismol®), subcitrato de bismuto coloidal ($BiC_{12}H_{14}K_2O_{17}$) (CBS, DeNol®) y citrato de bismuto (ranitidina $C_6H_5BiO_7$) (RBC, Tritec® y Pylorid®) (Yang & Sun, 2007). La combinación de estas sales de bismuto con antibióticos como claritromicina y metronidazol, se ha utilizado para combatir infecciones de cepas bacterianas resistentes durante largos periodos de tiempo con gran éxito (Salvador, Figueiredo, Pinto & Silvestre, 2012). Por su capacidad de aumentar el efecto antibiótico, reducir virulencia y presentar una baja toxicidad, son consideradas una alternativa prometedora para combatir la resistencia bacteriana causada por el uso de antibióticos (Pitz, Park, Lee, Boissy & Vinje, 2015; R. M. Wang et al., 2018).

Algunas sales básicas de bismuto como el subgalato de bismuto y el subnitrito de bismuto se emplean por sus propiedades astringentes, germicidas y antiácidas. También se ha descrito que una pequeña cantidad de ión bismutilio (BiO^+) presenta un efecto antiséptico (Pasha, Hosseini, Fakhri, Gupta & Agarwal, 2019).

En el organismo, el BiO^+ reacciona con el sulfuro de hidrógeno (H_2S), formado por la degradación de las proteínas en el intestino, y produce Bi_2S_3 , una sal insoluble de color oscuro. En consecuencia, se observan heces negras, siendo su principal vía de excreción. Otros efectos de su consumo y metabolismo incluyen pigmentación oscura en la mucosa del colón (Nordberg, Fowler & Nordberg, 2014).

También tenemos a los tioles de bismuto, que son una familia de compuestos considerados agentes antimicrobianos con gran potencial para inhibir la formación de biopelículas. Su principal componente activo es el bismuto; sin embargo, su componente orgánico le confiere diversas propiedades (Folsom, Baker & Stewart, 2011; Mahony, Woods, Eelman, Burford & van Zanten, 2005). Estos compuestos pueden contener sulfhídrido, metionina, cisteína, ácido lipoico, ácido salicílico, entre otros. Por lo tanto, cada tiol de bismuto tiene propiedades biológicas únicas dependiendo de su composición, puede ser bacteriostático o bactericida, ácido o alcalino, hidrofílico o hidrofóbico, presentar mayor capacidad antibacteriana, antifúngica o también antiviral (Luqman et al., 2014).

Estos compuestos han mostrado una potente actividad antimicrobiana inhibiendo la formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*

y especies de *Burkholderia* (Domenico et al., 2001; Domenico, Tomas, Merino, Rubires & Cunha, 1999; Varposhti, Ali & Mohammadi, 2014; Velloira et al., 2003).

1.4.2 Subsalicilato de bismuto (SSB).

El subsalicilato de bismuto (SSB) es un polvo blanco insoluble en agua, compuesto por un núcleo de óxido de bismuto trivalente unido a iones de salicilato (Burford, Eelman & Cameron, 2002).

El SSB pertenece al grupo de los organometálicos, formados por benzenoides, considerado un tiol de bismuto, su fórmula química es $C_7H_5BiO_4$ y se obtiene por hidrólisis de salicilato de Bi. La estructura real es desconocida y la formulación es sólo aproximada. Cada molécula está compuesta aproximadamente de 58% de salicilato y 42% de Bi en peso (Berkowitz, 1990).

En el área médica se ha utilizado desde hace más de 100 años en compuestos como el Pepto Bismol® por su capacidad antimicrobiana y efectividad clínica en la prevención y tratamiento de un gran número de infecciones gastrointestinales, incluyendo la diarrea del viajero y la gastritis asociada con *Helicobacter pylori* (Manhart, 1990).

Debido a la específica sensibilidad de *Helicobacter pylori* al SSB la investigación de este compuesto se amplió, comprobando su eficacia contra otras cepas bacterianas como: *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* (Alharbi et al., 2012; Cornick, Silva & Gorbach, 1990; Pitz et al., 2015; Sox & Olson, 1989), *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae Inaba*, *Vibrio cholerae Ogawa*, *Vibrio cholerae Eltor*, *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* (Manhart, 1990), *Helicobacter pylori* (Gisbert, 2011), *Desulfovibrio desulfuricans* (Barton et al., 2019), *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces israelii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo *b* (A.a b), *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* (Vega-Jimenez et al., 2017). También es efectivo inhibiendo el crecimiento de hongos como *Candida albicans* (Alharbi et al., 2012); además se ha sugerido que es capaz de interrumpir la replicación viral de rotavirus y norovirus, microorganismos responsables de enfermedades estomacales severas (Pitz et al., 2015; Ward, Sander & Knowlton, 1985).

Después de ser ingerido, el SSB es hidrolizado en el estómago por acción de los ácidos estomacales, descomponiéndose en salicilato y en oxiclورو de bismuto. El salicilato liberado tiene

una acción antisecretora, antiinflamatoria y antibacteriana; se absorbe en un 90% y es excretado por la orina (Bierer, 1990; Hellmig, Stuber, Katsoulis & Folsch, 2002). El oxiclورو de bismuto se descompone en iones bismutilo que interaccionan con el azufre excretado por algunas bacterias convirtiéndose en sulfuro de bismuto, todos estos compuestos en conjunto ejercen una acción bactericida. El bismuto se absorbe en mínima cantidad, la mayor parte es excretado por las heces en forma de sulfuro de bismuto provocando oscurecimiento temporal en heces y mucosas (Andre et al., 2011; Hellmig et al., 2002; Salvador et al., 2012).

El mecanismo de acción del SSB no está completamente descrito; sin embargo, se sugiere que el éxito al tratar enfermedades estomacales se debe al efecto conjunto de los compuestos obtenidos después de la descomposición ácida del SSB en el estómago (Ioannou, 2014). Se han propuesto diferentes mecanismos, por ejemplo, la inhibición de la formación de biopelícula, al interferir con el transporte de hierro que es esencial en la producción de ATP y en las enzimas reductoras involucradas en la expresión de exopolisácaridos de bacterias (Barton et al., 2019; Pasha et al., 2019; Shakibaie et al., 2018). También se ha propuesto otro mecanismo, basado en el efecto inhibitorio de *Helicobacter pylori* que consiste en la unión del bismuto a la subunidad F₁ de la ATP sintetasa, afectando su sistema de respiración y obtención de energía, inhibiendo directamente el crecimiento de la bacteria (Beil, Birkholz, Wagner & Sewing, 1995; Bland, Ismail, Heinemann & Keenan, 2004).

Actualmente se sigue considerando al SSB, un agente antimicrobiano efectivo y seguro para tratar enfermedades infecciosas del aparato digestivo (Leun, Leung, Wong & Hon, 2019).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Debido al impacto que tiene la progresión de la enfermedad periodontal afectando la morfología, estética y fisiología de los tejidos de soporte del diente, se han buscado diferentes alternativas para poder restaurar dichos defectos, facilitando su regeneración y evitando así la pérdida de los dientes.

Los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de nuevos biomateriales que permiten sustituir tejidos especializados. En los tratamientos periodontales de RTG el uso de las membranas está enfocado a la utilización de membranas oclusivas que actúan como una barrera física para evitar que el tejido epitelial invada el espacio del defecto periodontal.

A pesar de que los tratamientos periodontales de RTG han utilizado diferentes tipos de membranas con éxito, las infecciones debido a su exposición al ambiente oral se consideran la principal causa del fracaso. Los problemas generados cuando se infecta la membrana de RTG, van desde dolor agudo, fiebre y daño tisular del sitio, pudiendo desencadenar la pérdida dental. Por eso se han elaborado membranas cargadas con antibióticos; sin embargo, la rápida liberación del medicamento además de la aparición de bacterias multirresistentes a los antibióticos, han demostrado la ineficiencia de estas membranas.

Debido a esto, se necesita desarrollar nuevas estrategias en la elaboración de membranas que permitan guiar la respuesta celular y que tengan propiedades antimicrobianas para lograr el éxito de estos tratamientos, utilizando agentes antibacterianos alternativos al uso de los antibióticos convencionales. De esta manera surge la propuesta de utilizar materiales con propiedades antibacterianas, no tóxicos y seguros para la práctica clínica.

En este proyecto de investigación proponemos la elaboración de membranas electrohiladas utilizando una mezcla polimérica híbrida para permitir la regeneración de los tejidos periodontales, y adicionarlas con compuestos que tengan propiedades antimicrobianas, favoreciendo el éxito del tratamiento.

Derivado de lo anterior, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Las membranas de PCL/Gel electrohiladas adicionadas con SSB tienen actividad antimicrobiana y son biocompatibles *in vitro*?

III. HIPÓTESIS.

Las membranas elaboradas con PCL y Gel mediante la técnica de electrohilado adicionadas con SSB presentan actividad antimicrobiana y baja citotoxicidad *in vitro*.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo General.

Elaborar membranas compuestas de PCL/Gel mediante la técnica de electrohilado adicionadas con SSB y evaluar su capacidad antibacteriana y citotoxicidad *in vitro* para determinar su potencial uso en tratamientos odontológicos de RTG.

Objetivos Específicos.

- Fabricar membranas fibrilares mediante la técnica de electrohilado.
- Analizar la microestructura de las membranas.
- Determinar el carácter hidrofóbico/hidrofílico y estimar la tasa de degradación de las membranas.
- Determinar la capacidad antibacteriana de las membranas.
- Evaluar el efecto citotóxico de las membranas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Diseño experimental.

Se realizó un estudio experimental *in vitro*, que consistió en la elaboración de membranas fibrilares compuestas de PCL y Gel adicionadas con SSB empleando la técnica de electrohilado (Figura 1).

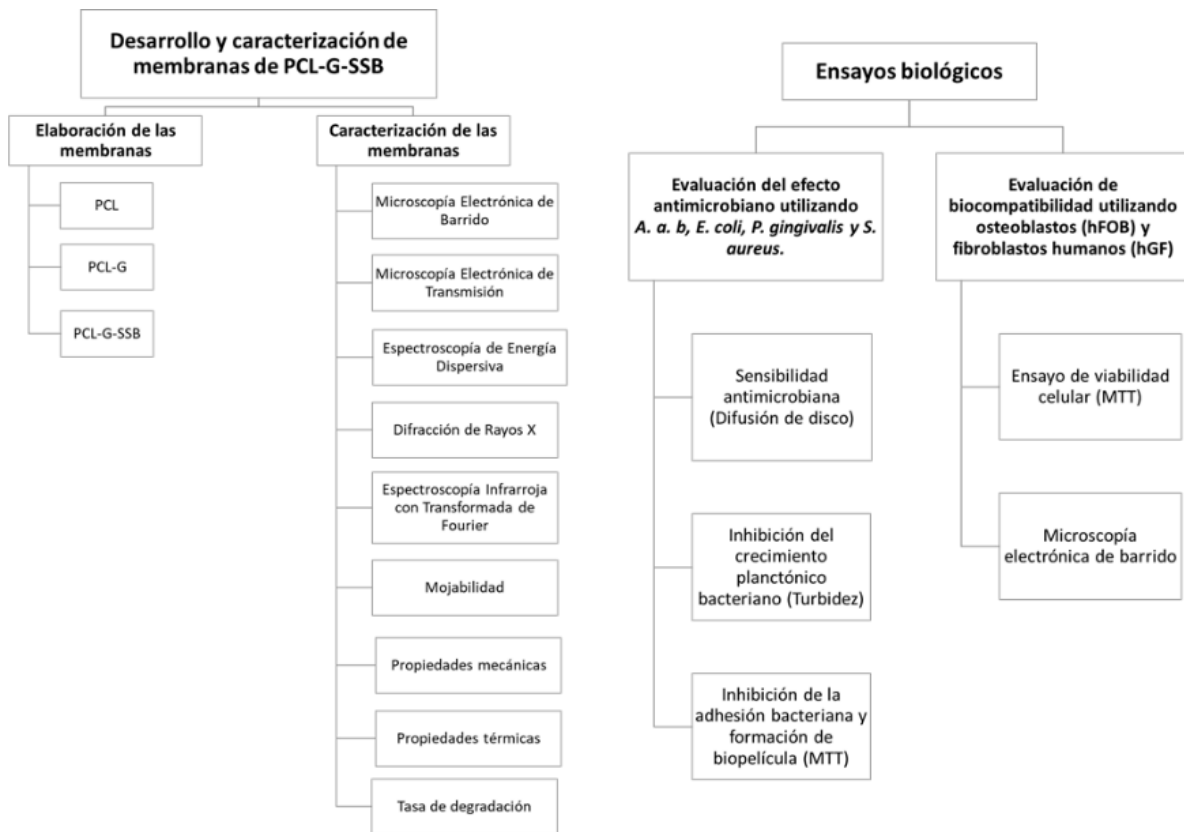


Figura 1. Secuencia experimental del proyecto.

Las partículas de SSB se obtuvieron de FarmaQuimía especialidades® con un 99% de pureza, las membranas se elaboraron en el Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra. La caracterización físico-química de las membranas se realizó principalmente en el Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, y los ensayos biológicos para determinar la capacidad antibacteriana se elaboraron en el Laboratorio de Biointerfaces de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM, mientras que los ensayos de citotoxicidad se realizaron en el Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

5.2 Desarrollo y caracterización de membranas de PCL-G-SSB.

5.2.1 Elaboración de las membranas.

Las membranas fibrilares fueron elaboradas mediante la técnica de electrohilado usando un equipo de configuración horizontal que consiste en una fuente de alto voltaje (EH60P1.5 GLASSMAN Inc.), una bomba inyectora de doble canal (NE-4000 2-channel, Pump Systems Inc.) y una placa de aluminio como colector estático.

Se preparó la solución de PCL utilizando como disolvente ácido acético (AcAc) (98%, Merck 200-580-7) a una concentración de 19% wt/v. Así mismo, se preparó la solución de PCL-Gel (PCL-G) con proporciones de 70:30 en peso. A esta solución se agregó, independientemente, tres diferentes concentraciones de SSB: 2, 4 y 6 mg por cada mL de solución. La **tabla 3** muestra la composición química de las membranas producidas de acuerdo con la composición polimérica de la solución de electrohilado.

Tabla 3. Composición química de las membranas con SSB.

Membrana	PCL (wt.%)*	G (wt.%)*	SSB (wt.%)#
PCL	100	0	0
PCL-G	70	30	0
PCL-G-2SSB	70	30	2
PCL-G-4SSB	70	30	4
PCL-G-6SSB	70	30	6

*Composición de acuerdo con el peso total de PCL y G en la solución de electrohilado.

Composición en mg por cada mL de solución total de electrohilado.

Se analizó la interacción del polvo de SSB con el disolvente de la mezcla polimérica (AcAc) a través de Espectroscopía Infrarrojo (FT-IR) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). La **Tabla 4** muestra los parámetros de electrohilado empleados para fabricar las membranas.

Las soluciones poliméricas fueron agitadas a ≈ 80 rpm durante 48 h, a temperatura ambiente antes de ser electrohiladas. Las membranas obtenidas fueron nombradas de acuerdo con la composición de cada membrana (**Tabla 3**). Después del proceso de electrohilado, las membranas obtenidas fueron removidas del colector y secadas a temperatura ambiente durante 24 h para eliminar cualquier disolvente residual.

Tabla 4. Parámetros de electrohilado.

Membrana	Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/h)	Distancia aguja-colector (cm)
PCL	15	1	15
PCL-G	14	1	14
PCL-G-2SSB	14	1	14
PCL-G-4SSB	14	1	14
PCL-G-6SSB	14	1	14

5.2.2 Caracterización.

5.2.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

La morfología de las membranas se observó por medio del Microscopio Electrónico de Barrido JEOL-JSM-7600F usando un voltaje de aceleración de 10 kV. Para su observación, cada una de las membranas fue previamente recubierta con oro mediante pulverización catódica (“sputtering”). El diámetro promedio de las fibras y el tamaño de poro promedio fue calculado a partir de las micrografías SEM, midiendo, al menos, el diámetro de 80 fibras y el área de 60 poros en zonas seleccionadas aleatoriamente usando el software Axio Vision 4.8.

5.2.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

El tamaño y forma de las partículas de SSB se observó por Microscopía Electrónica de Transmisión empleando un microscopio TEM; ARM200F. El polvo de SSB se dispersó en AcAc glacial, se agitó durante 48 h, se secó a temperatura ambiente y se caracterizó por high-angle annular dark-field Scanning Transmission Electron Microscopy (HAADF-STEM), para evaluar las posibles interacciones entre el AcAc glacial y el SSB durante la mezcla de las soluciones de electrohilado PCL-Gel-SSB. Las distancias entre planos atómicos se midieron obteniendo la Transformada Rápida de

Fourier (FFT) utilizando el software Digital Micrograph (Gatan, Pleasanton, CA). Para su observación, el polvo fue montado en rejillas de cobre sin recubrimiento.

La incorporación de SSB en las membranas de PCL-G-SSB se caracterizó por TEM. El mapeo elemental de las membranas se determinó mediante EDS-TEM obtenidos durante la adquisición de las micrografías TEM de las membranas y analizadas con AZtecTEM Software (Oxford Instruments).

5.2.2.3 Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS).

La composición química elemental de las membranas fue analizada mediante EDS. Los espectros EDS fueron obtenidos durante la adquisición de las micrografías SEM y analizadas con el software INCAEnergy+ (Oxford Instruments).

5.2.2.4 Difracción de Rayos X (XRD).

La estructura cristalina de las membranas fue determinada mediante el análisis de difracción de Rayos X. Además, la estructura cristalina de las partículas de SSB fue determinada antes de ser utilizadas en las soluciones poliméricas de electrohilado. El patrón de difracción del SSB en polvo y el de las diferentes membranas electrohiladas se obtuvieron en un intervalo de 2θ de 20° a 80° usando el difractorómetro Bruker D8 XRD con radiación $\text{CuK}\alpha$. Los patrones de difracción fueron analizados empleando el software OriginPro 8.1.

5.2.2.5 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR).

El polvo SSB tal como se recibió y después de la inmersión en AcAc (agitado durante 48 h en AcAc y secado a temperatura ambiente) se caracterizó por FT-IR en modo de transmisión, utilizando KBr, en un espectrómetro infrarrojo (Nicolet Nexus 670 FT-IR). Los espectros FT-IR se adquirieron de 400 a 4000 cm^{-1} . Para determinar los grupos químicos funcionales presentes en las membranas se analizaron los espectros FT-IR de los compuestos individuales de las membranas (PCL, Gel y SSB) y después los espectros de cada una de las membranas electrohiladas, los cuales fueron obtenidos a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Nicolet 380 FT-IR en un intervalo de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ con 32 scans a una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros fueron analizados con el software OriginPro 8.1.

5.2.2.6 Mojabilidad (WCA).

La mojabilidad al H₂O de las membranas fue evaluada midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua colocada en la superficie de las membranas, pudiendo definir con esto su comportamiento hidrofílico o hidrofóbico. El ángulo de contacto fue medido utilizando un goniómetro OCA 15EC (Dataphysics Company) a través de una gota sésil estática, usando 4 µL de agua desionizada (H₂O dd). Se realizaron tres mediciones por membrana evaluada en diferentes zonas. Los ángulos obtenidos se evaluaron utilizando el software module SCA 20.

5.2.2.7 Propiedades mecánicas.

Las propiedades mecánicas de las membranas en su estado seco y totalmente hidratadas se determinaron mediante ensayos mecánicos de tensión-deformación uniaxial, utilizando una máquina de ensayo universal (Shimadzu, AGS-X) con una celda de carga de 100 N y una velocidad de cruceta de 1 mm/min en condiciones ambientales (≈ 23 °C y 56% de humedad relativa). Se analizaron tres muestras, de acuerdo con el tamaño de muestra de prueba ASTM D1708-06a (25 mm x 5 mm), para cada membrana diferente. El módulo de elasticidad (E), el alargamiento a la rotura (ϵ) y la resistencia máxima a la tracción (σ_{\max}) se determinaron a partir de las curvas de tensión-deformación y se informan como el promedio de las tres mediciones independientes para cada membrana.

5.2.2.8 Propiedades térmicas.

Las propiedades térmicas de las membranas electrohiladas, y de los compuestos prístinos (Gel y PCL) se analizaron mediante termogravimetría (TGA) y barrido calorimétrico diferencial (DSC) bajo atmósfera de nitrógeno. Las mediciones de TGA se realizaron usando un analizador termogravimétrico (TGAQ5000 IR; TA Instruments) calentando las membranas desde temperatura ambiente hasta 700 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Las mediciones de DSC se adquirieron utilizando un equipo Q2000; (TA Instruments) de -90 °C a 150 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Se aplicó enfriamiento rápido después del primer barrido de calentamiento; después, se realizó un segundo escaneo de calentamiento para borrar el historial térmico y se utilizó para estimar la respuesta térmica real de las membranas. Para calcular el grado de cristalinidad de la PCL contenida en las membranas (χ_c) a partir de los termogramas DSC se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 1

$$\chi_c = \left(\frac{\Delta H_m[\text{PCL}]}{\Delta H_m^0} \right) \times 100$$

Donde ΔH_m es la entalpía de fusión por gramo de PCL y ΔH_m^0 era la entalpía de fusión de la PCL cristalina al 100%; $\Delta H_m^0 = 1420 \text{ J/g}$. El componente PCL en las membranas es el único componente que puede desarrollar una fase cristalina en el rango de temperatura estudiado, ya que el componente Gel es totalmente amorfo y no tiene asociada una temperatura de fusión específica, y el componente SSB no puede experimentar una transición de fase en el rango de temperatura evaluado. Los datos obtenidos de las mediciones de TGA y DSC se analizaron utilizando el software Universal Analysis®.

5.2.2.9 Tasa de degradación.

Para evaluar la tasa de degradación de las membranas, se midió la masa de muestras secas de las membranas de 10 mm de diámetro (masa inicial, W_{cero}). Cada muestra fue sumergida en 1 mL de PBS estéril e incubada a 37 °C y 120 rpm; cambiando cada 2 días el medio de incubación. Después de 1, 2, 3, 7, 14 y 21 días de incubación, las muestras fueron lavadas con agua Milli-Q, secadas y nuevamente medidas (W_1). La evaluación de cada membrana se llevó a cabo por triplicado. El porcentaje de masa perdida fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 2

$$W_{\text{perdida}} [\%] = \frac{W_{\text{cero}} - W_1}{W_{\text{cero}}} \times 100$$

5.2.2.10 Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

La liberación de Bi de las membranas se evaluó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS; iCAP Qc, Thermo Scientific). Para esto se incubaron individualmente muestras circulares de 1 cm de diámetro en 1 mL de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado a 37°C y 100 rpm durante 7 días. Los sobrenadantes fueron recolectados a los 1, 3 y 7 días.

5.3 Ensayos biológicos.

5.3.1 Evaluación del efecto antimicrobiano.

Cultivos bacterianos.

Las especies bacterianas utilizadas se adquirieron como cultivos liofilizados de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) (**Tabla 5**).

Bacterias aerobias; *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron crecidas en agar enriquecido TSA (Trypticase Soya Agar BBL®) suplementado con menadiona (Sigma-Aldrich), hemina (Sigma-Aldrich) a 35°C en una incubadora Felisa durante 24h. Cada una de las cepas fue cultivada y transferida hasta obtener cultivos puros.

Bacterias anaerobias; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b y *Porphyromonas gingivalis* fueron crecidas en agar enriquecido HK (agar base para *Mycoplasma*, Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA), suplementado con mediadona (Sigma-Aldrich), hemina (Sigma-Aldrich) y 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorio Microlab S.A. de C.V., México) a 35 °C en una cámara de anaerobiosis (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) durante 7 días. Cada una de las cepas fue cultivada y transferida hasta obtener cultivos puros.

Tabla 5. Especies bacterianas utilizadas en la evaluación del efecto antimicrobiano.

Espece	Condiciones de O ₂	Gram	ATCC
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo b	Anaerobia	Negativo	43718
<i>Escherichia coli</i>	Aerobia	Negativo	33780
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Anaerobia	Negativo	33277
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aerobia	Positivo	25923

Previo a los experimentos, las membranas fueron lavadas dos veces con Etanol (70%) y agua MilliQ, secadas por 24 h y esterilizadas por UV durante 15 min por ambos lados. Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces en un arreglo muestral por triplicado.

5.3.1.1 Sensibilidad antimicrobiana (Ensayo de difusión de disco).

Este ensayo se realizó para determinar la sensibilidad que presentaban las bacterias a las membranas de acuerdo con la American Society of Microbiology (Hudzicki, 2009). Para este ensayo

las membranas experimentales fueron cortadas en discos de 5 mm de diámetro. Como control positivo se utilizó un disco de 5 mm de papel filtro con clorhexidina (Sigma-Aldrich) al 0.2%.

Las cepas bacterianas se sembraron por la técnica de pasto en placas de agar TSA ó HK enriquecido, y una vez colocados los discos de las membranas experimentales se incubaron durante 24 h a 35 °C (bacterias aerobias) y durante 7 días a 35 °C en condiciones de anaerobiosis (bacterias anaerobias). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana midiendo el diámetro del halo de inhibición formado alrededor de las membranas experimentales en cada una de las placas de agar.

5.3.1.2. Inhibición del crecimiento planctónico bacteriano (Ensayo de Turbidez y cuantificación del DNA bacteriano).

Para evaluar el efecto inhibitorio de las membranas experimentales sobre el crecimiento planctónico de las cepas bacterianas se obtuvieron cultivos puros de cada cepa, los cuales fueron suspendidos en caldo de cultivo específico para cada tipo de cepa; para las cepas aerobias se utilizó caldo enriquecido TSB (caldo base para Trypticase Soya Broth (Becton Dickinson), suplementado con 0.3 µg/mL de mediadona y 5 µg/mL de hemina). Mientras que para las cepas anaerobias se utilizó caldo enriquecido de *Mycoplasma* (caldo base para *Mycoplasma* Broth (Becton Dickinson), suplementado con 0.3 µg/mL de mediadona y 5 µg/mL de hemina).

Las suspensiones fueron ajustadas a una densidad óptica (D.O.) de 1 a una longitud de onda de 600nm (BioPhotometer D30, Eppendorf). Para los ensayos se utilizó una concentración de 1×10^5 células/mL por pozo para las cepas aerobias, mientras que para las cepas anaerobias se utilizó una concentración de 1×10^6 células/mL por pozo, en una placa de 48 pozos (Corning Costar®). Para este ensayo las membranas experimentales fueron cortadas en discos de 8 mm de diámetro y fueron colocadas individualmente en la placa de 48 pozos. Como control negativo se colocó caldo de cultivo sin bacteria y sin membrana y como control positivo se tomó en cuenta el crecimiento bacteriano en el caldo de cultivo.

La inhibición del crecimiento planctónico fue estimada para las bacterias aerobias (*E. coli*, *S. aureus*) a 1, 3 y 7 días. Por otro lado, para las bacterias anaerobias (*A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *P. gingivalis*), las evaluaciones se midieron a los 7 y 14 días.

En cada medición, se tomaron 100 µL del caldo de cultivo de cada uno de los pozos y se colocaron de manera individual en placas de 96 pozos para medir la D.O. a 595 nm (FilterMax F5

Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices). El porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico (Turbidez) ($I_{\text{turbidez}}\%$) fue calculado de la siguiente manera:

Ecuación 3

$$I_{\text{turbidez}}[\%] = \frac{(D.O. \text{ bacteria} - D.O. \text{ medio}) - (D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ medio muestra})}{(D.O. \text{ bacteria} - D.O. \text{ medio})} \times 100$$

Dónde:

D.O. bacteria, corresponde a la absorbancia de las alícuotas con bacteria en el medio.

D.O. medio, corresponde a la absorbancia de las alícuotas con medio sin bacteria.

D.O. muestra, corresponde a la absorbancia de las soluciones bacterianas incubadas en presencia de las membranas.

D.O medio muestra, corresponde a la absorbancia de las alícuotas con medio *sin bacteria* incubado en presencia de las membranas.

El DNA bacteriano total se determinó utilizando directamente de 1 ml de sobrenadantes de la misma secuencia experimental de sembrado que el punto **3.1.2.**, utilizando DNeasy Ultraclean Microbial Kit (n.º de cat. 12224-50, QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de DNA bacteriano espectrofotométricamente (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) por triplicado.

5.3.1.3 Inhibición de la adhesión bacteriana y formación de biopelículas (Ensayo de MTT).

Para evaluar la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano sobre las membranas se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular utilizando el kit de MTT (Sigma-Aldrich) en las membranas, se utilizó la misma secuencia experimental de sembrado que el punto **3.1.2.** Después de los tiempos de incubación, las membranas fueron lavadas con caldo de cultivo y trasladadas individualmente a nuevos pozos de cultivo, y se agregaron 150 μL de caldo de cultivo y 15 μL de MTT a cada pozo e incubando durante 3h a 35°C bajo las condiciones de O_2 de cada una de las especies bacterianas probadas. Después de la incubación, se desechó la solución de MTT:caldo de cultivo y las membranas fueron lavadas con H_2O estéril. Se agregó una solución de 2-propanol y dimetil sulfóxido (ISO:DMSO) en una proporción 1:1 para disolver los cristales de formazán formados debido a la reducción de la sal MTT por la actividad metabólica de las bacterias con. Se hicieron alícuotas 100 μL de cada pozo en una placa nueva de 96 pozos y se midió su absorbancia a 570 nm (FilterMax

F5 Multi-Mode Microplate Reader). El porcentaje de inhibición del crecimiento y formación de biopelículas ($I_{\text{viabilidad}}\%$) fue calculado de la siguiente manera:

Ecuación 4

$$I_{\text{viabilidad}}[\%] = \frac{(D.O. \text{ membrana PCL} - D.O. \text{ medio membrana PCL}) - (D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ medio muestra})}{(D.O. \text{ membrana PCL} - D.O. \text{ medio membrana PCL})} \times 100$$

Dónde:

D.O. membrana PCL, corresponde a la absorbancia de las alícuotas de las membranas de PCL incubadas con bacteria.

D.O. medio membrana PCL, corresponde a la absorbancia de las alícuotas de las membranas de PCL incubadas con medio *sin bacteria*.

D.O. muestra, corresponde a la absorbancia de las soluciones bacterianas incubadas en presencia de las membranas.

D.O medio muestra, corresponde a la absorbancia de las alícuotas con medio *sin bacteria* incubado en presencia de las membranas.

5.3.2 Evaluación de la citotoxicidad.

Para determinar la citotoxicidad de las membranas, se evaluó la viabilidad de las líneas celulares indicadas en la **tabla 6**, en contacto con los lixiviados de las membranas.

Tabla 6. Líneas celulares utilizadas en la evaluación de la citotoxicidad.

Tipo celular	Abreviación	ATCC
Osteoblastos humanos	hFOB	CRL-11372
Fibroblastos gingivales humanos	HGF-1	CRL-2014

Las células en cultivo primario crio-preservadas en nitrógeno fueron descongeladas en baño de agua a 37 °C, se les agregó 1 mL de medio de cultivo (Medio de Cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM F:12, GIBCO), Suero Fetal Bovino (SBF, GIBCO) al 10% y Antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1%, el contenido se transfirió a un tubo de ensayo con 5 mL de medio y fue centrifugado a 1500 rpm por 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se removió el sobrenadante y el precipitado celular fue resuspendido en 2 mL de medio de cultivo. Se contó manualmente el número total de células utilizando una cámara de Neubauer, para sembrar en un plato de cultivo de 25 cm². Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, una atmósfera de 95% y 5% de CO₂, en un ambiente con 100% humedad. El medio de cultivo se cambió a las 24 h y posteriormente cada 48 h. Una vez que llegaron al 80% de confluencia, las células fueron despegadas del plato con tripsina y trasladadas al plato de cultivo que correspondiera para el ensayo. Para los ensayos biológicos se utilizaron células de segundo pasaje.

Previo a los experimentos las membranas experimentales fueron cortadas en discos de 6 y 8 mm de diámetro, lavadas dos veces con Etanol (70%) y agua MilliQ, secadas por 24 h y esterilizadas por UV durante 15 min por ambos lados. Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces en un arreglo muestral en triplicado.

5.3.2.1 Viabilidad celular (Ensayo de MTT).

Para evaluar el efecto citotóxico de los productos de liberación (lixiviados) de las membranas, se cultivaron monocapas de las líneas celulares, sembradas a una densidad inicial de 1 x10⁴ células por pozo, en cajas de cultivo de 24 pozos (Corning Costar) con medio de cultivo a 37 °C en un ambiente húmedo con 5 % de CO₂. Las células fueron expuestas a los productos de liberación de cada una de las membranas durante 1, 3 y 7 días, empleando insertos celulares colgantes con membranas de PET de 8 μm de porosidad (Millicell®). Después de cada tiempo de incubación, el medio de cultivo fue removido, y los cultivos celulares fueron lavado dos veces con PBS. Se agregó 450 μL de medio de cultivo y 50 μL de MTT a cada pozo, se incubó durante 3 h a 37 °C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂. Posteriormente, se removió la solución MTT:medio de cultivo. Los cristales de formazán fueron disueltos en una solución de ISO:DMSO, se hicieron alícuotas 100 μL de cada pozo por triplicado y se midió la D.O. a 570 nm. El porcentaje de viabilidad celular utilizando los lixiviados de las membranas (VC_{lixiviados}%) fue calculado usando la **Ecuación 5**:

$$VC_{lixiviados}[\%] = \frac{D.O. muestra - D.O. muestra sin células}{D.O. células - D.O. muestra sin células} \times 100$$

Dónde:

D.O. muestra, corresponde a la absorbancia de la monocapa celular incubada en presencia de las membranas.

D.O. membrana sin células, corresponde a la absorbancia de las alícuotas de las membranas con medio sin células.

D.O. células, corresponde a la absorbancia de las alícuotas de la monocapa celular incubada en medio celular sin membranas.

Adicionalmente, se realizó otro ensayo para determinar la citotoxicidad de las membranas. Se sembraron 15×10^3 células sobre cada membrana experimental en cajas de cultivo de 48 pozos (Corning Costar) y se incubaron durante 1, 3 y 7 días. Después de cada tiempo de incubación, el medio de cultivo fue removido, y las membranas con las células se lavaron dos veces con PBS. Se agregó una solución de 150 μ L de MTT:medio de cultivo a cada pozo, se incubó durante 3 h a 37 °C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂. Posteriormente, se removió la solución MTT:medio de cultivo. Los cristales de formazán fueron disueltos en una solución de ISO:DMSO, se hicieron alícuotas 100 μ L de cada pozo por triplicado y se midió la D.O. a 570 nm. El porcentaje de viabilidad celular sobre las membranas ($VC_{membranas}\%$) fue calculado utilizando la **Ecuación 6**:

$$VC_{membranas}[\%] = \frac{D.O. membrana - D.O. muestra sin células}{D.O. membrana PCL - D.O. muestra sin células} \times 100$$

Dónde:

D.O. muestra, corresponde a la absorbancia de la monocapa celular incubada en presencia de las membranas.

D.O. muestra sin células, corresponde a la absorbancia de las alícuotas de las membranas con medio sin células.

D.O. membrana PCL, corresponde a la absorbancia de las alícuotas del monocapa celular incubada en presencia de las membranas de PCL.

5.3.2.2 Evaluación de la interacción membrana-célula (SEM).

Para evaluar la interacción de las células con la superficie de las membranas, se utilizó la misma secuencia experimental de sembrado que en el punto **3.2.1**. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL-7600 con un voltaje de aceleración de 10 kV.

Después de cada uno de los tiempos de incubación, las membranas fueron lavadas con medio de cultivo y trasladadas individualmente a nuevas cajas de cultivo, donde se agregaron 500 μ L de glutaraldehído al 2% para fijar las células y se incubaron al menos 24 h. Posteriormente, las

membranas fueron deshidratadas utilizando concentraciones ascendentes de etanol (20, 40, 60 80 y 100%), y recubiertas con oro mediante "sputtering".

VI. ANALISIS ESTADÍSTICO.

Todos los datos obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). El análisis de los datos de la evaluación del efecto antimicrobiano y la evaluación de la citotoxicidad fueron analizados por medio de la prueba de análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey; considerando diferencias estadísticamente significativas a partir de una $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS.

7.1 Desarrollo y caracterización de membranas de PCL-G-SSB.

7.1.1 Elaboración de las membranas.

Se prepararon soluciones poliméricas con tres diferentes concentraciones del polvo de SSB con respecto al peso total de la mezcla polimérica disuelto en AcAc. Las membranas obtenidas fueron nombradas de acuerdo con su composición (**Tabla 3**). Macroscópicamente, las membranas fueron blancas, suaves y flexibles (**Figura 2**).

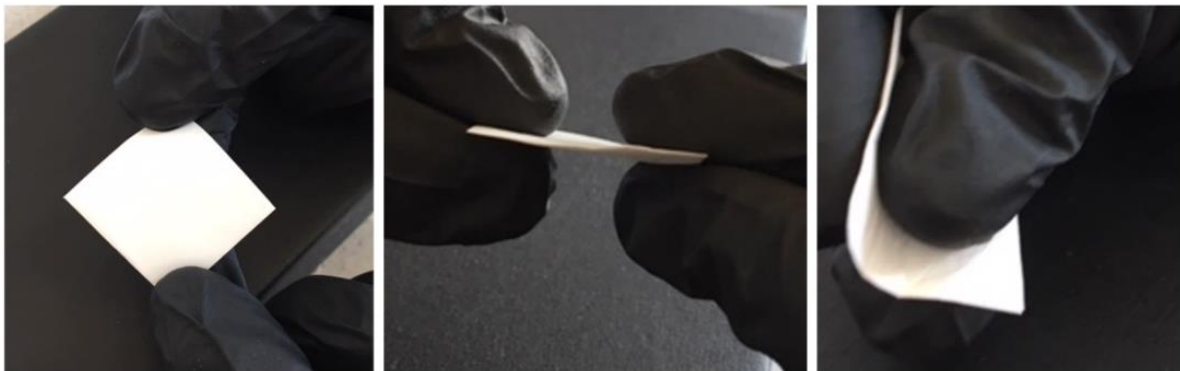


Figura 2. Fotografías representativas de la apariencia macroscópica de las membranas experimentales de SSB.

7.1.2 Caracterización.

7.1.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

La **figura 3** muestra microfotografías representativas de SEM de las diferentes membranas experimentales. Microscópicamente, las membranas mostraron fibras orientadas al azar, donde la uniformidad de las fibras mejoró con la adición de la Gel y el SSB, presentando fibras con menos defectos en comparación con las membranas de PCL. Las fibras de PCL-G presentaron una configuración más recta y menos enredada que las fibras de PCL; esta característica aumentó en proporción a la concentración de SSB. El diámetro promedio (d) de las fibras disminuyó de $1.44 \mu\text{m}$ para la membrana PCL a $0.78 \mu\text{m}$ para la membrana PCL-G, y continuó disminuyendo hasta $0.67 \mu\text{m}$ al aumentar la concentración de SSB en la membrana.

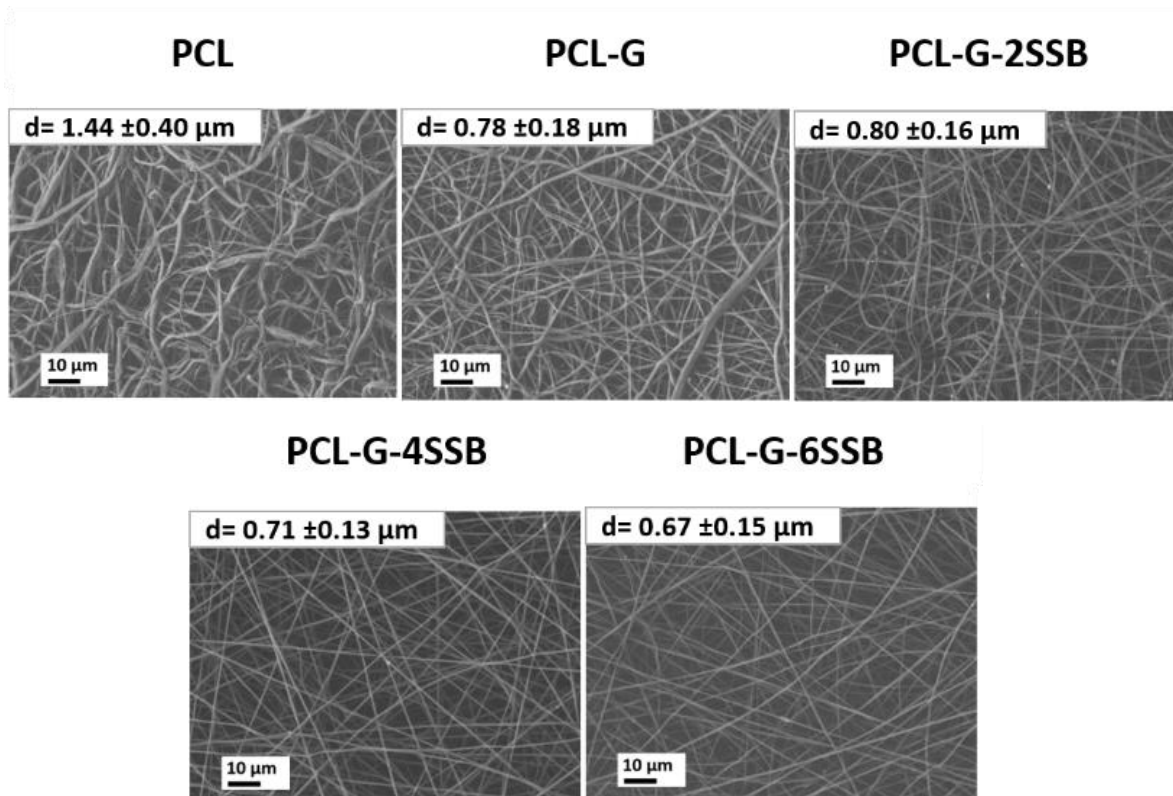


Figura 3. Microfotografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las membranas experimentales.

Por otro lado, el tamaño de poro aumentó de $68.8 \pm 34.7 \mu\text{m}^2$ a $101.8 \pm 47.2 \mu\text{m}^2$ con la adición de Gelatina (membrana PCL-G) como se muestra en la **tabla 7**. En las membranas adicionadas con SSB el tamaño de poro aumentó en proporción a la concentración de SSB; sin embargo, las diferencias observadas entre las membranas que contienen PCL-G y SSB y dentro de las diferentes membranas que contienen SSB no fueron significativas.

Tabla 7. Tamaño de poro en las membranas.

Membrana	Tamaño de poro (μm^2)
PCL	68.80 ± 34.70
PCL-G	101.80 ± 47.26
PCL-G-2SSB	96.60 ± 44.82
PCL-G-4SSB	121.68 ± 61.08
PCL-G-6SSB	136.30 ± 68.92

7.1.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

En la **figura 4** se muestran las micrografías representativas de TEM y HAADF-STEM del polvo de SSB tal como se recibió y del polvo de SSB después de 48 h de inmersión en AcAc. El polvo de SSB tal como se recibió presenta agregados de partículas tipo aguja (6-10 μm) aglomeradas, y que presentan estructuras amorfas y cristalinas, respectivamente (**Figura 4A**). Después de la inmersión en AcAc, el polvo SSB mostró el mismo tipo de partículas cristalinas en forma de aguja pequeñas (≈ 250 nm) que las observadas en el polvo SSB recibido (**Figura 4B**). A partir del análisis de imágenes de alta resolución y las correspondientes Transformadas de Fourier, es posible decir que las distancias interplanares de las partículas cristalinas en ambas muestras son similares a las reportadas para las estructuras cristalinas de complejos orgánicos de bismuto (**Figura 4C y 4D**).

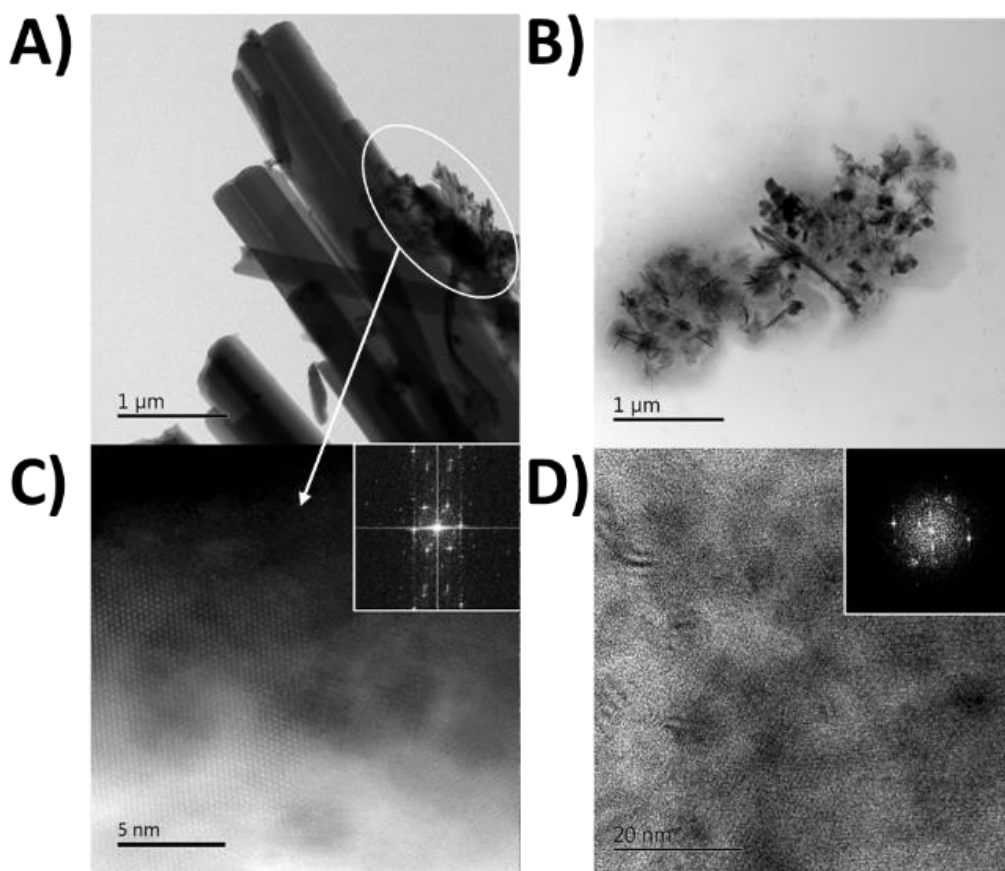


Figura 4. Micrografías de TEM en campo claro del **A)** polvo de SSB tal como se recibió donde se observan partículas grandes en forma de agujas, en **B)** se observa el polvo de SSB después de 48 h de inmersión en ácido acético. En TEM de alta resolución se observan las imágenes correspondientes a las Transformadas de Fourier (recuadros) de las estructuras cristalinas **C)** observadas en el polvo SSB tal como se recibió y **D)** en el polvo SSB seco después de 48 h de inmersión en ácido acético.

En la **figura 5** se muestran micrografías TEM representativas de las membranas. Estructuras oscuras en forma de aguja incrustadas en las fibras de las membranas se pueden observar a partir de las micrografías TEM de campo claro, en las membranas que contienen SSB. El mapeo elemental de EDS reveló una distribución homogénea de Bi en todas las membranas que contienen SSB, con una mayor concentración de Bi en las zonas correspondientes a las partículas brillantes (micrografías de TEM de campo oscuro) observadas en las fibras.

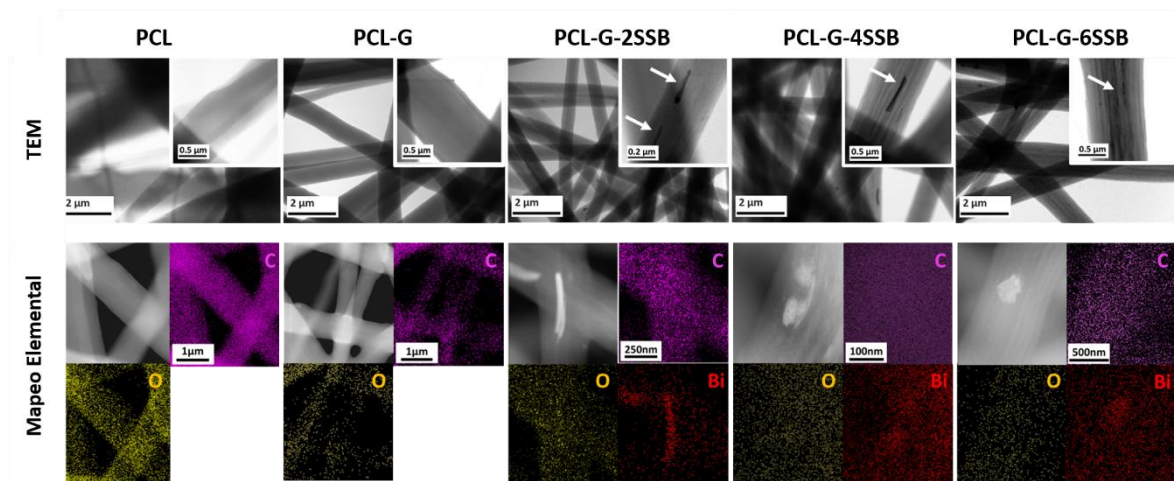


Figura 5. Imágenes TEM y mapeo elemental de membranas PCL, PCL-G y PCL-G-SSB.

7.1.2.3 Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS).

El análisis por EDS de las membranas experimentales con polvo de SSB (**Tabla 8**) mostró que las membranas de PCL y PCL-G se componen principalmente de carbono (C) y oxígeno (O). El porcentaje en peso (wt%) de bismuto (Bi) presente en las diferentes membranas confirmó la presencia de Bi en las membranas.

Tabla 8. Composición Elemental por EDS de las membranas.

Membrana	Composición Elemental determinada por EDS (wt.%)		
	C	O	Bi
PCL	61.40	38.60	-
PCL-G	67.45	32.55	-
PCL-G-2SSB	67.73	21.23	11.57
PCL-G-4SSB	54.10	23.21	19.67
PCL-G-6SSB	59.65	17.77	22.58

7.1.2.4 Difracción de Rayos X (XRD).

En la **figura 6** podemos observar los patrones de XRD del polvo de SSB tal como se recibió, de la Gelatina prístina y de las membranas experimentales. En el espectro de la Gelatina prístina no se observaron picos de difracción, ya que la Gelatina es completamente amorfa. Los dos picos de difracción característicos de la estructura PCL a 2θ se observaron en 21.11° y 23.99° , correspondientes a los planos (110) y (200), los cuales pueden observarse claramente en los patrones de difracción de todas las membranas. La intensidad de estos dos picos disminuyó con la adición de la Gelatina a las membranas experimentales (PCL-G) y disminuyó aún más a medida que aumentaba la concentración de SSB en las membranas. Por otro lado, el componente amorfo en las membranas aumentó a medida que aumentó la concentración de SSB. Adicionalmente, no se observaron picos claros correspondientes a SSB, pico principal esperado en $2\theta = 5.3^\circ$ correspondiente al plano (001), ni en las membranas PCL-G-2SSB, PCL-G-4SSB ni PCL-G-6SSB.

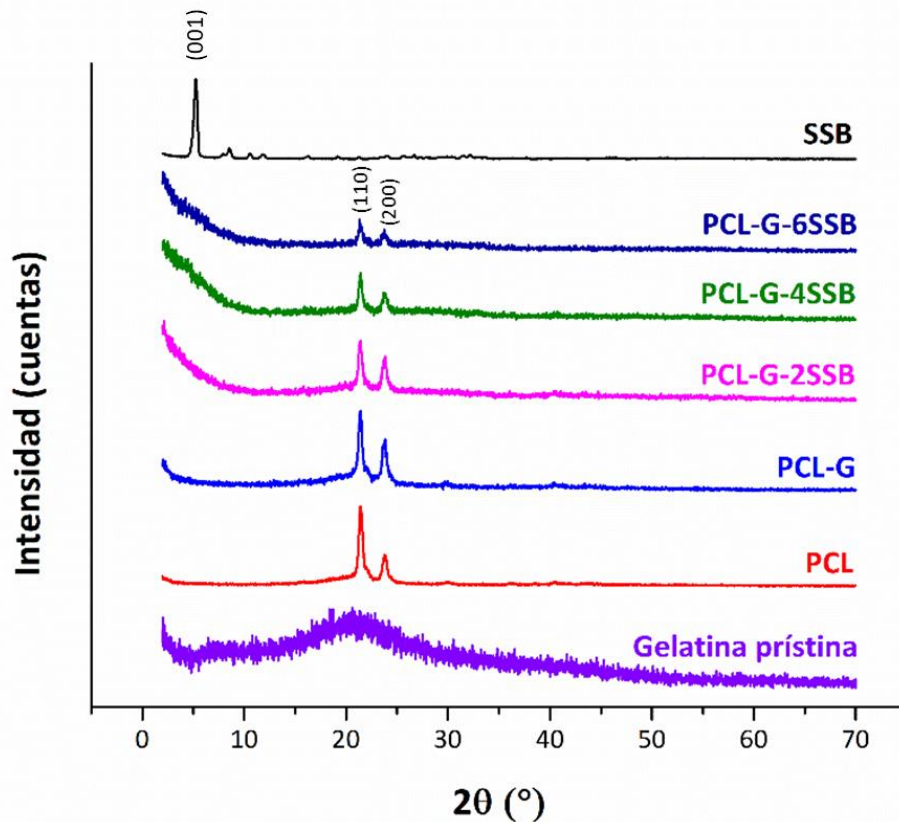


Figura 6. Patrones de XRD de las membranas experimentales.

7.1.2.5 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR).

Los espectros FT-IR del polvo de SSB, de la Gelatina prístina y de las membranas, se observan en la **figura 7**. Para las membranas PCL, las bandas principales se observaron a 2945 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$), 2859 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$), 1731 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$), 1294 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{C}$), 1240 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{OC}$), 1175 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{C}-\text{OC}$) y 1045 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{O}$), de acuerdo con las bandas de absorción IR características esperadas para PCL. La Gelatina prístina exhibió las bandas características correspondientes a la amida I ($\nu\text{C}=\text{O}$) y la amida II ($\delta\text{N}-\text{H}$) a 1651 cm^{-1} y 1538 cm^{-1} , respectivamente. La membrana PCL-G exhibió las bandas de absorción IR características esperadas de sus componentes PCL y Gel. Además, la membrana PCL-G exhibió una banda ancha centrada en 3296 cm^{-1} que se puede atribuir a la superposición de los grupos O-H de PCL y los grupos N-H de la Gelatina. Esta banda ancha también se observó para las membranas que contienen SSB. Los espectros FT-IR de las membranas que contienen SSB exhibieron bandas claras correspondientes a SSB ubicadas a 1600 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$), 1420 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$) y 864 cm^{-1} , 807 cm^{-1} , 704 cm^{-1} y 664 cm^{-1} (originados

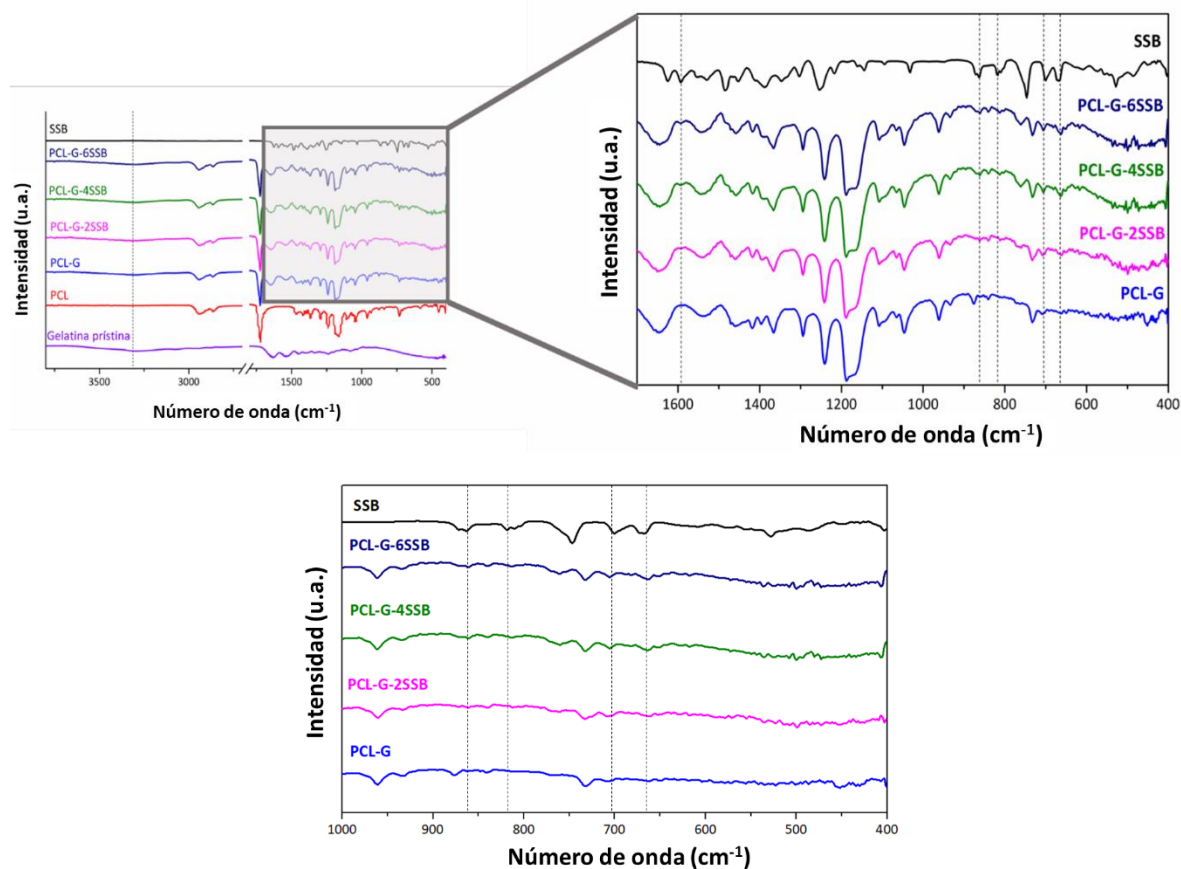


Figura 7. Espectros FT-IR del polvo de SSB y las membranas experimentales, así como de la Gelatina prístina.

7.1.2.6 Mojabilidad.

Según los resultados de mojabilidad mostrados en la **figura 8A**, en condiciones húmedas, todas las membranas, excepto la membrana PCL, mostraron una naturaleza hidrofílica. Los resultados también mostraron que la adición de SSB a las membranas no cambió significativamente el comportamiento hidrofílico de las membranas en su estado húmedo, en comparación con PCL-G. La **figura 8B** muestra el ángulo de contacto para las membranas en condiciones secas. En estas condiciones las membranas que contienen SSB exhibieron una naturaleza hidrofóbica, de manera similar a la membrana PCL, mientras que la membrana PCL-G exhibió una naturaleza hidrofílica tanto en su estado húmedo como en su estado seco.

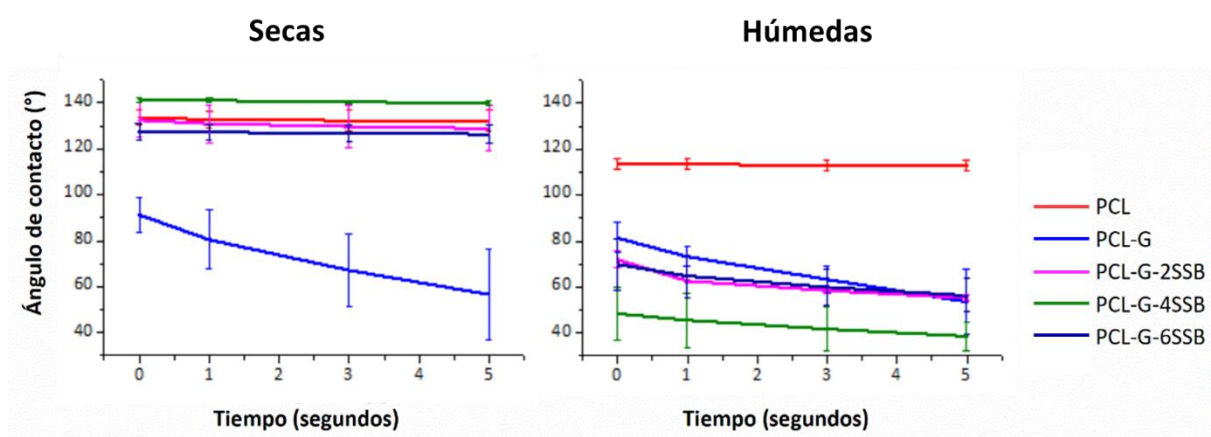


Figura 8. Ángulos de contacto de las membranas experimentales en condiciones húmedas y secas.

7.1.2.7. Propiedades mecánicas.

Las propiedades mecánicas obtenidas a partir de las curvas de tensión-deformación de las membranas, en sus estados seco y húmedo, se muestran en la **tabla 9**. En el estado seco, la adición de Gelatina a las membranas (PCL-G) aumentó su módulo elástico (E); sin embargo, las membranas de PCL-G se volvieron frágiles exhibiendo un alargamiento significativamente menor a la elongación a la ruptura (ϵ) de la membrana de PCL. Al adicionar el SSB, el E de las membranas no fue significativamente diferente al de la membrana de PCL-G; $p < 0.05$. Sin embargo, el ϵ disminuyó significativamente para PCL-G-2SSB ($\epsilon = 3.4 \pm 0.6\%$) y PCL-G-4SSB ($24.8 \pm 13.9\%$) en comparación con PCL-G ($\epsilon = 81.6 \pm 25.7\%$); $p < 0.05$. La elongación de ruptura (ϵ) para PCL-G-6SSB ($\epsilon = 92.9 \pm 35.6\%$) fue similar a la de PCL-G. La máxima resistencia a la tracción (σ_{max}) fue similar para todas las membranas electrohiladas en su estado seco.

Tabla 9. Parámetros mecánicos de las membranas: Módulo elástico (E), Máxima resistencia a la tracción (σ_{max}), Elongación a la ruptura (ϵ).

Membranas	Secas			Húmedas		
	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ϵ (%)	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ϵ (%)
PCL	5.2 ± 1.7	1.1 ± 0.1	193.5 ± 61.9	4.1 ± 1.4	1.1 ± 0.4	85.9 ± 14.8
PCL-G	66.8 ± 26.8	2 ± 0.4	81.6 ± 25.7	6.3 ± 0.6	2 ± 1.3	234.9 ± 157.7
PCL-G-2SSB	82.3 ± 4.4	1.6 ± 0.1	3.4 ± 0.6	4.4 ± 1.1	2.6 ± 0.3	75.3 ± 7.4
PCL-G-4SSB	68.8 ± 6.7	1.5 ± 0.2	24.8 ± 13.9	5.4 ± 2.1	1.9 ± 0.2	181.7 ± 26.7
PCL-G-6SSB	75.1 ± 3.1	1.9 ± 0.2	92.9 ± 35.6	4.7 ± 0.3	1.2 ± 0.2	181.9 ± 59.2

En el estado completamente hidratado, la E y σ_{max} de las membranas aumentaron ligeramente con la adición de la Gelatina (PCL-G), en comparación con la membrana PCL; sin embargo, σ_{max} disminuyó ligeramente al aumentar la concentración de SSB para las membranas PCL-G-SSB, en comparación con PCL-G. Por otro lado, la elongación de ruptura aumentó en las membranas de PCL-G en comparación con las membranas PCL. Por otro lado, con la adición de SSB, ϵ disminuyó en las membranas con menor concentración de SSB (PCL-G-2SSB; $\epsilon = 75.3\%$) en comparación con PCL-G (234.9%), posteriormente ϵ fue aumentando, dependiendo de la concentración de SSB ($\epsilon \approx 181\%$ para PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB). Sin embargo, ϵ de las membranas PCL-G-SSB no volvió a aumentar a los mismos valores observados para PCL-G ($\epsilon = 234.9\%$), incluso para la concentración más alta de SSB utilizada en el presente estudio.

7.1.2.8 Propiedades térmicas.

Las curvas de TGA tanto de las membranas experimentales como de la Gelatina y la PCL prístinas se muestran en la **figura 9A**, mientras que los datos cuantitativos se resumen en la **tabla 10**.

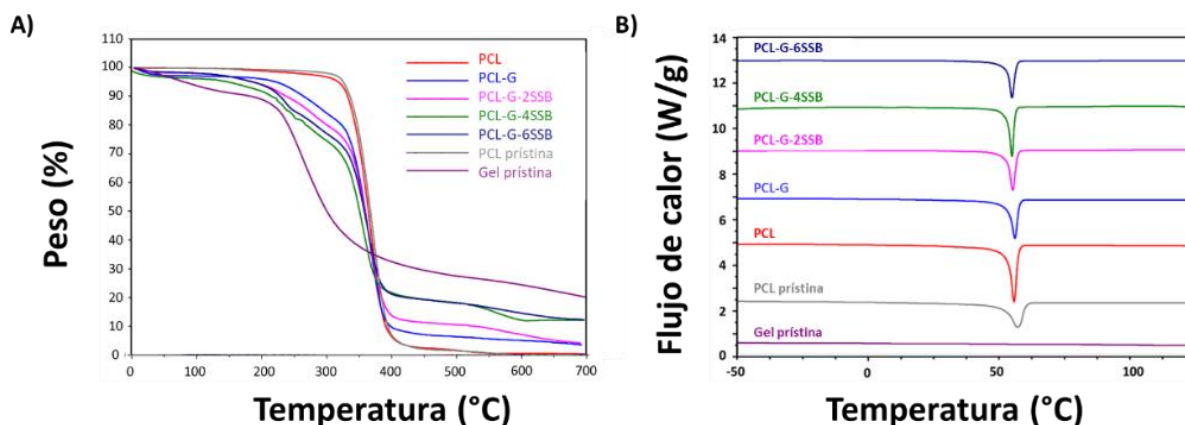


Figura 9. A) Termogramas TGA para Gel prístino, PCL prístino y membranas de PCL, PCL-G y PCL-G-SSB. **B)** Calorimetría diferencial de barrido de Gel prístino, PCL prístino y membranas PCL, PCL-G y PCL-G-SSB.

Tabla 10. Análisis termogravimétrico de la PCL prístino, Gel prístino y de las membranas PCL, PCL-G y PCL-G-SSB.

Muestra	Región principal de descomposición térmica		T _{max} (°C) *		
	Rango de temperatura(°C)	Pérdida de peso (%)			
Gelatina prístino	190 - 535	73	289	310	-
PCL prístino	303 - 480	98	-	-	390
PCL	291 - 551	99	-	-	389
PCL-G	208 - 485	94	52	282	316
PCL-G-2SSB	150 - 475	89	53	257	306
PCL-G-4SSB	153 - 481	81	47	268	302
PCL-G-6SSB	144 - 477	81	52	263	309

* T_{max} es la temperatura de pérdida de peso máxima.

La Gel prístino mostró una pérdida de peso inicial en el rango de temperatura de 53-170 °C, asociada con la evaporación del contenido de agua, seguida de un paso de degradación amplio donde se pueden identificar dos temperaturas de máxima pérdida de peso (T_{max}) a 289 °C y 310 °C. Para la membrana PCL y la PCL prístino, la principal pérdida de peso se produjo en los rangos de temperatura de 303-480 °C y 291-551 °C con una T_{max} de 390 °C y 389 °C, respectivamente. Las membranas PCL-G y PCL-G-SSB también exhibieron una pérdida de peso inicial a 47-53 °C, debido a

la evaporación del agua absorbida principalmente por el componente Gel, un segundo pico de pérdida de peso a 377-386 °C, que puede atribuirse al componente PCL, y un amplio paso de degradación con dos picos de pérdida de peso a 257-282 °C y 302-316 °C, correspondientes a la degradación de la Gelatina, cuyas intensidades aumentaron en relación con la cantidad de SSB en las membranas.

En la **figura 9B** se presentan los escaneos DSC de calentamiento de Gel prístina, PCL prístina y las membranas PCL, PCL-G y PCL-G-SSB, y las propiedades calorimétricas se resumen en la **tabla 11**.

Tabla 11. Propiedades calorimétricas de PCL prístina, Gel prístina y de las membranas de PCL, PCL-G y PCL-G-SSB

Muestra	T _m ^a (°C)	ΔH _m ^b (J/g)	ΔH _m [PCL] ^c (J/g)	χ _c ^d (%)
Gelatina prístina	-	-	-	-
PCL prístina	57	56	56	39
PCL	56	67	67	47
PCL-G	56	46	66	46
PCL-G-2SSB	55	39	63	44
PCL-G-4SSB	55	38	70	49
PCL-G-6SSB	55	34	74	52

^a temperatura de fusión, ^b entalpía de fusión; ^c entalpía de fusión por gramo de PCL, ^d grados de cristalinidad de la entalpía de fusión por gramo de PCL

Para la Gel prístina, no se observó pico de fusión en el escaneo de calentamiento. La entalpía de fusión (ΔH_m) de la membrana PCL (67 J/g) fue mayor que la de la PCL prístina (56 J/g), lo que indica un aumento del porcentaje de cristalinidad del 8% para la membrana PCL en comparación con la PCL prístina. Se detectó un solo pico endotérmico en los escaneos de calentamiento de la PCL prístina y las membranas PCL, PCL-G y PCL-G-SSB. Este pico se atribuyó al punto de transición de fase del componente PCL a una temperatura de fusión (T_m) de 55 a 57 °C. La entalpía de fusión de PCL-G (46 J/g) disminuyó en comparación con la membrana de PCL (67 J/g) y disminuye aún más con la concentración de SSB aumentando de 39 J/g para PCL-G-2SSB a 34 J/g para PCL-G-6SSB. Esto ya que la concentración de PCL en las membranas disminuyó influyendo en la cristalinidad general de las membranas (es decir, el grado de cristalinidad de las membranas disminuyó con la incorporación de Gel y SSB). Sin embargo, la entalpía de fusión por gramo de PCL (ΔH_m [PCL]) en las

membranas de PCL-G-SSB aumentó ligeramente (de 63 a 74 J/g) con el incremento de la concentración de SSB. A partir de estos datos, el grado de cristalinidad (χ_c) de PCL en las membranas PCL, PCL-G y PCL-G-SSB resultó dentro del 44 y 52%, mientras que χ_c para PCL prístino fue 39%, exhibiendo una tendencia a aumentar con la concentración de SSB en las membranas.

7.1.2.9 Tasa de degradación.

Las membranas se incubaron en solución enzimática a 37 °C para simular el proceso de degradación en condiciones fisiológicas. La pérdida de peso acumulada durante el tiempo de incubación se muestra en la **figura 10**. La membrana de PCL se degradó gradualmente con una tasa de degradación constante a lo largo del tiempo para alcanzar una pérdida de peso máxima de $\approx 20\%$ después de 45 días de inmersión en solución enzimática. Por otro lado, las membranas que contienen Gel mostraron la mayor pérdida de peso (17-30%, dependiendo de la concentración de SSB) durante los primeros 5 días de inmersión. Después de este tiempo, la tasa de pérdida de peso disminuyó, mostrando una pérdida de peso casi constante desde el día 14 de incubación hasta los 45 días de incubación.

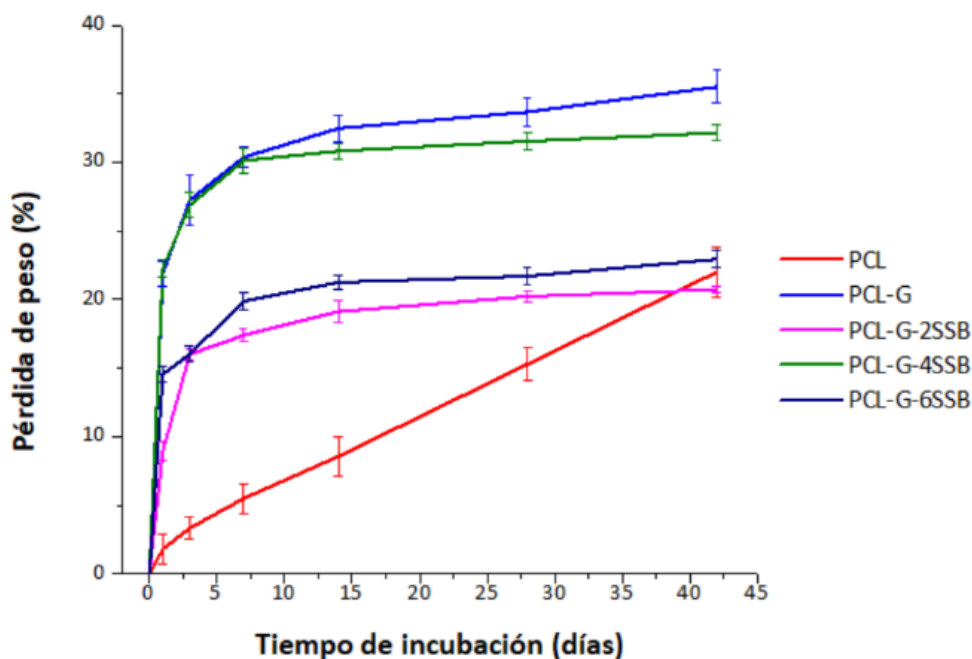


Figura 10. Porcentaje de pérdida de peso a lo largo del tiempo de las membranas PCL, PCL-G y PCL-G-SSB en solución enzimática.

7.1.2.10. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

La liberación de Bi de las membranas tras la incubación en medio de cultivo DMEM-F12 a 37 °C se muestra en la **figura 11**. Se observó que la mayor liberación de Bi ocurrió dentro de las primeras 24 h de inmersión en DMEM-F12, posteriormente ocurrió una lenta liberación de Bi. La mayor liberación de Bi en todos los tiempos de incubación se observó en la membrana que contenía la mayor cantidad de SSB (PCL-G-6SSB).

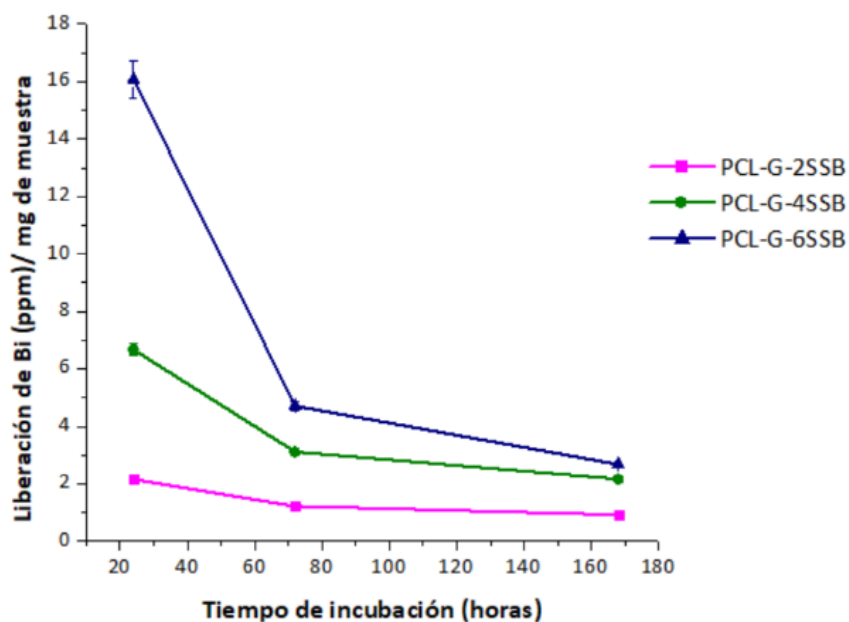


Figura 11. Liberación de bismuto en ppm a lo largo del tiempo para membranas PCL-G-BSS en DMEM-F12.

7.2 Ensayos biológicos.

7.2.1 Evaluación del efecto antimicrobiano.

7.2.1.1 Sensibilidad antimicrobiana (Ensayo de difusión con disco).

La actividad antimicrobiana de las membranas experimentales adicionadas con SSB se evaluó por medio del ensayo de difusión con disco. Mediante este ensayo se midieron los halos de inhibición del crecimiento bacteriano que se formaron alrededor de las membranas experimentales PCL, PCL-G y las membranas adicionadas con SSB (PCL-G-2SSB, PCL-G-4SSB, PCL-G-6SSB). Se utilizó como control positivo un disco de papel filtro adicionado con clorhexidina al 0.2 %.

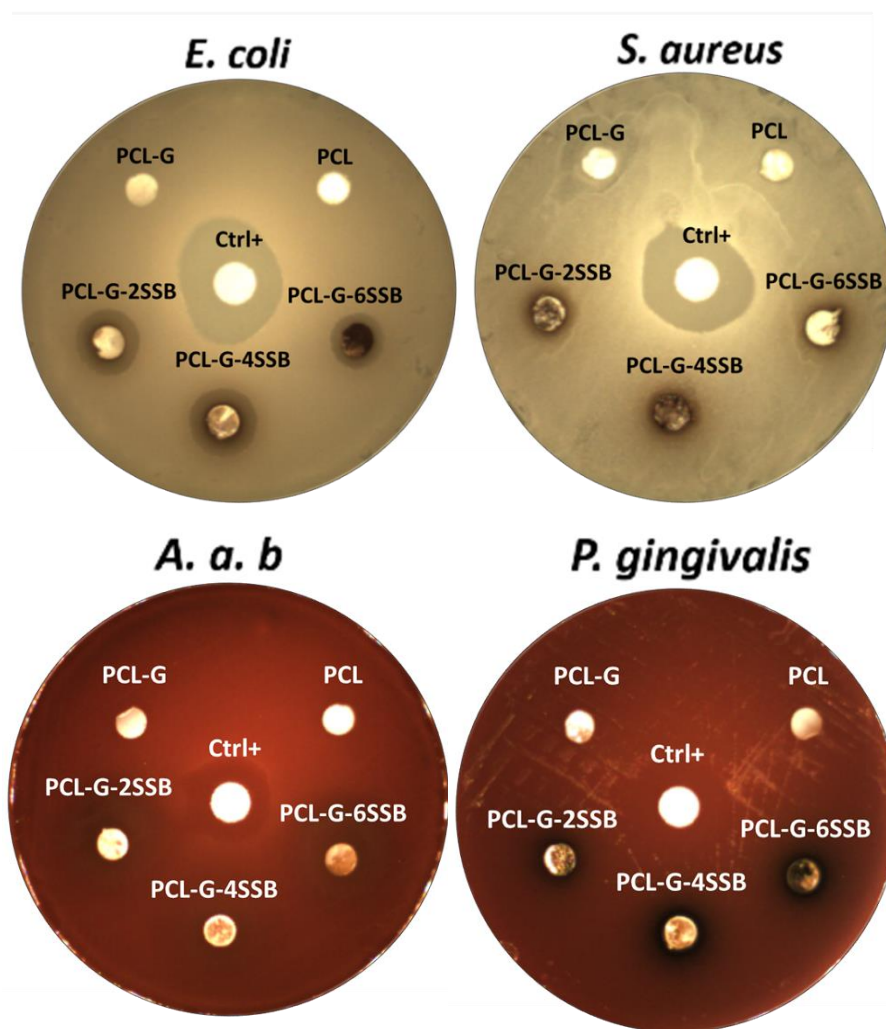


Figura 12. Actividad antimicrobiana en el ensayo de difusión con disco.

Podemos observar en la **figura 12** la formación de halos de inhibición alrededor de las membranas experimentales adicionadas con SSB y también puede observarse la formación de halos oscuros alrededor de las mismas. La **tabla 11** presenta las mediciones de los halos de inhibición, mientras que en la **tabla 12** se reportan las mediciones de los halos oscuros que se formaron alrededor de las membranas experimentales con SSB.

Tabla 11. Diámetros de inhibición (mm) utilizando las membranas experimentales adicionadas con SSB (n=3).

Membrana	Halo de inhibición (mm)			
	<i>A.a b</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>S. aureus</i>
PCL-G-2SSB	-	8 ± 0.8	24 ± 0.4	-
PCL-G-4SSB	-	9 ± 0	23 ± 0.4	-
PCL-G-6SSB	-	12 ± 1.7	25 ± 0.5	-

Tabla 12. Diámetros oscuros (mm) utilizando las membranas experimentales adicionadas con SSB (n=3).

Membrana	Halo oscuro (mm)			
	<i>A.a b</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>S. aureus</i>
PCL-G-2SSB	7.5±0.5	23±0.5	3±0.5	13.7±2.6
PCL-G-4SSB	9.7±0.9	23.7±0.9	5±0.5	15±0.8
PCL-G-6SSB	10±0	25±0	7±0	16.3±2.55

7.2.1.2. Inhibición del crecimiento planctónico (Ensayo de Turbidez y cuantificación del DNA bacteriano).

En la **figura 13A** se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de turbidez utilizando las cepas bacterianas aerobias incubadas durante 1, 3 y 7 días, en presencia de las membranas adicionadas con diferentes concentraciones de SSB.

Podemos observar que las membranas PCL-G-2SSB, PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB (barras en verde) tuvieron un porcentaje de inhibición significativo sobre el crecimiento planctónico de *E. coli* (46.7, 52.6 y 41.6%, respectivamente), comparándolas con el porcentaje de inhibición de las

membranas de PCL y PCL-G (-5.9 y 3.5 %, respectivamente); $p < 0.05$. Mientras que el porcentaje de inhibición observado sobre el crecimiento planctónico de *S. aureus* fue del 40.6% con las membranas de PCL-G-2SSB, 26.1% con las membranas de PCL-G-4SSB y 26.8% con las membranas de PCL-G-6SSB, el cual fue significativamente menor al compararlo con el porcentaje de inhibición de las membranas de PCL (-22.5%); $p < 0.05$.

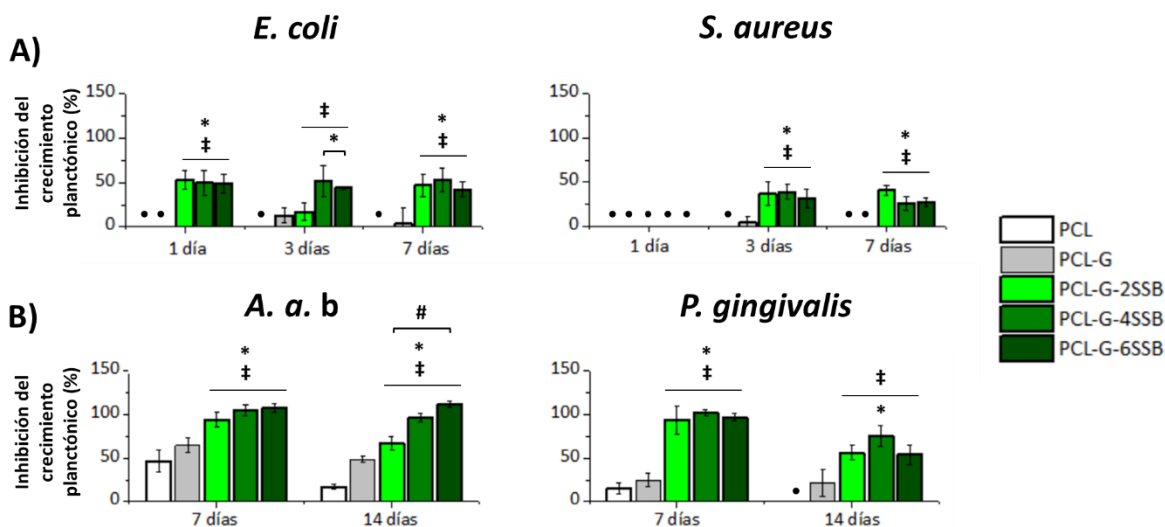


Figura 13. Inhibición del crecimiento planctónico bacteriano determinado por el ensayo de turbidez utilizando cepas bacterianas aerobias (A) y cepas bacterianas anaerobias (B) expuestas a las membranas adicionales con SSB. Los símbolos sobre las barras indican: ‡, $p < 0.05$ PCL vs. PCL-G-SSB; *, $p < 0.05$ PCL-G vs. PCL-G-SSB; #, $p < 0.05$ entre las membranas de SSB; • No presentó inhibición.

En la **figura 13B** observamos los resultados obtenidos utilizando las cepas bacterianas anaerobias incubadas durante 7 y 14 días con las membranas experimentales. En general podemos observar que hubo una mayor inhibición bacteriana de las membranas adicionales con SSB utilizando las bacterias anaerobias *A. actinomycetemcomitans* serotipo b y *P. gingivalis*.

Se puede observar que las membranas PCL-G-2SSB, PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB tuvieron un porcentaje de inhibición significativo sobre el crecimiento planctónico de *A. actinomycetemcomitans* serotipo b (53.8, 82.4 y 97.9%, respectivamente) al compararlo con el porcentaje de inhibición de las membranas de PCL-G (38%) a los 14 días de incubación, $p < 0.05$. Mientras que el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento planctónico de *P. gingivalis* fue

significativamente mayor al utilizar la membrana PCL-G-4SSB (75.1%), comparado con el crecimiento sobre las membranas de PCL-G (21.4%) $p < 0.05$.

La cuantificación del DNA bacteriano total presente en los sobrenadantes de la incubación bacteriana se observan en la **figura 14**. En general, se detectó una disminución en la cantidad de DNA bacteriano en todas las cepas bacterianas cuando se expusieron a las membranas SSB en todos los tiempos de incubación, especialmente cuando se probaron las cepas anaeróbicas.

En la **figura 14A** se muestra la cuantificación del DNA de *E. coli* y *S. aureus*. La cantidad de DNA de *E. coli* se redujo significativamente en las membranas adicionadas con SSB (22.5, 18.8 y 17.1 ng/ μ L, respectivamente), comparándolas con la con la cantidad de DNA en las membranas de PCL y PCL-G (39.8 y 34.9 ng/ μ L, respectivamente) a los 7 días de incubación; $p < 0.05$. Un efecto similar a los 7 días de incubación presentó *S. aureus*, donde la cantidad de DNA fue significativamente menor en las membranas con SSB (8.4, 12.7 y 4.8 ng/ μ L, respectivamente) comparado con la cantidad de DNA en las membranas de PCL y PCL-G (42.6 y 33.2 ng/ μ L, respectivamente); $p < 0.05$.

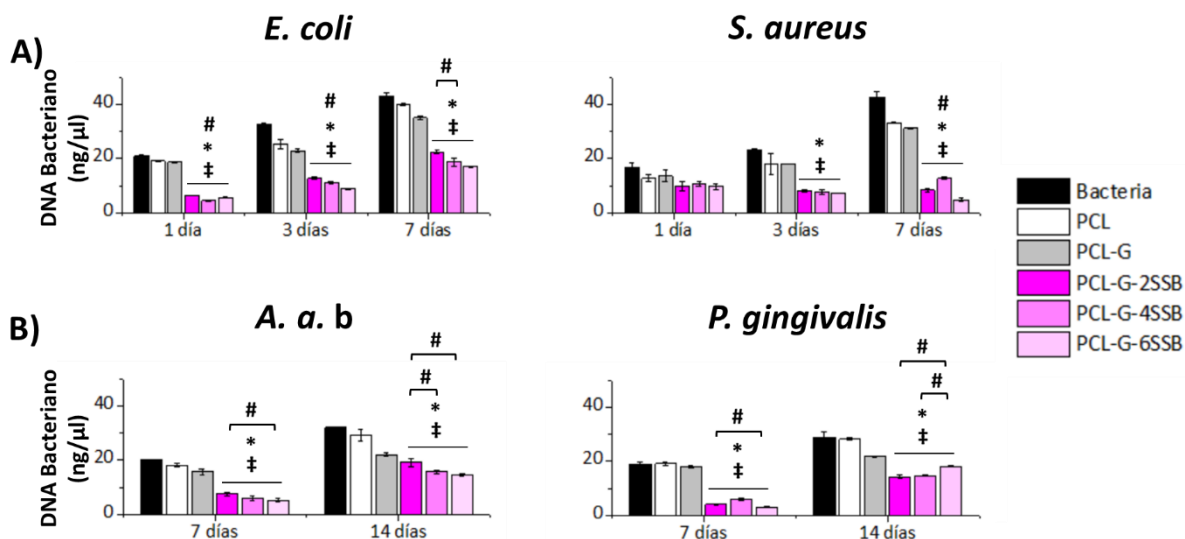


Figura 14. Cuantificación de DNA bacteriano obtenida de sobrenadantes de cepas bacterianas aerobias (A) y cepas bacterianas anaerobias (B) expuestas a las membranas adicionadas con SSB. Los símbolos sobre las barras indican: ‡, $p < 0.05$ PCL vs. PCL-G-SSB; *, $p < 0.05$ PCL-G vs. PCL-G-SSB; #, $p < 0.05$ entre las membranas de SSB; • No presentó inhibición.

Se observa en la **figura 14B** la cuantificación de DNA perteneciente a las cepas bacterianas anaerobias (*A. actinomycetemcomitans* serotipo b y *P. gingivalis*) incubadas durante 7 y 14 días con las membranas experimentales.

En las membranas PCL-G-2SSB, PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB se observa una disminución significativa sobre la cantidad del DNA de *A. actinomycetemcomitans* serotipo b (19.1, 15.8 y 14.7 ng/ μ L, respectivamente) al compararlo con la cantidad del DNA presente en las membranas de PCL y PCL-G (32 y 29.2 ng/ μ L, respectivamente) a los 14 días de incubación, $p < 0.05$. La cantidad de DNA de *P. gingivalis* fue significativamente menor en las membranas adicionadas con SSB (14.3, 14.8 y 18.2 ng/ μ L, respectivamente), comparadas con la cantidad de DNA obtenido de las bacterias presentes en las membranas de PCL y PCL-G (28.8 y 28.2 ng/ μ L, respectivamente) $p < 0.05$.

7.2.1.3. Inhibición de la adhesión bacteriana y formación de biopelículas (Ensayo de MTT).

En la **figura 15A** se muestran los resultados del efecto antibacteriano sobre la adhesión bacteriana y formación de biopelículas utilizando las cepas bacterianas aerobias *E. coli* y *S. aureus*, incubadas a diferentes periodos de tiempo (1, 3 y 7 días) en presencia de las membranas experimentales. Por medio del ensayo de viabilidad celular de MTT, pudimos determinar el porcentaje de inhibición en la superficie de las membranas experimentales.

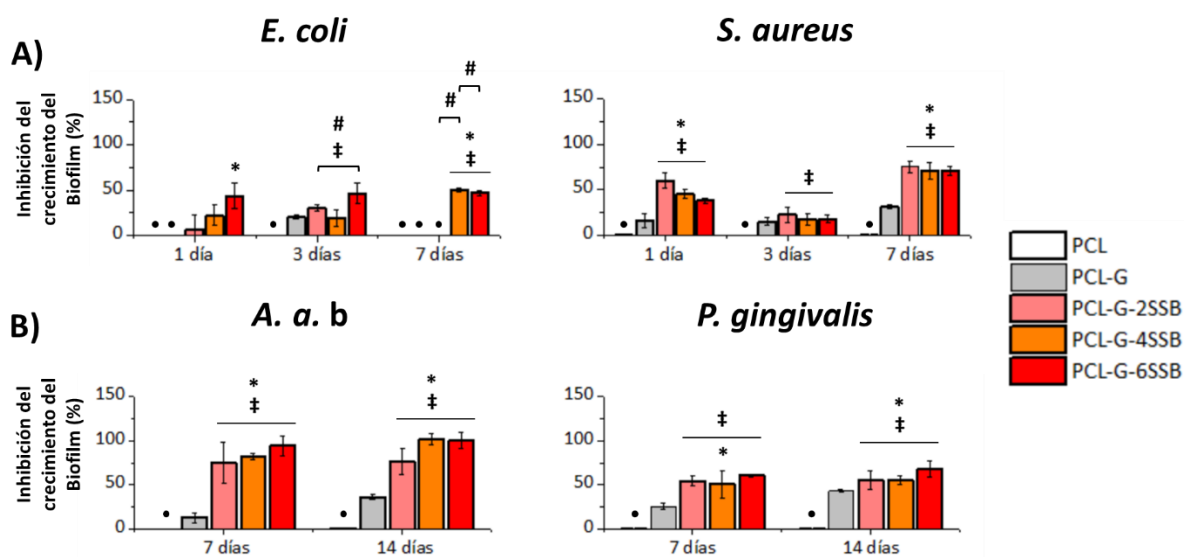


Figura 15. Inhibición sobre adhesión y formación de biopelícula determinado por el ensayo de viabilidad celular de MTT utilizando cepas bacterianas aerobias (A) y bacterias anaerobias (B) expuestas a las membranas adicionadas con SSB. Los símbolos sobre las barras indican: ‡, $p < 0.05$ PCL vs. PCL-G-SSB; *, $p < 0.05$ PCL-G vs. PCL-G-SSB; #, $p < 0.05$ entre las membranas de SSB; • No presentó inhibición.

En general, las bacterias aerobias presentaron una menor adhesión y formación de biopelícula sobre las membranas adicionadas con SSB. La viabilidad celular de *E. coli* se vio reducida significativamente en todos los tiempos de incubación sobre las membranas con mayor cantidad de SSB (PCL-G-6SSB), comparando la viabilidad encontrada sobre las membranas de PCL. A los 7 días de incubación, la inhibición de las membranas PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB (50.1 y 46.5%, respectivamente) fue significativamente menor que la inhibición detectada sobre las membranas de PCL-G (-15.8%), $p < 0.05$, utilizando la cepa bacteriana *E. coli*. Mientras que al utilizar la cepa bacteriana *S. aureus* el porcentaje de inhibición fue significativamente mayor en las membranas adicionadas con SSB, comparándolas con las membranas de PCL, manteniendo este efecto durante los tres periodos de incubación. El porcentaje de inhibición a los 7 días de incubación fue significativamente menor en las membranas PCL-G-2SSB, PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB (75.4, 7.6 y 70.6%, respectivamente), al compararlas con la viabilidad detectada sobre las membranas de PCL-G (31.4%) $p < 0.05$, al utilizando *S. aureus*.

Por otro lado, las membranas adicionadas con SSB tuvieron una mayor inhibición en las cepas anaerobias; sin embargo, *A. actinomycetemcomitans* serotipo b fue más sensible a la presencia del SSB que *P. gingivalis* (**Figura 15B**).

Después de 14 días de incubación, la inhibición sobre la adhesión y formación de biopelícula de *A. actinomycetemcomitans* serotipo b aumentó significativamente en las membranas PCL-G-2SSB, PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB (76.1, 101.5 y 100%, respectivamente), en comparación con la viabilidad observada sobre las membranas de PCL-G (36.2%); $p < 0.05$.

Un efecto similar fue observado con *P. gingivalis*, ya que a los 14 días de incubación la inhibición sobre la viabilidad celular disminuyó significativamente sobre las membranas PCL-2SSB, PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB (55.3, 55.7 y 67.7%), en comparación con el porcentaje de viabilidad observado sobre las membranas de PCL-G (43.1%); $p < 0.05$.

7.2.2. Evaluación de citotoxicidad.

La viabilidad de las células cultivadas en contacto con los productos de lixiviación de las membranas fue estimada por medio del ensayo de MTT; los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. La viabilidad de los hFOB5 cultivados en presencia de los productos de lixiviación de las membranas (**figura 16A**), fue similar a la observado en el control positivo (hFOB5 cultivados en condiciones estándar) durante los diferentes periodos de cultivo estudiados, sin mostrar diferencias

significativas ($p > 0.05$), incluso para aquellas células expuestas a los productos de lixiviación de las membranas con la mayor concentración de SSB (PCL-G-6SSB).

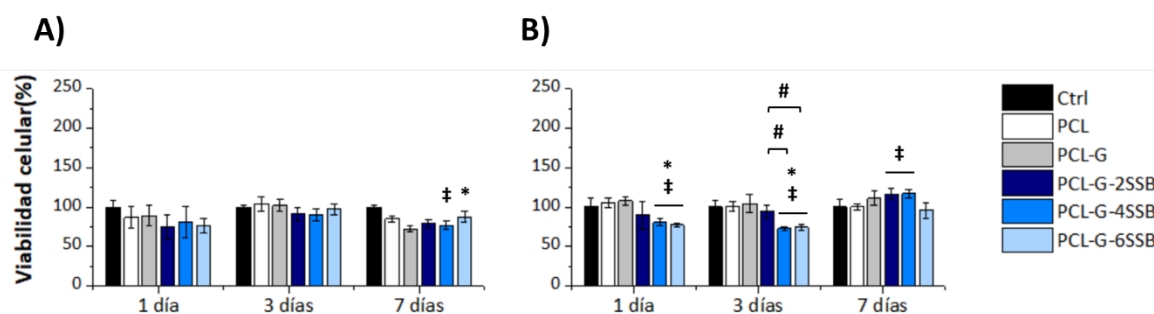


Figura 16. Viabilidad de **A)** osteoblastos humanos y **B)** fibroblastos gingivales humanos expuestos a los productos de lixiviación de las membranas después de 1, 3 y 7 días de cultivo. La viabilidad celular de las membranas en condiciones normales de cultivo (sin productos de lixiviación) se consideró como una viabilidad del 100%, en cada tiempo de cultivo. ‡, $p < 0,05$, para membranas PCL frente a PCL-G-SSB; *, $p < 0,05$, para membranas PCL-G frente a PCL-G-BSS; #, $p < 0.05$, entre membranas de SSB.

Las células HGF-1 expuestas a los productos de lixiviación de las membranas (**figura 16B**) mostraron una disminución significativa de la viabilidad relacionada con la concentración de SSB en las membranas, para las membranas PCL-G-4SSB y PCL-G-6SSB en comparación con el Ctrl+ y con la membrana PCL-G, y solo durante las primeras 72 h de cultivo. En ningún caso la viabilidad celular disminuyó del 70%, en comparación con el Ctrl+. A los 7 días de cultivo, la viabilidad de las células HGF-1 expuestas a los productos de lixiviación de las membranas que contenían SSB no fue significativamente diferente de la de PCL-G y fue significativamente superior para las células expuestas a los productos de lixiviación de las membranas PCL-G-2SSB y PCL-G-4SSB, en comparación con el Ctrl+ y la membrana de PCL.

7.2.2.1 Viabilidad celular (Ensayo de MTT).

Se exploró la interacción de las membranas experimentales con las células hFOB evaluando la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT a 1, 3 y 7 días de cultivo. Con este ensayo se pudo observar que, a los 7 días de cultivo, la viabilidad de las células osteoblásticas adheridas a las membranas con SSB disminuía de manera significativa en comparación con las membranas de PCL y PCL-G (**figura 17**).

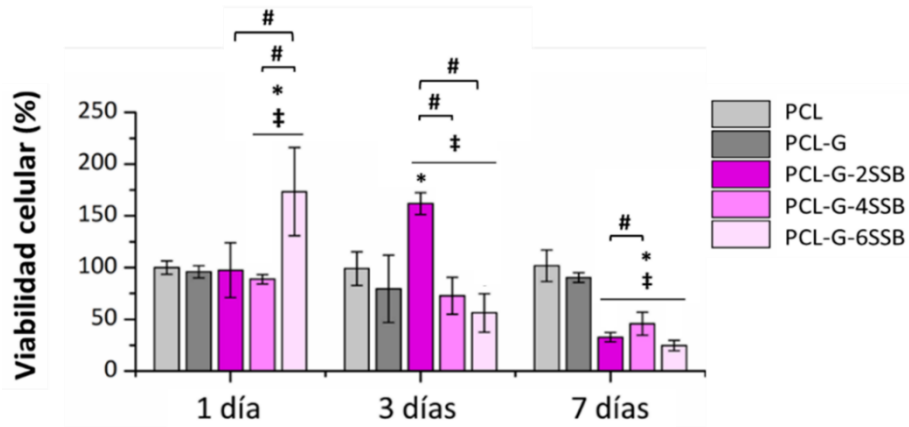


Figura 17. Viabilidad celular de osteoblastos humanos cultivados sobre las membranas. ‡, $p < 0,05$, para membranas PCL frente a PCL-G-SSB; *, $p < 0,05$, para membranas PCL-G frente a PCL-G-SSB; #, $p < 0,05$, entre las membranas con SSB.

7.2.2.2 Evaluación de la interacción membrana-célula (SEM)

A través de SEM se evaluó la interacción membrana-célula sembrando sobre las membranas hFOB y observándolas después de 72 h de cultivo. Se pudo observar algunas células adheridas a todas las membranas ensayadas (**Figura 17**). Las células sembradas sobre las membranas de PCL y PCL-G exhibieron una morfología fusiforme; sin embargo, se observaron cambios en la morfología de las células sembradas en las membranas que contenían SSB, exhibiendo células con una morfología más redonda o menos extendidas.

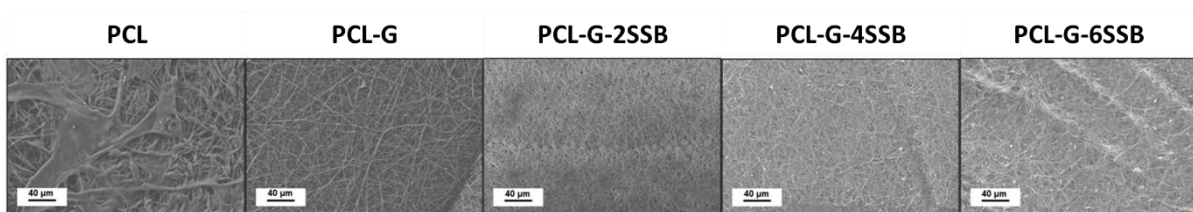


Figura 18. Imágenes representativas de SEM de osteoblastos humanos cultivados en las membranas electrohiladas

VIII. DISCUSIÓN.

Dentro de las principales causas que provocan el fracaso de los tratamientos de RTG, está la contaminación de las membranas con bacterias orales que provocan infecciones y aceleran la biodegradación de las membranas, y en consecuencia la ruptura de estas. Además, la exposición prematura de las membranas al ambiente oral provoca que las bacterias se adhieran fácilmente y proliferen, formando biopelículas que confieren resistencia bacteriana a la terapia con antibióticos (Ling et al., 2003; H. L. Wang, Yuan, Burgett, Shyr & Syed, 1994). Por tal razón, el desarrollo de membranas adicionadas con agentes antibacterianos alternativos al uso de los antibióticos convencionales, capaces de prevenir la colonización bacteriana y con propiedades mecánicas y tasas de biodegradación adecuadas para permitir la completa regeneración del tejido, puede contribuir a mejorar el éxito de los tratamientos de RTG.

En el presente estudio se desarrollaron membranas electrohiladas de PCL y Gel adicionadas con diferentes cantidades de SSB como agente antibacteriano alternativo al uso de antibióticos convencionales. Las membranas se fabricaron mediante la técnica de electrohilado debido a la conocida capacidad de esta técnica para producir estructuras fibrilares poliméricas, con potencial para ser usadas en diferentes aplicaciones de ingeniería de tejidos (Rodriguez-Tobias et al., 2019).

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo, han demostrado que el uso de AcAc como disolvente para soluciones de electrohilado de PCL-Gel mejora su miscibilidad. Esto fue corroborado en el presente estudio a través de los espectros FT-IR de las membranas de PCL-G y PCL-G-SSB exhibieron una banda ancha a 3296 cm^{-1} que sugiere la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos -OH y -NH de la PCL y la Gel, respectivamente (Feng, Tu, Yuan, Peng & Zhang, 2012; Gautam, Dinda & Mishra, 2013; Prado-Prone et al., 2020). La posible interacción del SSB con el AcAc durante la mezcla de soluciones de electrohilado también fue evaluada por FT-IR y TEM, donde los resultados de ambas técnicas sugirieron que no ocurría interacción química entre estos dos componentes. En el análisis de las imágenes obtenidas por TEM, no se observó evidencia de degradación del SSB por la interacción con el AcAc, sino sólo la disolución y dispersión de SSB en partículas cristalinas más pequeñas, en comparación con el polvo de SSB tal como se recibió. Esto coincide con estudios anteriores que evidencian la disolución y posterior precipitación de salicilatos de bismuto en soluciones ácidas (Timakova, Udalova, Yukhin & Ieee, 2008).

Por otro lado, en cuanto a la morfología de las membranas, analizada por medio de SEM, se observó que la adición de la Gel a las membranas redujo el diámetro medio de la fibra, en

comparación con las membranas compuestas sólo por PCL. Este fenómeno puede explicarse por los grupos amino protonados en la solución de la Gel a pH ácido que aumentan la densidad de carga de la solución y crean mayores fuerzas de alargamiento durante el proceso de electrohilado, dando como resultado la producción de fibras más delgadas (Gautam et al., 2013). La adición de SSB a la disolución de electrohilado no alteró significativamente el diámetro de las fibras en las membranas, sin embargo, las fibras fueron más delgadas a medida que aumentaba la concentración de SSB. Esto fue posiblemente la causa del incremento observado en el tamaño de los poros en las membranas a medida que aumentaba la concentración de SSB en las membranas. Estos cambios pueden explicarse por un aumento en la densidad de carga y la conductividad de las soluciones de electrohilado en presencia del SSB ionizado (Angamma & Jayaram, 2011; Purushothaman, Thakur & Kandasubramanian, 2020). Otra posible explicación para el incremento en el tamaño de los poros en las membranas adicionadas con SSB es la repulsión carga-carga entre las fibras cuando se depositaron en el colector durante el proceso de electrohilado; debido a que la densidad de carga en las soluciones de PCL-Gel-SSB fue mayor en comparación con las soluciones de PCL-Gel. La repulsión electrostática generada entre la superficie de las fibras facilita su separación y por tanto puede aumentar el tamaño de poro en las membranas que contenían SSB en comparación con las membranas PCL-G. La estructura porosa de las membranas que contienen SSB (aumento en la porosidad de 35.3 a 155.28 μm^2 en comparación con las membranas PCL-G) puede ser una ventaja para las terapias de RTG (Staples, Ivanovski & Vaquette, 2019; Vaquette, Saifzadeh, Farag, Hutmacher & Ivanovski, 2019). De acuerdo con estudios previos un tamaño de poro $\approx 220 \pm 144 \mu\text{m}$ en membranas de PCL para RTG, permitió la interacción celular y la producción de matriz extracelular, mostrando que el tamaño de poro en las presentes membranas con SSB puede evitar la infiltración tisular de un lado al otro de la membrana, pero facilitar la interacción celular con el andamio y el intercambio de nutrientes y desechos celulares (Wu & Hong, 2016). Por otro lado, el grosor de las membranas experimentales (0.3 - 0.4 mm) es similar a las membranas comerciales para RTG con un grosor reportado de entre 0.2 - 0.4 mm, proporcionando un espacio adecuado para la regeneración del tejido periodontal (Milella et al., 2001; Ortolani et al., 2015; H. L. Wang et al., 1994).

La incorporación del SSB en las membranas fue confirmada por TEM, mapeo elemental y EDS. En las imágenes de TEM y el mapeo elemental se pudo observar que la concentración de Bi aumentó en las zonas donde se observaron partículas de SSB incrustadas en las fibras; además, se observó una distribución homogénea de Bi en todas las fibras de todas las membranas adicionadas

con SSB. Los resultados de las pruebas realizadas sugieren que la disolución de SSB durante la mezcla de la solución de electrohilado (AcAc-PCL-Gel-SSB) facilitó la dispersión homogénea del SSB y su consiguiente distribución homogénea en las membranas.

Lo determinado por el análisis termogravimétrico indica que la incorporación de SSB disminuyó la estabilidad térmica de las membranas de PCL-G. Probablemente, las partículas de SSB produjeron la ruptura de algunas de las cadenas poliméricas de la PCL o de la Gel y, en consecuencia, estos fragmentos se degradaron a temperaturas más bajas (Castellano, Alloisio, Darawish, Dodero & Vicini, 2019). El análisis de calorimetría junto con los resultados obtenidos por la técnica de XRD sugiere que la cristalinidad de las membranas disminuyó con la adición de la Gel, la cual es un componente amorfo. Además, la entalpía de fusión por gramo de PCL presente en cada membrana (ΔH_m [PCL]) sugirió que las partículas de SSB no restringen la movilidad de las cadenas de PCL y por lo tanto la capacidad de cristalización de la PCL en las membranas permanece. Sin embargo, la membrana PCL exhibió un 8% más de cristalinidad que la PCL prístina, probablemente a causa de la acidez de la solución de electrohilado (por la presencia del AcAc). La disminución en el pH puede aumentar el número de grupos -OH terminales en la PCL debido a una ligera degradación en la región amorfa de la PCL (Ramírez Hernández, Crisanto Contreras, Conde Acevedo & Navarro Moreno, 2013), favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno entre algunas cadenas orientadas por las fuerzas de elongación durante el proceso de electrohilado, produciendo un mayor porcentaje de cristalización en la PCL después del proceso de electrohilado en comparación con la PCL prístina (Olubayode, Mike & Artemis, 2012).

Para tener éxito en el tratamiento de RTG, es muy importante que las membranas tengan propiedades mecánicas adecuadas para mantener la integridad estructural necesaria durante el procedimiento quirúrgico y las actividades orales diarias (Bottino et al., 2012). De acuerdo con las propiedades mecánicas obtenidas, las membranas adicionadas con SSB exhibieron un mayor módulo elástico en condiciones secas ($E = 75-82$ MPa) y húmedas ($E = 5-4$ MPa) comparadas con membranas de colágeno reabsorbibles disponibles en el mercado ($E = 90- 700$ MPa) (Milella et al., 2001), condición que es trascendente al momento de manipular la membrana durante el procedimiento quirúrgico. No obstante, la resistencia a la tracción de las membranas que contenían SSB en condiciones secas y húmedas ($\sigma_{max} = 1-3$ MPa) fue menor que lo reportado en membranas de colágeno comercialmente disponibles ($\sigma_{max} = 5-22$ MPa); esto debe tenerse en cuenta cuando las membranas se inmovilizan en el sitio del defecto. En general, las membranas adicionadas con SSB

mostraron un mayor alargamiento a la rotura en condiciones secas ($\epsilon = 3-93\%$) y húmedas ($\epsilon = 75-182\%$), en comparación con las membranas de colágeno comerciales ($\epsilon = 6-8\%$), lo que les da una mayor plasticidad, que es esencial durante la fijación de la membrana en el procedimiento quirúrgico (Coic, Placet, Jacquet & Meyer, 2010; Milella et al., 2001). Nuestros resultados demuestran que las membranas adicionadas con SSB después de haber sido humectadas cuentan con propiedades mecánicas superiores a las membranas de colágena disponibles en el mercado, ya que las propiedades mecánicas de estas últimas disminuyen considerablemente después de humectarse, dificultado su manipulación durante su fijación en el defecto periodontal (Caballe-Serrano, Munar-Frau, Delgado, Perez & Hernandez-Alfaro, 2019).

La mojabilidad de las membranas es una propiedad relevante para el tratamiento de RTG, ya que puede mejorar las interacciones biológicas de las membranas. El análisis de mojabilidad indicó que la integración de la Gel a las membranas produjo una superficie hidrofílica, en condiciones secas y húmedas. En tanto que, las membranas adicionadas con SSB mostraron un comportamiento hidrofóbico en condiciones secas, mientras que en estado húmedo la superficie de las membranas fue hidrofílica. Se ha reportado que membranas con características hidrofóbicas mejoran su capacidad como membrana barrera impidiendo la invasión del tejido gingival en el defecto periodontal (Kao & Fiorellini, 2012). La Gel contenida en las membranas adicionadas con SSB y su porosidad inherente pueden explicar su carácter hidrofílico en condiciones húmedas, debido principalmente a la capacidad de absorción de agua de las membranas. El carácter hidrofóbico en estado seco de las membranas adicionadas con SSB puede explicarse por la insolubilidad del SSB en agua, lo que confiere a las membranas una superficie hidrofóbica (Salvador et al., 2012). Otra posible explicación es la ionización del SSB en las membranas, lo cual podría reducir la energía superficial de las membranas y, en consecuencia, su interacción positiva con el agua, dando como resultado un carácter hidrofóbico en su estado seco (Stammitti-Scarpone & Acosta, 2019).

La tasa de biodegradación es otro factor que determina la eficiencia de las membranas para RTG, las cuales se espera que funcionen como barreras durante un periodo de al menos 6 semanas para promover la regeneración total de los tejidos periodontales (Sculean, Stavropoulos & Bosshardt, 2019). La rápida degradación de las membranas puede provocar el colapso prematuro de las mismas (Florjanski et al., 2019). La degradación inicial de las membranas adicionadas con SSB durante la primera semana de inmersión en solución enzimática a 37 °C presentó una mayor

velocidad de degradación que la velocidad observada para estas mismas membranas una vez transcurrido este tiempo. Esta rápida degradación inicial se puede explicar debido a la solubilización de la Gel contenida en las membranas, proceso que ocurre durante la primera semana de inmersión de las membranas. Sin embargo, la adición de SSB a las membranas, al ser una sal insoluble, disminuyó esta rápida tasa de degradación inicial, en comparación con la membrana PCL-G. La degradación promedio observada para las presentes membranas con SSB puede ser ventajosa, ya que, de acuerdo a estos datos, se espera que la degradación *in vivo* de las membranas, con la consecuente pérdida de su resistencia mecánica, ocurra entre 4 y 6 semanas después de la inmovilización de la membrana, siendo esta una degradación más lenta que la observada para las membranas a base de colágeno, pero no tan lenta como la de la PCL. Por otro lado, la disolución de la Gel en el sitio del defecto, durante la primera semana de inmersión en medios acuosos, podría mejorar la regeneración del tejido, permitiendo que la membrana funcione correctamente como barrera mejorando también el proceso de regeneración (Jiang, Carbone, Lo & Laurencin, 2015; J. L. Wang et al., 2016; Wu & Hong, 2016).

La liberación de Bi es una propiedad importante para considerar, ya que se encuentra relacionada con el potencial antibacteriano de las membranas. No obstante, la liberación de Bi también podría estar relacionada con el potencial citotóxico de las membranas adicionadas con SSB. En las membranas con SSB, se observó una liberación repentina de Bi en las primeras 24 h de incubación en medio de cultivo DMEM-F12, que podría estar relacionada con la degradación más rápida de las membranas en los primeros días de inmersión en medio acuoso debido a la liberación de gelatina. En los períodos más largos de incubación, se observó una liberación más pequeña, controlada y sostenida de Bi a lo largo del tiempo.

Respecto de la efectividad antimicrobiana del SSB, este compuesto ha demostrado ampliamente su capacidad como agente alternativo al uso de antibióticos siendo efectivo contra varios microorganismos de la cavidad oral y otros patógenos de interés médico (Alharbi et al., 2012; Pitz et al., 2015; Salvador et al., 2012). En este estudio, la adición de SSB a las membranas electrohiladas evidenció una inhibición en el crecimiento de las cuatro cepas bacterianas utilizadas (*E. coli*, *S. aureus*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo b y *P. gingivalis*). Se observó, que el patógeno periodontal *P. gingivalis* (Gram negativo) fue el más sensible a la presencia del SSB en las membranas adicionadas con este compuesto, mientras que el patógeno oportunista *S. aureus* (Gram positivo) fue el menos sensible a la presencia del SSB en las membranas.

En el ensayo de difusión de disco para evaluar la sensibilidad antimicrobiana de las membranas se pudo observar la formación de halos oscuros alrededor de las membranas adicionadas con SSB en las placas de agar. Este fenómeno podría estar relacionado con la reacción que ocurre entre el SSB y una fuente de azufre; en el caso de las bacterias aerobias esta reacción puede estar ocurriendo con la Cisteína ($\text{HS-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH}$) o con el ácido sulfúrico (H_2S) de las bacterias anaeróbicas (Burford, Eelman, Mahony & Morash, 2003; Burrows et al., 2015; Marzano et al., 2013; Tsai & Rhodes, 1990), produciéndose así un sulfuro de bismuto (Bi_2S_3), que es una sal negra altamente insoluble en medios acuosos (Manhart, 1990; Pitz et al., 2015). Por lo tanto, este fenómeno de oscurecimiento del agar alrededor de las membranas adicionadas con SSB sugiere que este compuesto se está liberando de las membranas e interacciona de alguna manera con las bacterias presentes en el agar. En este ensayo fue posible observar que las bacterias *E. coli* y *P. gingivalis* fueron más sensibles a la presencia de las membranas adicionadas con SSB, lo que sugiere que las bacterias Gram negativas son posiblemente más susceptibles a las partículas de SSB, en comparación con las bacterias Gram positivas como *S. aureus*. Esto podría estar relacionado con la estructura de la envoltura celular bacteriana. Las bacterias Gram negativas tienen una pared celular delgada formada de una fina capa de peptidoglicano, la cual está rodeada por dos membranas, una interna y una externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa formada por varias cadenas de peptidoglicanos, que podría conferirles protección adicional contra el SSB (Domalaon, Idowu, Zhanel & Schweizer, 2018)(Domalaon et al., 2018). A este respecto, se ha descrito que algunos compuestos de bismuto tienen la capacidad de inhibir la acción de las metalo- β -lactamasas al desplazar el cofactor Zn (II) desencadenando la apoptosis celular en *Helicobacter pylori* (bacteria Gram negativa) (R. M. Wang et al., 2018). Sin embargo, también se deben considerar procesos más complejos, como la susceptibilidad intrínseca de cada microorganismo al SSB (Domalaon et al., 2018; Prasad et al., 2018).

Lo observado en el ensayo de turbidez, sugiere que la inhibición sostenida del crecimiento bacteriano planctónico (es decir, las bacterias libres en medio de cultivo), podría deberse a las partículas liberadas de SSB o a los iones bismuto (Bi^{3+}) liberados de las membranas como resultado de su biodegradación. Se ha reportado que los iones Bi^{3+} pueden interrumpir el ciclo de Krebs, al unirse a la subunidad F1 de la ATP sintetasa, interrumpiendo el metabolismo bacteriano y llevando eventualmente a la muerte celular (Beil et al., 1995; Bland et al., 2004). Aunque el mecanismo de acción del SSB no está completamente dilucidado, se sabe que el SSB puede reaccionar con algunas fuentes de azufre presentes en las bacterias mediante hidrólisis en un ambiente ácido (Mahony et

al., 2005; von Hehn et al., 2014), produciendo sales de bismuto como el oxiclورو de bismuto (BiOCl) y el sulfuro de bismuto (Bi_2S_3), Bi^{3+} y salicilato de sodio ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$) (Barton et al., 2019; Kushkevych et al., 2020), que en concentraciones suficientes, pueden coadyuvar al efecto antimicrobiano (Alharbi et al., 2012; Mahony et al., 1999; Salvador et al., 2012).

Por otro lado, para comprender la eficacia del SSB para reducir la formación de las biopelículas formadas sobre las membranas, debemos considerar sus propiedades inherentes como; la distribución de partículas de SSB en la membrana, la liberación del SSB en el medio y la descomposición de la molécula de SSB, entre otras. Una explicación plausible de la reducción de la adhesión bacteriana (paso inicial en la formación de biopelícula) en las membranas que contenían SSB, puede ser la producción de algunos tioles de bismuto transitorios producidos por la degradación de la molécula de SSB. Se ha reportado que los tioles de bismuto pueden inhibir el desarrollo de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa), a través de la irrupción de O-acetilación en cadenas de polisacáridos extracelulares (Badireddy, Chellam, Yanina, Gassman & Rosso, 2008; Folsom et al., 2011; Luqman et al., 2015; Nivens, Ohman, Williams & Franklin, 2001).

El efecto antibacteriano de las membranas adicionadas con SSB parece no estar correlacionado con su concentración. Una explicación plausible de esto puede deberse a la distribución no homogénea del SSB en la superficie de la membrana y su tasa de liberación en el medio de cultivo. Además, diferentes características en la solución de electrohilado, como la viscosidad, la conductividad o la tensión superficial de las membranas con SSB, ya que posiblemente forman grupos aleatorios de SSB en el momento de la fabricación de la membrana.

En este estudio, la citotoxicidad de las membranas se evaluó utilizando líneas celulares de osteoblastos y fibroblastos gingivales humanos (hFOB y HGF-1, respectivamente), expuestas a los productos de lixiviación de las membranas experimentales. Recordemos que uno de los principales objetivos en la terapia de RTG es crear una barrera oclusiva, pero biocompatible, cuando la membrana se coloca en el sitio quirúrgico, previniendo la migración de las células epiteliales al sitio del defecto. Utilizamos la línea celular de osteoblastos hFOB, ya que uno de los tejidos en contacto con las membranas es el hueso alveolar que, junto con el ligamento periodontal y el cemento restante, deben promover la regeneración en la zona del defecto. En este ensayo se observó una adecuada viabilidad y proliferación de los hFOB, cuando estas células estuvieron en contacto con los productos de lixiviación de las membranas, confirmando la baja citotoxicidad de las membranas adicionadas con SSB, lo que coincide con lo previamente reportado en estudios *in vivo* e *in vitro*

(Gilster et al., 2004; Lin et al., 2013; Tanaka, Guth, Carryl & Kaunitz, 1997). Otros informes también han indicado que el SSB puede aumentar los iones de calcio (Ca^{2+}) intracelular en osteoblastos, activando la vía dependiente de MAP-quinasa promoviendo la proliferación celular (Gilster et al., 2004). También pudimos corroborar la baja citotoxicidad de los productos de lixiviación de las membranas con HGF-1, al exhibir estas células una viabilidad celular similar que el control positivo después de 7 días de cultivo en presencia de los productos de lixiviación de membranas que contenían SSB. Lo que coincide con estudios previos que reportan la baja citotoxicidad del bismuto y otros compuestos de bismuto en bajas concentraciones, utilizando diferentes líneas celulares como fibroblastos, osteoblastos y células tumorales (Ahamed, Akhtar, Khan, Alrokayan & Alhadlaq, 2019; Keogan & Griffith, 2014; Vega-Jimenez et al., 2017; Zainudin, Ab Razak, Abidin, Abdullah & Rahman, 2020).

Al evaluar la interacción de las células hFOB con las membranas experimentales, se observó que a medida que la concentración de SSB aumentaba, la viabilidad celular disminuía a los 7 días de cultivo. En este sentido, se ha reportado que al acumularse la biodisponibilidad de compuestos de bismuto se puede producir un efecto citotóxico; por lo cual también se ha explorado su uso como agente antineoplásico (Alamer et al., 2020). Reportes anteriores indican que, compuestos de Bi, como el Bi_2O_3 , en altas concentraciones, pueden reducir la viabilidad celular, detener el ciclo celular en fase G0-G1 y generar estrés oxidativo desencadenando la apoptosis en células tumorales MCF-7 (Ahamed et al., 2019; Luo et al., 2012; Zainudin et al., 2020). Además, se ha descrito que nanopartículas de Bi^{3+} pueden generar cambios epigenéticos al interrumpir la metilación de varios grupos de genes que regulan la endocitosis, produciendo cambios en la morfología celular y deteriorando los organelos intracelulares (Liu et al., 2017). Sin embargo, se considera que tanto el Bi como el SSB y otros compuestos de Bi son seguros cuidando su empleo y biodisponibilidad en el organismo (Ahamed et al., 2019; Thomas, Bialek & Reinhard, 2012).

Los resultados de este estudio demuestran el potencial que tienen las membranas adicionadas con SSB para su uso clínico en tratamientos periodontales de RTG. No obstante, es necesario realizar más ensayos que nos permitan profundizar en los efectos biológicos que las membranas experimentales podrían producir sobre la función de las células con las que pueden estar en contacto, incluyendo células bacterianas. Con estos ensayos podríamos tener las bases para realizar pruebas *in vivo* en modelos animales de enfermedad periodontal y si son exitosas, evaluar la incorporación clínica de nuestras membranas en tratamientos periodontales de RTG.

X. CONCLUSIONES.

En este estudio se fabricaron con éxito membranas fibrilares mediante la técnica de electrohilado utilizando PCL y Gel como componentes estructurales base, adicionadas con SSB como componente antibacteriano seguro, alternativo al uso de antibióticos.

En cuanto a su caracterización físico-química las membranas experimentales mostraron una distribución homogénea del SSB, con un tamaño de poro y diámetro de las fibras adecuados para ser utilizadas como membranas para tratamientos de RTG. Además, las propiedades mecánicas, así como la mojabilidad y degradación fueron comprobables con las propiedades que presentan las membranas de RTG disponibles actualmente en el mercado.

Las membranas de PCL-G-SSB tuvieron un efecto antimicrobiano efectivo contra especies bacterianas aerobias y anaerobias Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, se observó un mayor efecto antimicrobiano en las especies Gram negativas que fueron probadas (*A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *E. coli* y *P. gingivalis*).

Adicionalmente, los ensayos de citotoxicidad utilizando líneas celulares de osteoblastos y fibroblastos gingivales humanos (hFOB y HGF-1), mostraron que los productos de lixiviación de las membranas adicionadas con SSB no fueron citotóxicos para estas líneas celulares.

Considerando lo anterior, las membranas de PCL-G-SSB demostraron tener potencial para su uso clínico en tratamientos periodontales de RTG, debido a sus propiedades físico-químicas, su tasa de biodegradación, propiedades mecánicas, su capacidad antibacteriana, y baja citotoxicidad *in vitro*.

XI. REFERENCIAS.

- Abe, F. C., Bergamaschi, C. D., Figueiro, M. F. & Lopes, L. C. (2018). Resistance profile to antimicrobial agents the main circulating bacteria isolated from acute periodontal and endodontic infections in Latin America (MICROBE- DENT) A systematic review protocol. *Medicine*, 97(48). <https://doi.org/10.1097/md.00000000000013158>
- Abedalwafa, M., Wang, F. J., Wang, L. & Li, C. J. (2013). Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. *Reviews on Advanced Materials Science*, 34(2), 123-140.
- Ahamed, M., Akhtar, M. J., Khan, M. A. M., Alrokayan, S. A. & Alhadlaq, H. A. (2019). Oxidative stress mediated cytotoxicity and apoptosis response of bismuth oxide (Bi₂O₃) nanoparticles in human breast cancer (MCF-7) cells. *Chemosphere*, 216, 823-831. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.214>
- Alamer, A., Ali, D., Alarifi, S., Alkahtane, A., Al-Zharani, M., Abdel-Daim, M. M., ... Alkahtani, S. (2020). Bismuth oxide nanoparticles induce oxidative stress and apoptosis in human breast cancer cells. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10913-x>
- Aldana, A. A. & Abraham, G. A. (2017). Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(2), 441-453. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.044>
- Alharbi, S. A., Mashat, B. H., Al-Harbi, N. A., Wainwright, M., Aloufi, A. S. & Alnaimat, S. (2012). Bismuth-inhibitory effects on bacteria and stimulation of fungal growth in vitro. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 147-150. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.01.006>
- Alshams, M., Othman, M., Haddad, I. & Abou Sulaiman, A. (2019). Evaluating the Effects of Non-surgical Periodontal Treatment on Masticatory Function in Patients with Aggressive Periodontitis: A Preliminary Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 13(9), ZC14-ZC16. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2019/41356.13135>
- Andre, V., Hardeman, A., Halasz, I., Stein, R. S., Jackson, G. J., Reid, D. G., ... Friscic, T. (2011). Mechanochemistry of the Metallo-drug Bismuth Subsalicylate from Bi₂O₃ and Structure of Bismuth Salicylate without Auxiliary Organic Ligands. *Angewandte Chemie-International Edition*, 50(34), 7858-7861. <https://doi.org/10.1002/anie.201103171>
- Angamma, C. J. & Jayaram, S. H. (2011). Analysis of the Effects of Solution Conductivity on Electrospinning Process and Fiber Morphology. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 47(3), 1109-1117. <https://doi.org/10.1109/tia.2011.2127431>
- Ausenda, F., Rasperini, G., Acunzo, R., Gorbunkova, A. & Pagni, G. (2019). New Perspectives in the Use of Biomaterials for Periodontal Regeneration. *Materials*, 12(13). <https://doi.org/10.3390/ma12132197>
- Badireddy, A. R., Chellam, S., Yanina, S., Gassman, P. & Rosso, K. M. (2008). Bismuth dimercaptopropanol (BisBAL) inhibits the expression of extracellular polysaccharides and proteins by *Brevundimonas diminuta*: Implications for membrane microfiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(3), 634-643. <https://doi.org/10.1002/bit.21615>
- Barnes, C. P., Sell, S. A., Boland, E. D., Simpson, D. G. & Bowlin, G. L. (2007). Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(14), 1413-1433. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.022>
- Bartold, P. M., Gronthos, S., Ivanovski, S., Fisher, A. & Huttmacher, D. W. (2016). Tissue engineered periodontal products. *Journal of Periodontal Research*, 51(1), 1-15. <https://doi.org/10.1111/jre.12275>
- Barton, L. L., Granat, A. S., Lee, S., Xu, H. F., Ritz, N. L., Hider, R. & Lin, H. C. (2019). Bismuth(III) interactions with *Desulfovibrio desulfuricans*: inhibition of cell energetics and nanocrystal formation of Bi₂S₃ and Bi₂O₃. *Biomaterials*, 32(5), 803-811. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00213-4>

- Beil, W., Birkholz, C., Wagner, S. & Sewing, K. F. (1995). Bismuth Subcitrate And Omeprazole Inhibit *Helicobacter-pylori* F1-ATPASE. *Pharmacology*, 50(5), 333-337. <https://doi.org/10.1159/000139299>
- Berkowitz, J. M. (1990). The Efficacy Of Bismuth Subsalicylate In Relieving Gastrointestinal Discomfort Following Excessive Alcohol And Food-Intake. *Journal of International Medical Research*, 18(5), 351-357. <https://doi.org/10.1177/030006059001800502>
- Bierer, D. W. (1990). Bismuth Subsalicylate - History, Chemistry, And Safety. *Reviews of Infectious Diseases*, 12, S3-S8.
- Bland, M. V., Ismail, S., Heinemann, J. A. & Keenan, J. I. (2004). The action of bismuth against *Helicobacter pylori* mimics but is not caused by intracellular iron deprivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 1983-1988. <https://doi.org/10.1128/aac.48.6.1983-1988.2004>
- Bosshardt, D. D. & Lang, N. P. (2005). The junctional epithelium: from health to disease. *Journal of Dental Research*, 84(1), 9-20. <https://doi.org/10.1177/154405910508400102>
- Bosshardt, D. D., Stadlinger, B. & Terheyden, H. (2015). Cell-to-cell communication - periodontal regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 26(3), 229-239. <https://doi.org/10.1111/clr.12543>
- Bottino, M. C., Thomas, V., Schmidt, G., Vohra, Y. K., Chu, T. M. G., Kowolik, M. J. & Janowski, G. M. (2012). Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration-A materials perspective. *Dental Materials*, 28(7), 703-721. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.022>
- Burford, N., Eelman, M. D. & Cameron, T. S. (2002). Comprehensive characterisation of bismuth thiosalicylate complexes: models for bismuth subsalicylate. *Chemical Communications*, (13), 1402-1403. <https://doi.org/10.1039/b203110h>
- Burford, N., Eelman, M. D., Mahony, D. E. & Morash, M. (2003). Definitive identification of cysteine and glutathione complexes of bismuth by mass spectrometry: assessing the biochemical fate of bismuth pharmaceutical agents. *Chemical Communications*, (1), 146-147. <https://doi.org/10.1039/b210570e>
- Burrows, A. D., Jurcic, M., Mahon, M. F., Pierrat, S., Roffe, G. W., Windle, H. J. & Spencer, J. (2015). Bismuth coordination networks containing deferiprone: synthesis, characterisation, stability and antibacterial activity. *Dalton Transactions*, 44(31), 13814-13817. <https://doi.org/10.1039/c5dt02458g>
- Caballe-Serrano, J., Munar-Frau, A., Delgado, L., Perez, R. & Hernandez-Alfaro, F. (2019). Physicochemical characterization of barrier membranes for bone regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 97, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.04.053>
- Castellano, M., Alloisio, M., Darawish, R., Doderio, A. & Vicini, S. (2019). Electrspun composite mats of alginate with embedded silver nanoparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 137, 767-778. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10973-018-7979-z>
- Castillo, A. B., Blundo, J. T., Chen, J. C., Lee, K. L., Yereddi, N. R., Jang, E., Kumar, S., Tang, W. J., Zarrin, S., Kim, J.B., Jacobs, C.R. Focal adhesion kinase plays a role in osteoblast mechanotransduction in vitro but does not affect load-induced bone formation *in vivo*. *PLoS One*. 2012;7(9):e43291. <https://doi:10.1371/journal.pone.0043291>
- Chapple, I. L. C., Van der Weijden, F., Doerfer, C., Herrera, D., Shapira, L., Polak, D., ... Graziani, F. (2015). Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42, S71-S76. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12366>
- Cho, M. I. & Garant, P. R. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000*, 24, 9-27. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240102.x>
- Coic, M., Placet, V., Jacquet, E. & Meyer, C. (2010). Mechanical properties of collagen membranes used in guided bone regeneration: A comparative study of three models. *Revue De Stomatologie De Chirurgie*

- Cornick, N. A., Silva, M. & Gorbach, S. L. (1990). In Vitro Antibacterial Activity of Bismuth Subsalicylate. *REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES*, VOL. 12, pp. S9-S10.
- Danesh-Meyer, M. J. & Wikesjo, U. M. E. (2001). Gingival recession defects and guided tissue regeneration: a review. *Journal of Periodontal Research*, 36(6), 341-354. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2001.360601.x>
- DeSanctis, M., Zucchelli, G. & Clauser, C. (1996). Bacterial colonization of barrier material and periodontal regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(11), 1039-1046.
- Domalaon, R., Idowu, T., Zhanel, G. G. & Schweizer, F. (2018). Antibiotic Hybrids: the Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens? *Clinical Microbiology Reviews*, 31(2), 45. <https://doi.org/10.1128/cmr.00077-17>
- Domenico, P., Baldassarri, L., Schoch, P. E., Kaehler, K., Sasatsu, M. & Cunha, B. A. (2001). Activities of bismuth thiols against *staphylococci* and *staphylococcal* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1417-1421. <https://doi.org/10.1128/aac.45.5.1417-1421.2001>
- Domenico, P., Tomas, J. M., Merino, S., Rubires, X. & Cunha, B. A. (1999). Surface antigen exposure by bismuth dimercaprol suppression of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *Infection and Immunity*, 67(2), 664-669. <https://doi.org/10.1128/iai.67.2.664-669.1999>
- Falcao, A. & Bullon, P. (2019). A review of the influence of periodontal treatment in systemic diseases. *Periodontology 2000*, 79(1), 117-128. <https://doi.org/10.1111/prd.12249>
- Feng, B., Tu, H. B., Yuan, H. H., Peng, H. J. & Zhang, Y. Z. (2012). Acetic-Acid-Mediated Miscibility toward Electrospinning Homogeneous Composite Nanofibers of GT/PCL. *Biomacromolecules*, 13(12), 3917-3925. <https://doi.org/10.1021/bm3009389>
- Florjanski, W., Orzeszek, S., Olchow, A., Grychowska, N., Wieckiewicz, W., Malysa, A., ... Wieckiewicz, M. (2019). Modifications of Polymeric Membranes Used in Guided Tissue and Bone Regeneration. *Polymers*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/polym11050782>
- Folsom, J. P., Baker, B. & Stewart, P. S. (2011). In vitro efficacy of bismuth thiols against biofilms formed by bacteria isolated from human chronic wounds. *Journal of Applied Microbiology*, 111(4), 989-996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05110.x>
- Gaspar-Pintilie, A., Stanciuc, A. M. & Craciunescu, O. (2019). Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 854-865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.155>
- Gautam, S., Dinda, A. K. & Mishra, N. C. (2013). Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 33(3), 1228-1235. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.015>
- Gill, G. K. & Gwathmey, F. W. (2018). Revision PCL Reconstruction Review/Update. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 11(2), 320-324. <https://doi.org/10.1007/s12178-018-9493-0>
- Gilster, J., Bacon, K., Marlink, K., Sheppard, B., Deveney, C. & Rutten, M. (2004). Bismuth subsalicylate increases intracellular Ca²⁺, MAP-kinase activity, and cell proliferation in normal human gastric mucous epithelial cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(3), 370-378. <https://doi.org/10.1023/b:ddas.0000020488.55854.99>
- Gisbert, J. P. (2011). HELICOBACTER PYLORI ERADICATION A new, single-capsule bismuth-containing quadruple therapy. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(6), 307-309. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.84>

- Gitsu, D. V., Muntyanu, F. M. & Fedorko, A. S. (1970). Some Features Of Transverse Thermomagnetic Effect In Bismuth. *Physica Status Solidi*, 42(1), 173-&. <https://doi.org/10.1002/pssb.19700420118>
- Gomez, R. S., Dutra, W. O. & Moreira, P. R. (2009). Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflammation Research*, 58(10), 625-629. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0041-7>
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E. & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gorgieva, S. & Kokol, V. (2011). Collagen-vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, 17-52.
- Gulabivala, K. & Ng, Y.-L. (2014). *Endodontics*.
- Hampel, C. A. & Gerards, G. A. (1973). *The Encyclopedia of chemistry*.
- He, M., Jiang, H. Y., Wang, R., Xie, Y. & Zhao, C. S. (2017). Fabrication of metrpnidazole loaded poly (epsilon-caprolactone)/zein core/shell nanofiber membranes via coaxial electrospinning for guided tissue regeneration. *Journal of Colloid and Interface Science*, 490, 270-278. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.062>
- Heitz-Mayfield, L. J. A. & Lang, N. P. (2013). Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontology 2000*, 62, 218-231. <https://doi.org/10.1111/prd.12008>
- Hellmig, S., Stuber, E., Katsoulis, S. & Folsch, U. R. (2002). Bismuth subsalicylate in the cecum. *Gastrointestinal Endoscopy*, 56(4), 565-565. <https://doi.org/10.1067/mge.2002.127153>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*. <https://asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
- Ioannou, P. V. (2014). Evaluating the non-hygroscopic bismuth subsalicylate, bismuth oxychloride and bismuth subnitrate monohydrate as starting reagents for the preparation of bismuth(III) thiolates. *Main Group Chemistry*, 13(4), 329-341. <https://doi.org/10.3233/mgc-140145>
- Iram, S., Imran, M., Kanwal, F., Iqbal, Z., Deeba, F. & Iqbal, Q. J. (2019). Bismuth(III) based Metal Organic Frameworks: Luminescence, Gas Adsorption, and Antibacterial Studies. *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie*, 645(1), 50-56. <https://doi.org/10.1002/zaac.201800383>
- Jiang, T., Carbone, E. J., Lo, K. W. H. & Laurencin, C. T. (2015). Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 46, 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001>
- Kao, D. W. K. & Fiorellini, J. P. (2012). Regenerative Periodontal Therapy. I D. F. Kinane & A. Mombelli (Red.), *Periodontal Disease* (bd. 15, s. 149-159). Basel: Karger.
- Keogan, D. M. & Griffith, D. M. (2014). Current and Potential Applications of Bismuth-Based Drugs. *Molecules*, 19(9), 15258-15297. <https://doi.org/10.3390/molecules190915258>
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G. & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- Kushkevych, I., Cejnar, J., Tremel, J., Dordevic, D., Kollar, P. & Vitezova, M. (2020). Recent Advances in Metabolic Pathways of Sulfate Reduction in Intestinal Bacteria. *Cells*, 9(3), 16. <https://doi.org/10.3390/cells9030698>
- Lee, S. B., Lee, D. Y., Lee, Y. K., Kim, K. N., Choi, S. H. & Kim, K. M. (2008). Surface modification of a guided tissue regeneration membrane using tetracycline-containing biodegradable polymers. *Surface and Interface Analysis*, 40(3-4), 192-197. <https://doi.org/10.1002/sia.2761>

- Leun, A. K. C., Leung, A. A. M., Wong, A. H. C. & Hon, K. L. (2019). Travelers' Diarrhea: A Clinical Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 13(1), 38-48. <https://doi.org/10.2174/1872213x13666190514105054>
- Li, G., Zhang, T., Li, M., Fu, N., Fu, Y., Ba, K., ... Lin, Y. F. (2014). Electrospun Fibers for Dental and Craniofacial Applications. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 9(3), 187-195. <https://doi.org/10.2174/1574888x09666140213151717>
- Lin, D. J., Tsai, M. T., Shieh, T. M., Huang, H. L., Hsu, J. T., Ko, Y. C. & Fuh, L. J. (2013). In vitro antibacterial activity and cytocompatibility of bismuth doped micro-arc oxidized titanium. *Journal of Biomaterials Applications*, 27(5), 553-563. <https://doi.org/10.1177/0885328211414942>
- Lindhe, J. & Lang, N. P. (2017). *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*.
- Ling, L. J., Hung, S. L., Lee, C. F., Chen, Y. T. & Wu, K. M. (2003). The influence of membrane exposure on the outcomes of guided tissue regeneration: clinical and microbiological aspects. *Journal of Periodontal Research*, 38(1), 57-63. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2003.01641.x>
- Liu, Y. M., Zhuang, J., Zhang, X. H., Yue, C., Zhu, N., Yang, L. C., ... Zhang, L. W. (2017). Autophagy associated cytotoxicity and cellular uptake mechanisms of bismuth nanoparticles in human kidney cells. *Toxicology Letters*, 275, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.04.014>
- Luo, Y., Wang, C. M., Qiao, Y., Hossain, M., Ma, L. Y. & Su, M. (2012). In vitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 23(10), 2563-2573. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4716-1>
- Luqman, A., Blair, V. L., Brammananth, R., Crellin, P. K., Coppel, R. L. & Andrews, P. C. (2014). Homo- and Heteroleptic Bismuth(III/V) Thiolates from N-Heterocyclic Thiones: Synthesis, Structure and Anti-Microbial Activity. *Chemistry-a European Journal*, 20(44), 14362-14377. <https://doi.org/10.1002/chem.201404109>
- Luqman, A., Blair, V. L., Brammananth, R., Crellin, P. K., Coppel, R. L., Kedzierski, L. & Andrews, P. C. (2015). Homoleptic and Heteroleptic Bismuth(III) Thiazole-Thiolates and the Influence of Ring Substitution on Their Antibacterial and Antileishmanial Activity. *European Journal of Inorganic Chemistry*, (4), 725-733. <https://doi.org/10.1002/ejic.201402958>
- MacDonald, E. S., Nowzari, H., Contreras, A., Flynn, J., Morrison, J. & Slots, J. (1998). Clinical and microbiological evaluation of a bioabsorbable and a nonresorbable barrier membrane in the treatment of periodontal intraosseous lesions. *Journal of Periodontology*, 69(4), 445-453. <https://doi.org/10.1902/jop.1998.69.4.445>
- Machtei, E. E. (2001). The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: A meta-analysis. *Journal of Periodontology*, 72(4), 512-516. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.4.512>
- Mahony, D. E., Lim-Morrison, S., Bryden, L., Faulkner, G., Hoffman, P. S., Agocs, L., ... Maguire, H. (1999). Antimicrobial activities of synthetic bismuth compounds against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3), 582-588. <https://doi.org/10.1128/aac.43.3.582>
- Mahony, D. E., Woods, A., Eelman, M. D., Burford, N. & van Zanten, S. (2005). Interaction of bismuth subsalicylate with fruit juices, ascorbic acid, and thiol-containing substrates to produce soluble bismuth products active against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 431-433. <https://doi.org/10.1128/aac.49.1.431-433.2005>
- Manhart, M. D. (1990). In vitro Antimicrobial Activity of Bismuth Subsalsicylate and Other Bismuth Salts. *Reviews of Infectious Diseases*, Vol. 12, S11-S15.
- Marzano, I. M., Franco, M. S., Silva, P. P., Augusti, R., Santos, G. C., Fernandes, N. G., ... Pereira-Maia, E. C. (2013). Crystal Structure, Antibacterial and Cytotoxic Activities of a New Complex of Bismuth(III) with Sulfapyridine. *Molecules*, 18(2), 1464-1476. <https://doi.org/10.3390/molecules18021464>

- McCulloch, C. A. (1999). Tony Melcher's contributions to the regeneration of the periodontium. *Journal of Dental Research*, 78(7), 1292-1297. <https://doi.org/10.1177/00220345990780070201>
- Melcher, A. H. (1976). Repair Potential Of Periodontal Tissues. *Journal of Periodontology*, 47(5), 256-260. <https://doi.org/10.1902/jop.1976.47.5.256>
- Melcher, A. H., Feng, J. & Chan, J. (1976). Resorption Of Periodontal-Ligament In Adult Periodontium *In Vitro*. *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association*, 12(4), 337-337.
- Meyle, J. & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 69(1), 7-17. <https://doi.org/10.1111/prd.12104>
- Milella, E., Ramires, P. A., Brescia, E., La Sala, G., Di Paola, L. & Bruno, V. (2001). Physicochemical, mechanical, and biological properties of commercial membranes for GTR. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(4), 427-435. <https://doi.org/10.1002/jbm.1038>
- Mochane, M. J., Motsoeneng, T. S., Sadiku, E. R., Mokhena, T. C. & Sefadi, J. S. (2019). Morphology and Properties of Electrospun PCL and Its Composites for Medical Applications: A Mini Review. *Applied Sciences-Basel*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/app9112205>
- Nanci, A. & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40, 11-28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x>
- Needleman, I., Tucker, R., Giedrys-Leeper, E. & Worthington, H. (2002). A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal infrabony defects. *Journal of Periodontal Research*, 37(5), 380-388. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2002.01369.x>
- Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P. & Carranza, F. (2014). *Carranza's Clinical Periodontology* (12 th. utg.).
- Nivens, D. E., Ohman, D. E., Williams, J. & Franklin, M. J. (2001). Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *Journal of Bacteriology*, 183(3), 1047-1057. <https://doi.org/10.1128/jb.183.3.1047-1057.2001>
- Nordberg, G., Fowler, B. & Nordberg, M. (2014). *Handbook on the Toxicology of Metals*.
- Olubayode, E.-P., Mike, J. & Artemis, S. (2012). Tailoring Crystallinity of Electrospun Plla Fibres by Control of Electrospinning Parameters. *Polymers*, 4, 1331-1348.
- Ortolani, E., Quadrini, F., Bellisario, D., Santo, L., Polimeni, A. & Santarsiero, A. (2015). Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita*, 51(3), 229-235. <https://doi.org/10.4415/ann 15 03 11>
- Otálora Barrero, D. M. (2014). Estudio de propiedades eléctricas y ópticas de recubrimientos nanoestructurados de bismuto y óxido de bismuto. I(Vol. Maestría): Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.
- Papapanou, P. N. & Susin, C. (2017). Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? *Periodontology 2000*, 75(1), 45-51. <https://doi.org/10.1111/prd.12200>
- Pasha, A. M. K., Hosseini, M., Fakhri, A., Gupta, V. K. & Agarwal, S. (2019). Investigation of photocatalytic process for iron disulfide-bismuth oxide nanocomposites by using response surface methodology: Structural and antibacterial properties. *Journal of Molecular Liquids*, 289. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.110950>
- Persano, L., Camposeo, A. & Pisignano, D. (2017). Advancing the Science and Technology of Electrospinning and Functional Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(8). <https://doi.org/10.1002/mame.201700237>
- Petersen, P. E. & Baehni, P. C. (2012). Periodontal health and global public health. *Periodontology 2000*, 60, 7-14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00452.x>

- Petersen, P. E. & Ogawa, H. (2012). The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000*, 60, 15-39. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x>
- Pitz, A. M., Park, G. W., Lee, D., Boissy, Y. L. & Vinje, J. (2015). Antimicrobial activity of bismuth subsalicylate on *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* O157:H7, norovirus, and other common enteric pathogens. *Gut Microbes*, 6(2), 93-100. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1008336>
- Prado-Prone, G., Silva-Bermudez, P., Bazzar, M., Focarete, M. L., Rodil, S. E., Vidal-Gutierrez, X., ... Almaguer-Flores, A. (2020). Antibacterial composite membranes of polycaprolactone/gelatin loaded with zinc oxide nanoparticles for guided tissue regeneration. *Biomedical Materials*, 15(3), 15. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab70ef>
- Prasad, S. S., Ratha, I., Adarsh, T., Anand, A., Sinha, P. K., Diwan, P., ... Biswas, K. (2018). In vitro bioactivity and antibacterial properties of bismuth oxide modified bioactive glasses. *Journal of Materials Research*, 33(2), 178-190. <https://doi.org/10.1557/jmr.2017.442>
- Purushothaman, A. E., Thakur, K. & Kandasubramanian, B. (2020). Development of highly porous, Electrostatic force assisted nanofiber fabrication for biological applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69(8), 477-504. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1581197>
- Raina, D. B., Qayoom, I., Larsson, D., Zheng, M. H., Kumar, A., Isaksson, H., ... Tagil, M. (2019). Guided tissue engineering for healing of cancellous and cortical bone using a combination of biomaterial based scaffolding and local bone active molecule delivery. *Biomaterials*, 188, 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.004>
- Ramírez Hernández, A., Crisanto Contreras, O., Conde Acevedo, J. & Navarro Moreno, L. G. (2013). Poly(ϵ -caprolactone) Degradation Under Acidic and Alkaline Conditions. *American Journal of Polymer Science*, 3(2163-1344), 70-75. <https://doi.org/doi:10.5923/j.ajps.20130304.02>
- Rasperini, G., Acunzo, R., Barnett, A. & Pagni, G. (2013). The Soft Tissue Wall Technique for the Regenerative Treatment of Non-contained Infrabony Defects: A Case Series. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 33(3), E79-E87. <https://doi.org/10.11607/prd.1628>
- Rodriguez-Tobias, H., Morales, G. & Grande, D. (2019). Comprehensive review on electrospinning techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 101, 306-322. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.099>
- Salvador, J. A. R., Figueiredo, S. A. C., Pinto, R. M. A. & Silvestre, S. M. (2012). Bismuth compounds in medicinal chemistry. *Future Medicinal Chemistry*, 4(11), 1495-1523. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.95>
- Schindler, R., Heemann, U., Haug, U., Stoelck, B., Karatas, A., Pohle, C., ... Hollenbeck, M. (2010). Bismuth coating of non-tunneled haemodialysis catheters reduces bacterial colonization: a randomized controlled trial. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(8), 2651-2656. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq052>
- Sculean, A., Stavropoulos, A. & Bosshardt, D. D. (2019). Self-regenerative capacity of intra-oral bone defects. *Journal of Clinical Periodontology*, 46, 70-81. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13075>
- Shakibaie, M., Amiri-Moghadam, P., Ghazanfari, M., Adeli-Sardou, M., Jafari, M. & Forootanfar, H. (2018). Cytotoxic and antioxidant activity of the biogenic bismuth nanoparticles produced by *Delftia* sp SFG. *Materials Research Bulletin*, 104, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2018.04.001>
- Shi, R., Ye, J. J., Li, W. Y., Zhang, J. S., Li, J., Wu, C. G., ... Zhang, L. Q. (2019). Infection-responsive electrospun nanofiber mat for antibacterial guided tissue regeneration membrane. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 100, 523-534. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.039>

- Sims, N. A. & Vrahnas, C. (2014). Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.015>
- Sischo, L. & Broder, H. L. (2011). Oral Health-related Quality of Life: What, Why, How, and Future Implications. *Journal of Dental Research*, 90(11), 1264-1270. <https://doi.org/10.1177/0022034511399918>
- Slots, J. (2017). Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontology 2000*, 75(1), 7-23. <https://doi.org/10.1111/prd.12221>
- Sox, T. E. & Olson, C. A. (1989). Binding And Killing Of Bacteria By Bismuth Subsalicylate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(12), 2075-2082. <https://doi.org/10.1128/aac.33.12.2075>
- Stammitti-Scarpone, A. & Acosta, E. (2019). Solid-liquid-liquid wettability and its prediction with surface free energy models. *Advances in Colloid and Interface Science*, 264, 28-46. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.10.003>
- Staples, R., Ivanovski, S. & Vaquette, C. (2019). Scaffolds for engineering tooth-ligament interfaces. *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds, Vol 1*, 595-613. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102563-5.00028-9>
- Stein, K., Farmer, J., Singhal, S., Marra, F., Sutherland, S. & Quinonez, C. (2018). The use and misuse of antibiotics in dentistry A scoping review. *Journal of the American Dental Association*, 149(10), 869-+. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.05.034>
- Susin, C. & Wikesjo, U. M. E. (2013). Regenerative periodontal therapy: 30years of lessons learned and unlearned. *Periodontology 2000*, 62, 232-242. <https://doi.org/10.1111/prd.12003>
- Suresh S, Becker A, Glasmacher B. (2020). Impact of Apparatus Orientation and Gravity in Electrospinning-A Review of Empirical Evidence. *Polymers*, 12(11):2448. <https://doi.org/10.3390/polym12112448>
- Tan, G. Z. & Zhou, Y. G. Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1636248>
- Tanaka, S., Guth, P. H., Carryl, O. R. & Kaunitz, J. D. (1997). Cytoprotective effect of bismuth subsalicylate in indomethacin-treated rats is associated with enhanced mucus bismuth concentration. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 11(3), 605-612. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1997.00170.x>
- Thomas, F., Bialek, B. & Reinhard, H. (2012). Medical use of bismuth: The two sides of the coin. *Journal of Clinical Toxicology*, 03. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.S3-004>
- Timakova, E. V., Udalova, T. A., Yukhin, Y. M. & Ieee. (2008). Synthesis of Bismuth (III) Salicylates in the Precipitation Reactions From Solutions. *Ifostr 2008: Proceeding of the Third International Forum on Strategic Technologies*, 127-130.
- Tsai, H. H. & Rhodes, J. M. (1990). Bismuth Subsalicylate, Bismuth Subcitrate And Dextran Sulfates Inhibit Fecal Mucin Sulfatase. *Clinical Science*, 79(4), P17-P17.
- Vaquette, C., Saifzadeh, S., Farag, A., Hutmacher, D. W. & Ivanovski, S. (2019). Periodontal Tissue Engineering with a Multiphasic Construct and Cell Sheets. *Journal of Dental Research*, 98(6), 673-681. <https://doi.org/10.1177/0022034519837967>
- Varposhti, M., Ali, A. A. & Mohammadi, P. (2014). Synergistic Effects of Bismuth Thiols and Various Antibiotics Against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(3). <https://doi.org/10.5812/jjm.9142>
- Vega-Jimenez, A. L., Almaguer-Flores, A., Flores-Castaneda, M., Camps, E., Uribe-Ramirez, M., Aztatzi-Aguilar, O. G. & De Vizcaya-Ruiz, A. (2017). Bismuth subsalicylate nanoparticles with anaerobic antibacterial activity for dental applications. *Nanotechnology*, 28(43), 12. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa8838>

- Veloira, W. G., Domenico, P., LiPuma, J. J., Davis, J. M., Gurzenda, E. & Kazzaz, J. A. (2003). In vitro activity and synergy of bismuth thiols and tobramycin against *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(6), 915-919. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg471>
- von Hehn, C., Tornatore, C., Li, J., Ma, T. S., Walsh, J. & Zambrano, J. (2014). Effect of bismuth subsalicylate on gastrointestinal events associated with delayed-release dimethyl fumarate: a double-blind, placebo-controlled study. *Multiple Sclerosis Journal*, 20, 90-90.
- Wang, H. L., Yuan, K., Burgett, F., Shyr, Y. & Syed, S. (1994). Adherence Of Oral Microorganisms To Guided Tissue Membrane - An *In-Vitro* Study. *Journal of Periodontology*, 65(3), 211-218. <https://doi.org/10.1902/jop.1994.65.3.211>
- Wang, J. L., Wang, L. N., Zhou, Z. Y., Lai, H. J., Xu, P., Liao, L. & Wei, J. C. (2016). Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/polym8040115>
- Wang, R. M., Lai, T. P., Gao, P., Zhang, H. M., Ho, P. L., Woo, P. C. Y., ... Sun, H. Z. (2018). Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo-beta-lactamase inhibitors. *Nature Communications*, 9, 12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02828-6>
- Ward, R. L., Sander, D. S. & Knowlton, D. R. (1985). *In Vitro* Activities Of Bismuth Salts Against Rotaviruses And Other Enteric Viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(3), 306-308. <https://doi.org/10.1128/aac.27.3.306>
- Wu, J. L. & Hong, Y. (2016). Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration. *Bioactive Materials*, 1(1), 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2016.07.001>
- Xiong, J. M., Gronthos, S. & Bartold, P. M. (2013). Role of the epithelial cell rests of Malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. *Periodontology 2000*, 63(1), 217-233. <https://doi.org/10.1111/prd.12023>
- Xue, J. J., He, M., Liang, Y. Z., Crawford, A., Coates, P., Chen, D. F., ... Zhang, L. Q. (2014). Fabrication and evaluation of electrospun PCL-gelatin micro-/nanofiber membranes for anti-infective GTR implants. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(39), 6867-6877. <https://doi.org/10.1039/c4tb00737a>
- Xue, J. J., He, M., Liu, H., Niu, Y. Z., Crawford, A., Coates, P. D., ... Zhang, L. Q. (2014). Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes. *Biomaterials*, 35(34), 9395-9405. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.060>
- Yang, N. & Sun, H. (2007). Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(17-20), 2354-2366. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.03.003>
- Zainudin, N. H. M., Ab Razak, K., Abidin, S. Z., Abdullah, R. & Rahman, W. N. (2020). Influence of bismuth oxide nanoparticles on bystander effects in MCF-7 and hFOB 1.19 cells under 10 MV photon beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 177. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109143>
- Zappa, U. (1995). HISTOLOGY OF THE PERIODONTAL LESION - IMPLICATIONS FOR DIAGNOSIS. *Periodontology 2000*, 7, 22-38. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1995.tb00034.x>
- Zhuang, Y., Lin, K. L. & Yu, H. B. (2019). Advance of Nano-Composite Electrospun Fibers in Periodontal Regeneration. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00495>

XI. ARTICULOS DERIVADOS DEL PROYECTO

PAPER

Antibacterial composite membranes of polycaprolactone/gelatin loaded with zinc oxide nanoparticles for guided tissue regeneration

To cite this article: Gina Prado-Prone *et al* 2020 *Biomed. Mater.* **15** 035006

View the [article online](#) for updates and enhancements.

Recent citations

- [Antibacterial Electrospun Polycaprolactone Membranes Coated with Polysaccharides and Silver Nanoparticles for Guided Bone and Tissue Regeneration](#)
Davide Porrelli *et al*
- [MgO Nanoparticles-Incorporated PCL/Gelatin-Derived Coaxial Electrospinning Nanocellulose Membranes for Periodontal Tissue Regeneration](#)
Wenzao Peng *et al*
- [Tailoring Scaffolds for Orthopedic Application With Anti-Microbial Properties: Current Scenario and Future Prospects](#). A. Preethi and Jayesh R. Bellare





Biomedical Materials



PAPER

Antibacterial composite membranes of polycaprolactone/gelatin loaded with zinc oxide nanoparticles for guided tissue regeneration

RECEIVED
15 November 2019REVISED
13 January 2020ACCEPTED FOR PUBLICATION
28 January 2020PUBLISHED
4 March 2020

Gina Prado-Prone¹ , Phaedra Silva-Bermudez² , Masoomah Bazzar^{3,4} , Maria Letizia Focarete^{4,5}, Sandra E Rodil⁶, Ximena Vidal-Gutiérrez¹, Jorge A García-Macedo⁷, Victor I García-Pérez¹, Cristina Velasquillo⁸ and Argelia Almaguer-Flores^{1,9} 

¹ Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510, CDMX, México

² Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa; Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra; Av. México Xochimilco No. 289 Col. Arenal de Guadalupe C.P. 14389, Ciudad de México, México

³ School of Chemistry, University of East Anglia, Norwich, United Kingdom

⁴ Department of Chemistry 'G. Ciamician' and National Consortium of Materials Science and Technology (INSTM, Bologna RU), Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, 40126 Bologna, Italy

⁵ Health Sciences and Technologies - Interdepartmental Center for Industrial Research (HST-ICIR), Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, 40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy

⁶ Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México; Ciudad Universitaria No. 3000, C.P. 04360, Ciudad de México, México

⁷ Departamento de Estado Sólido, Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México; Ciudad Universitaria No. 3000, C.P. 04360, Ciudad de México, México

⁸ Laboratorio de Biotecnología, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra; Av. México Xochimilco No. 289 Col. Arenal de Guadalupe C.P. 14389, Ciudad de México, México

⁹ Author to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: gpradoprone@gmail.com, phaedrasilva@yahoo.com, m.bazzar@uea.ac.uk, marialetizia.focarete@unibo.it, srodil@unam.mx, ximena.v.gtz@gmail.com, gamaj@fisica.unam.mx, victorirahuen@comunidad.unam.mx, m.velasquillo@inr.gob.mx and aalmaguer@comunidad.unam.mx

Keywords: polycaprolactone, zinc oxide nanoparticles, gelatin, electrospinning, antibacterial properties, biocompatibility, periodontal membranes

Supplementary material for this article is available [online](#)

Abstract

The bacterial colonization of absorbable membranes used for guided tissue regeneration (GTR), as well as their rapid degradation that can cause their rupture, are considered the major reasons for clinical failure. To address this, composite membranes of polycaprolactone (PCL) and gelatin (Gel) loaded with zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs; 1, 3 and 6 wt% relative to PCL content) were fabricated by electrospinning. To fabricate homogeneous fibrillar membranes, acetic acid was used as a sole common solvent to enhance the miscibility of PCL and Gel in the electrospinning solutions. The effects of ZnO-NPs in the physico-chemical, mechanical and *in vitro* biological properties of composite membranes were studied. The composite membranes showed adequate mechanical properties to offer a satisfactory clinical manipulation and an excellent conformability to the defect site while their degradation rate seemed to be appropriate to allow successful regeneration of periodontal defects. The presence of ZnO-NPs in the composite membranes significantly decreased the planktonic and the biofilm growth of the *Staphylococcus aureus* over time. Finally, the viability of human osteoblasts and human gingival fibroblasts exposed to the composite membranes with 1 and 3 wt% of ZnO-NPs indicated that those membranes are not expected to negatively influence the ability of periodontal cells to repopulate the defect site during GTR treatments. The results here obtained suggest that composite membranes of PCL and Gel loaded with ZnO-NPs have the potential to be used as structurally stable GTR membranes with local antibacterial properties intended for enhancing clinical treatments.

1. Introduction

The guided tissue regeneration (GTR) technique is the most frequently used procedure to regenerate periodontal tissue defects caused by periodontal disease or trauma [1, 2]. This surgical technique employs barrier membranes to prevent epithelial tissue growth at the bone defect site and allow periodontal ligament and alveolar bone cells to repopulate the bone defect, facilitating its regeneration [1, 2]. GTR membranes need to be biocompatible, flexible to conform to the site defect, and preferably, biodegradable to eliminate the need for removal surgery. Membranes should present suitable degradation rates matching the tissue formation to achieve the desired restoration. Currently, GTR membranes based on biodegradable polymers (mainly xenogenic collagen) are commercially available; nevertheless, those membranes present poor mechanical properties and high solubility in physiological conditions resulting in difficult clinical manipulation and early rupture at the tissue defect site during GTR treatment [3]. Another important challenge in GTR procedures is the infections generated by bacterial colonization at the membrane [4]. Post-operative infections and early membrane rupture are currently considered the main reasons for GTR failure in clinical applications [5, 6].

Composite membranes fabricated by electrospinning can combine the properties of their different components and the intrinsic morphology of electrospun materials to result in favorable biological, chemical and physical features for tissue engineering. The electrospinning technique uses electrostatic forces to produce polymeric-based fibrillar membranes with interconnected porosity and fiber diameters ranging from tens of nanometers to a few micrometers [7], mimicking the morphology of the extracellular matrix (ECM) and enhancing the viability, adhesion and proliferation of mammalian cells [7, 8].

Polycaprolactone (PCL) is a synthetic semi-crystalline polymer approved by the US Food and Drug Administration (FDA) [9]. It has excellent biocompatibility and mechanical stability; however, its hydrophobic nature and lack of biologically active functional groups limits its ability to promote cell adhesion, proliferation and migration [10]. On the other hand, gelatin (Gel) is a natural polymer derived from the partial hydrolysis of collagen, which is the main component of the ECM, including periodontal connective tissue ECM [11, 12]. It displays a good biological response since it has some of the functional groups present in collagen but produces lower immunogenicity and antigenicity than collagen [13–15]. Nonetheless, the dissolution and fast biodegradation of Gel in physiological conditions make it mechanically unstable and restrict its use in GTR membranes [10, 16, 17]. Blends of PCL and Gel can combine the intrinsic properties of both polymers resulting in materials with biologically favorable properties,

especially blends with 30 wt% Gel concentration or higher [15, 18, 19], and modulated biodegradation rates, overcoming the respective disadvantages of PCL and Gel alone [14, 18–21].

GTR membranes with local antibacterial properties are expected to reduce the risk of infections, allowing a bacteria-free environment for appropriate tissue regeneration [16]. Several polymeric membranes that can deliver antibiotics at the defect site have been investigated as an alternative to avoid infections during GTR procedures [22–24]. However, the use of antibiotics could increase the risk of developing antibiotic-resistant bacteria, which is considered a notable global problem [25]. Recently, the use of antibacterial nanoparticles (NPs) represents a promising strategy to face the increasing emergence of antibiotic-resistant bacteria [26]. Particularly, zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) are 'generally recognized as safe' by the FDA (21CFR182.8991) and have demonstrated antibacterial activity against a wide variety of bacteria, including antibiotic-resistant strains [26–30]. By using the electrospinning technique, NPs can be embedded into polymeric matrices, controlling the undesirable burst release of NPs into the organism and taking advantage of the inherent high surface-area-to-volume ratio of electrospun fibrillar membranes to maintain a high surface exposure of the NPs and consequently a high antibacterial activity [31]. A study conducted by Münchow et al reported the anti-bacterial efficacy of PCL-Gel polymeric electrospun membranes loaded with ZnO-NPs against two oral bacteria; their results showed a clear inhibition of bacterial growth using ZnO-NPs concentrations of 5, 15 and 30 wt% (relative to the total polymer weight) and a relatively good biocompatibility using human dental pulp stem cells [32]. However, although NPs with antibacterial properties are promising therapeutic agents, there are still concerns regarding the possible long-term side effects generated by an excessive release of NPs into human tissues [33]. To address this, we fabricated electrospun composite fibers of PCL and Gel loaded with ZnO-NPs (PCL-G-Zn membranes) at low concentrations (1, 3 and 6 wt%) using acetic acid as the sole solvent for preparing the electrospinning solution, aiming to develop biocompatible, biodegradable and mechanically stable membranes with local antibacterial properties and lower NPs concentrations. The degradation, water wettability, mechanical properties and thermal properties of PCL-G-Zn membranes were studied in terms of their micromorphology, atomic structure and elemental chemical composition. The ability of the PCL-G-Zn membranes to inhibit planktonic bacterial growth and bacterial biofilm formation against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was studied. The ability of the membranes to sustain periodontal cell viability was evaluated, exposing human osteoblasts (hFOB) and gingival fibroblast (hGF-1) to the released products from the membranes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PCL (Mn = 80,000 Da), ZnO-NPs, 3-(4,5-dimethylthia-zol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2-propanol 99% (ISO), dimethyl sulfoxide (DMSO), menadione and hemin were purchased from Sigma-Aldrich. Glacial acetic acid (AcAc; 99.5%) and gelatin type B derived from porcine skin (Gel) were purchased from J. T. Baker. Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/strepto-mycin 0.25%, trypsin-EDTA 0.25% and phosphate-buffered saline (PBS; pH = 7.4) were acquired from Gibco, and Trypticase soy broth (TSB) was purchased from BD Bioxon. *S. aureus* (25923™), human osteoblasts (hFOB; CRL-11372™), gingival fibroblasts (hGF-1; CRL-2014™) and geneticin were obtained from ATCC®.

2.2. Fabrication of membranes

Blend solutions of PCL and Gel were prepared by dissolving PCL (19% w/v) into AcAc and incorporating the appropriate amount of Gel to produce two PCL-Gel solutions with a final PCL:Gel weight ratio of 70:30 or 55:45. Separately, adequate amounts of ZnO-NPs were weighed (1, 3 and 6 wt% relative to PCL content) and dispersed individually into PCL-Gel solutions to produce eight different PCL-Gel-ZnO solutions; that is, PCL:Gel (70:30) solutions with 0, 1, 3 and 6 wt% of ZnO-NPs, and PCL:Gel (55:45) solutions with 0, 1, 3 and 6 wt% of ZnO-NPs. A solution of only PCL in AcAc (19% w/v) was also prepared. All solutions were stirred at 300 rpm for 48 h at room temperature (RT). For electrospinning, the PCL-Gel and PCL-Gel-ZnO solutions were independently pumped at 1 ml h⁻¹, with a needle-to-collector distance of 14 cm and using a voltage of 14 kV. The PCL solution was pumped at the same solution feed rate but increasing the needle-to-collector distance and the voltage to 15 cm and 15 kV, respectively. Electrospinning was carried out using a horizontal instrument assembled in our laboratory where electrospun fibers (membranes) were collected on a static aluminum plate. After electrospinning, membranes were removed from the collector, double washed with EtOH (70%) and double-distilled water (dd H₂O), dried at RT and sterilized under ultraviolet (UV) light. Electrospun membranes were named according to their composition as described in table 1.

2.3. Physico-chemical and mechanical characterization of membranes

The micromorphology of the membranes was characterized by a scanning electron microscope (SEM; JEOL-7600); the fiber diameter distribution and surface pore size were estimated from SEM micrographs of carbon-coated membrane samples. The elemental chemical composition was determined by energy-dispersive x-ray spectrometry (EDS; Oxford X-Max

Table 1. Chemical composition of electrospun membranes.

Electrospun membrane	Chemical composition		
	PCL (wt%) ^a	Gel (wt%) ^a	ZnO-NPs (wt%) ^b
PCL	100	0	0
PCL-G30	70	30	0
PCL-G30-1Zn	70	30	1
PCL-G30-3Zn	70	30	3
PCL-G30-6Zn	70	30	6
PCL-G45	55	45	0
PCL-G45-1Zn	55	45	1
PCL-G45-3Zn	55	45	3
PCL-G45-6Zn	55	45	6

^a wt% according to total polymer content (PCL + Gel) in electro-spinning solution.

^b wt% according to total PCL content in electrospinning solution.

150) during SEM micrograph acquisition. Incorporation of ZnO-NPs into the PCL-G membranes was corroborated by bright-field transmission electron microscopy (TEM, Philips CM 100).

Water wettability of the membranes was determined by measuring their water contact angles (WCAs) via the static sessile drop method using a Ramé-Hart goniometer; the WCAs were measured at 1, 3 and 5 s after deposition of a 4 µl dd H₂O drop on the membrane surface.

Functional groups in the membranes were identified by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) using an infrared spectrometer (Nicolet 880 FTIR) with attenuated total reflection.

The mechanical properties of the membranes were determined through mechanical stress-strain tests (tension, 2 mm min⁻¹) using a universal test machine (Instron 4465); the elastic modulus (E), elongation at break (ε) and maximum tensile strength (σ_{max}) were determined.

The atomic structure of the membranes was determined by acquiring x-ray diffraction (XRD) patterns using a PANalytical X'Celerator diffractometer with CuKα radiation in a 2θ configuration. The degree of crystallinity of the membranes (χ_{C-XRD}) was calculated from XRD patterns according to [(Area of crystalline peaks (110) and (200))/(Area of crystalline peaks (110) and (200) + Area of amorphous peak)] x 100; [34, 35].

The thermal properties of the membranes were studied by thermogravimetry (TGA) and differential scanning calorimetric (DSC) analysis under nitrogen atmosphere. TGA measurements were performed using a thermogravimetric analyzer (TGA2950; TA Instruments) by heating the sample from RT to 700 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹. DSC measurements were acquired using DSC equipment (Q2000; TA Instruments) from -90 to 150 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹. Quench cooling was applied after the first heating scan and immediately a second heating scan was completed. The degree of crystallinity of the

membranes (χ_{C-DSC}) was calculated from DSC thermograms according to [36] (H_m / H_m^0) $\times 100$, where H_m was the sample melting enthalpy and H_m^0 was the melting enthalpy of 100% crystalline PCL ($H_m^0 = 142.0 \text{ J g}^{-1}$ [37, 38]).

To evaluate the degradation of the membranes, dry samples (1 cm in diameter) were weighed (W_0), immersed in PBS and incubated at 37 °C and 120 rpm. After 1, 2, 3, 4, 9, 17, 24 and 31 days, samples were washed with dd H₂O, dried and weighed (W_1). The weight loss (W_{loss}) percentage was estimated as $[(W_0 - W_1) / W_0] \times 100$.

To estimate the cumulative Zn released from the PCL-G-Zn membranes, individual samples (1 cm in diameter) were immersed in 1 ml of MilliQ-H₂O and incubated at 37 °C and 120 rpm. After 1, 3 and 7 days of incubation, the samples were taken out from the water and immersed again in 1 ml of fresh MilliQ-H₂O. The Zn concentration in collected supernatants at 1, 3 and 7 days was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; iCAP Q, Thermo Scientific).

2.4. In vitro antibacterial activity of composite membranes

The antibacterial activity of the membranes was determined by evaluating the planktonic and biofilm growth inhibition of *S. aureus*. Pure cultures of *S. aureus* were collected from agar plates and resuspended in TSB supplemented with menadione 1% v/v and hemin 1% v/v. The bacterial solution was adjusted to an optical density (OD) of 1 at $\lambda = 600 \text{ nm}$ (BioPhotometer D30). Circular sterilized samples (8 mm in diameter) of the membranes were placed in 48-well culture plates in triplicate, individually inoculated with $1 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$ and incubated at 37 °C in an orbital shaker incubator (Cleave Scientific Ltd) at 120 rpm. After 1, 3 and 7 days of incubation, the capability of the membranes to inhibit planktonic bacterial growth was estimated by measuring the turbidity of the inoculated culture media at $\lambda = 595 \text{ nm}$ in a FilterMax F5 multi-mode microplate reader (Molecular Devices, USA). Turbidity (%) was calculated according to $[(OD_{A1} - OD_{A2}) / (OD_{B1} - OD_{B2})] \times 100$, where OD_{A1} = absorbance of supernatants from bacteria incubation with the membranes, OD_{B1} = absorbance of supernatants from bacteria incubation with no membranes (negative control), OD_{A2} = absorbance of supernatants from membrane incubation with no bacteria, and OD_{B2} = absorbance of culture media only.

The capacity of the membranes to prevent biofilm growth was evaluated by MTT assay. Bacteria-incubated membranes were rinsed once with fresh supplemented TSB to detach loosely attached bacteria. Then, membranes were transferred to a new culture plate and incubated with a 1:10 solution of MTT:culture media for 3 h at 37 °C and 120 rpm to assess the viability of bacteria cells

adhered on the membranes. After MTT incubation, bacteria-metabolized formazan crystals were solubilized in an ISO:DMSO solution (1:1) and absorbance at $\lambda = 570 \text{ nm}$ was read using the FilterMax F5. Bacteria viability (%) was estimated according to $[(OD_{A1} - OD_{A2}) / (OD_{B1} - OD_{B2})] \times 100$, where OD_{A1} = absorbance of solubilized formazan from bacteria adhered on PCL-G or PCL-G-Zn membranes, OD_{B1} = absorbance of solubilized formazan from bacteria adhered on PCL membranes (as negative control since they are not expected to prevent bacterial adhesion), OD_{A2} = absorbance reads from MTT-incubated corresponding PCL-G or PCL-G-Zn membranes with no bacteria, and OD_{B2} = absorbance reads from PCL membranes with no bacteria.

Selected PCL, PCL-G30, PCL-G45, PCL-G30-1Zn and PCL-G45-1Zn membranes used for antibacterial testing were fixed (2% glutaraldehyde at 4 °C), washed with PBS, dehydrated through a series of graded ethanol solutions and observed by SEM (JSM 7600F, JEOL) to qualitatively assess the membrane stability and the bacterial adhesion on their surface.

2.5. In vitro biocompatibility of composite membranes

The toxicity of released products from the membranes was tested using hFOB and hGF-1. Confluent cell cultures were treated with 0.05% trypsin-EDTA, collected by centrifugation, and seeded at a density of $1 \times 10^4 \text{ cells/well}$ on 24-well culture plates with DMEM supplemented with 10% v/v FBS and 1% v/v penicillin/streptomycin (0.25%) or 3% geneticin for hGF-1 or hFOB, respectively. After 1 day of incubation at 37 °C and 5% CO₂, sterilized membrane samples (diameter = 6 mm) were individually placed in hanging cell culture inserts (Millicell®) and placed on the 24-well plates where cells were seeded 24 h before; the culture plates were put back in the incubator. After 1 day of culture, hanging inserts were removed and cell viability was assessed by MTT assay using the same protocol described above. The percentage of cell viability was estimated according to $[(OD_{A1} - OD_{A2}) / (OD_{B1} - OD_{B2})] \times 100$, where OD_{A1} = absorbance of solubilized formazan from cells cultured in the presence of membrane leachates, OD_{B1} = absorbance of solubilized formazan from cells cultured in the presence of no membranes (positive control), and $OD_{A2} = OD_{B2}$ = absorbance of ISO:DMSO solution.

2.6. Statistical analysis

The biological experiments were conducted twice using three samples from each group. The results are expressed as the mean values \pm standard deviation. Results were plotted using Origin 9.0 software. The statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's

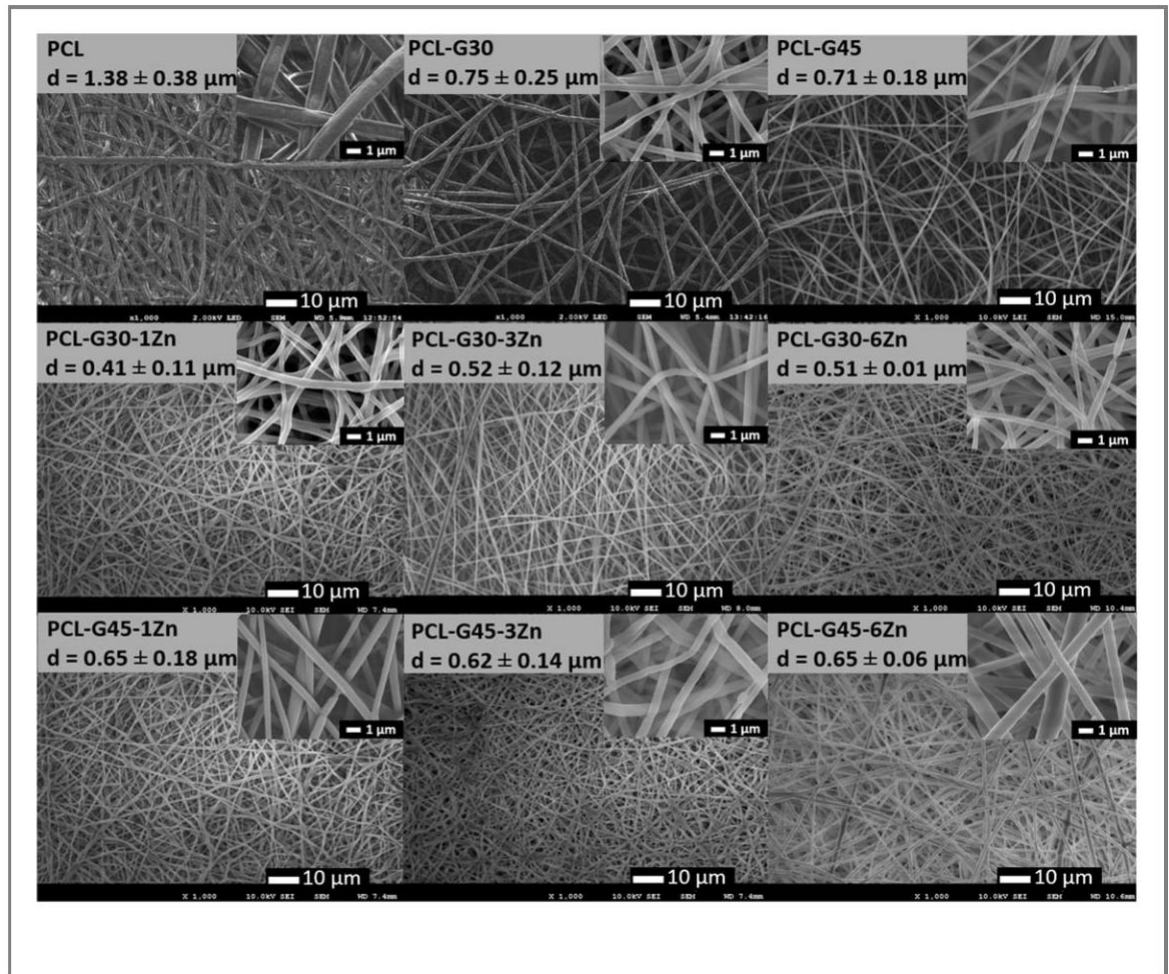


Figure 1. Representative SEM micrographs and fiber average diameters of PCL, PCL-G and PCL-G-Zn membranes.

Table 2. Average pore size of the membranes estimated from SEM micrographs, elemental composition as obtained from EDS, average WCA measured at 1 s, 3 s and 5 s after droplet deposition on the membranes.

Electrospun membrane	Pore size (μm^2)	Elemental composition (wt%)			WCA ($^\circ$)		
		C	O	Zn	1 s	3 s	5 s
PCL	71.8 ± 37.4	71.69	28.31	—	132.8 ± 2.4	130.9 ± 2.5	130.5 ± 2.6
PCL-G30	138.7 ± 74.2	67.45	32.55	—	66.5 ± 1.7	41.0 ± 0.8	31.8 ± 0.1
PCL-G30-1Zn	24.3 ± 16.7	63.37	35.61	1.02	73.5 ± 3.1	57.5 ± 0.7	41.6 ± 0.0
PCL-G30-3Zn	36.6 ± 19.9	68.26	28.53	3.21	77.0 ± 1.4	74.4 ± 2.5	65.0 ± 0.7
PCL-G30-6Zn	21.7 ± 7.7	68.74	25.88	5.39	89.3 ± 1.1	82.1 ± 0.8	77.2 ± 0.5
PCL-G45	115.6 ± 63.5	68.12	31.88	—	56.9 ± 7.3	19.4 ± 1.9	14.8 ± 0.2
PCL-G45-1Zn	12.4 ± 10.3	67.30	32.01	0.70	70.6 ± 0.4	49.2 ± 6.7	46.7 ± 4.7
PCL-G45-3Zn	4.5 ± 2.7	66.83	29.90	3.27	79.2 ± 0.5	64.5 ± 2.7	62.4 ± 3.6
PCL-G45-6Zn	5.2 ± 3.3	64.80	28.55	6.65	79.4 ± 0.6	66.1 ± 3.6	65.2 ± 0.3

multiple comparison test, considering $p < 0.05$ as statistically significant.

3. Results

3.1. Physico-chemical and mechanical properties of membranes

Macroscopically, the membranes were white in color, flexible, soft to the touch and ≈ 0.4 mm in thickness (see supplementary figure S1 available online at stacks.iop.org/BMM/15/035006/mmedia).

Microscopically, the membranes showed a randomly oriented fibrillar structure with rough surface fibers of average diameters (d) ranging from 1.38 to 0.41 μm (figure 1), and interconnected porosity with pore size ranging from 138.7 to 4.5 μm^2 (table 2). The addition of Gel to the membranes (PCL-G) narrowed the average fiber diameter and presented a more homo-geneous (in fiber diameter) morphology in comparison to PCL membranes (i.e. the fiber diameter distribution was less dispersed; supplementary figure S2). In the same fashion, the addition of ZnO-NPs to the membranes decreased the average fiber diameter

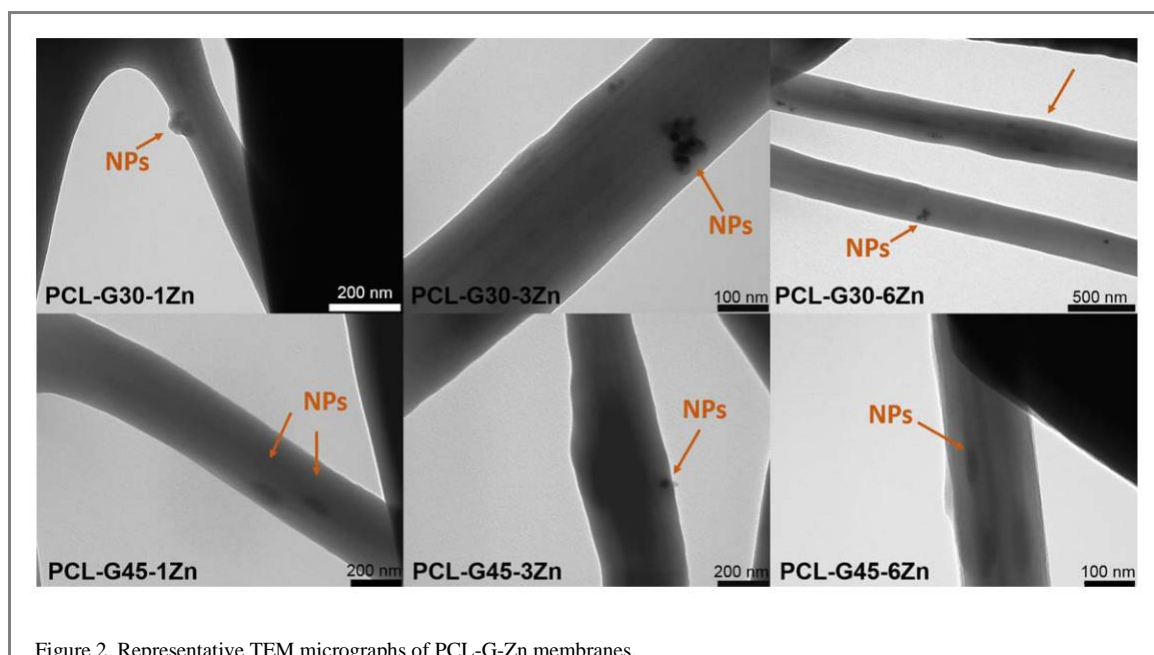


Figure 2. Representative TEM micrographs of PCL-G-Zn membranes.

in comparison to their corresponding PCL-G membranes. The average pore size of the PCL-G membranes was larger than that of the PCL membranes. In contrast, the addition of ZnO-NPs to the membranes significantly decreased the pore size, in comparison to PCL-G or PCL membranes (table 2).

Table 2 also presents the EDS and WCA measurements. The EDS analysis showed high concentrations of C and O in the PCL and PCL-G membranes and confirmed the corresponding Zn wt% concentration in the PCL-G-Zn membranes. Regarding WCA, the PCL membranes showed hydrophobic character ($WCA \approx 130^\circ$) while the PCL-G membranes showed hydrophilic character, $WCA \approx 60^\circ$. The WCA angles of PCL-G membranes increased slightly with the incorporation of ZnO-NPs, but remained hydrophilic ($WCA < 90^\circ$).

Bright-field TEM micrographs (figure 2) showed dark nanostructures embedded in the PCL-G-Zn fibers, suggesting (according to EDS results showing the elemental composition of the membranes as C, O and Zn) the successful incorporation of the ZnO-NPs in the membranes.

FTIR spectra of the PCL-G and PCL-G-Zn membranes (figures 3(a) and (b)) showed the characteristic bands of PCL at 2945 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$), 2859 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$), 1731 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}}=\text{O}$), 1294 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}}-\text{C}$), 1240 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 1175 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{C}-\text{O}-\text{C}$) and 1045 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}}-\text{O}$), and the characteristic bands of Gel at 1651 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}}=\text{O}$, amide I) and 1538 cm^{-1} ($\delta_{\text{N}}-\text{H}$, amide II) [39]. FTIR spectra of the PCL membranes showed a band at ≈ 3420 corresponding to O-H groups, possibly indicating a slight degradation of the PCL molecules possibly induced by the acidity of the AcAc ($\text{pH} \approx 2.4$) during the electrospinning solution [40]. O-H groups in the PCL are expected to increase its predisposition to form hydrogen bonds

with the N-H groups of the Gel molecules, which can be confirmed by the FTIR broad band centered at 3296 cm^{-1} observed in the FTIR spectra of the PCL-G membranes that can be attributed to the overlapping of the O-H and N-H groups [41]. The FTIR spectra of the PCL-G-Zn membranes did not show any clear band corresponding to ZnO, mainly because those bands are expected to appear at wavenumbers below 550 cm^{-1} and thus, they could easily be overlapped by the stronger bands of PCL at similar wavenumbers.

XRD patterns of all membranes (figures 3(c) and (d)) showed the two characteristic diffraction peaks of the semi-crystalline PCL structure at $2\theta = 21.11^\circ$ and 23.99° corresponding to the (110) and (200) planes [42]. A decrease in $\chi_{\text{C}}\text{-XRD}$ was observed as the Gel content increased in the PCL-G membranes and with the increasing ZnO-NP concentration in PCL-G-Zn membranes (table 4). The peak deconvolution of the XRD patterns for the $\chi_{\text{C}}\text{-XRD}$ estimations of membranes is shown in supplementary figure S3.

The mechanical parameters of the membranes calculated from the obtained stress-strain curves (supplementary figure S4) are reported in table 3. The addition of Gel and ZnO-NPs to the membranes increased their elastic modulus in a concentration-dependent manner in comparison to PCL membranes. The elongation at break, ϵ , of the membranes significantly decreased from 238.25% to 1.53% as the Gel concentration increased. Only for the PCL-G30 membranes, the concentration of ZnO-NPs played an important role leading to a maximum ϵ for the 1 wt% PCL-G30-1Zn sample. On the other hand, the maximum tensile strength, σ_{max} , decreased with the Gel concentration, $\text{PCL} > \text{PCL-G30} > \text{PCL-G45}$, and the addition of ZnO-NPs did not significantly modify the σ_{max} for either PCL-G30-Zn or PCL-G45-Zn membranes.

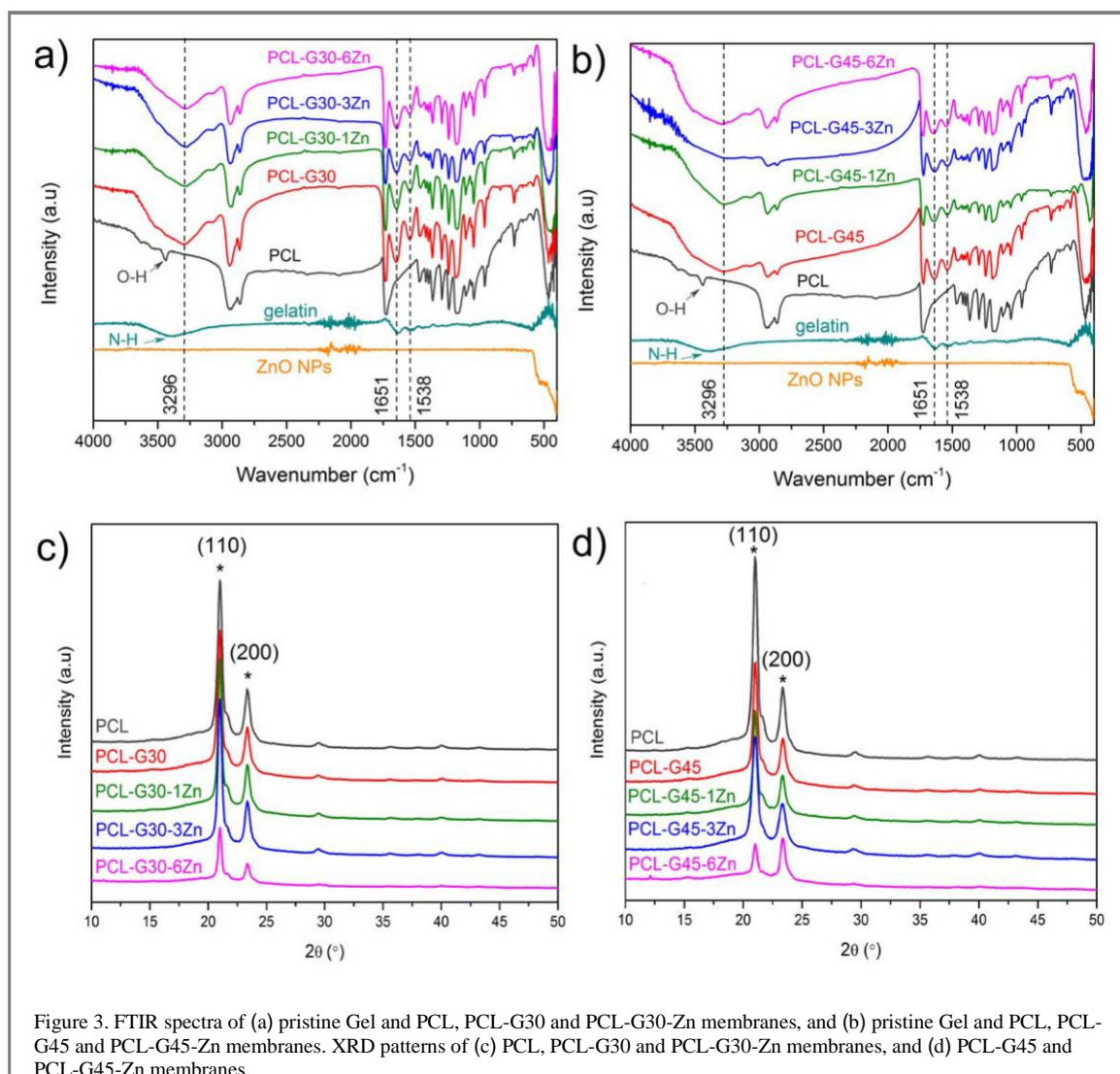


Figure 3. FTIR spectra of (a) pristine Gel and PCL, PCL-G30 and PCL-G30-Zn membranes, and (b) pristine Gel and PCL, PCL-G45 and PCL-G45-Zn membranes. XRD patterns of (c) PCL, PCL-G30 and PCL-G30-Zn membranes, and (d) PCL-G45 and PCL-G45-Zn membranes.

Table 3. Mechanical parameters calculated from the strain–stress curves of the membranes: elastic modulus, E ; elongation at break, ϵ ; maximum tensile strength, σ_{\max} .

Electrospun membrane	E (MPa)	ϵ at break (%)	σ_{\max} (MPa)
PCL	6.09 ± 3.10	238.25 ± 59.12	2.27 ± 0.94
PCL-G30	12.66 ± 2.63	62.67 ± 22.03	1.46 ± 0.18
PCL-G30-1Zn	12.74 ± 3.05	117.78 ± 22.60	1.67 ± 0.28
PCL-G30-3Zn	24.78 ± 7.34	70.33 ± 28.50	1.63 ± 0.19
PCL-G30-6Zn	26.94 ± 7.36	14.52 ± 3.56	1.43 ± 0.09
PCL-G45	49.56 ± 20.72	1.53 ± 0.15	0.65 ± 0.29
PCL-G45-1Zn	41.91 ± 23.65	1.23 ± 0.25	0.43 ± 0.27
PCL-G45-3Zn	41.91 ± 23.64	1.34 ± 0.21	0.58 ± 0.29
PCL-G45-6Zn	65.38 ± 17.42	1.23 ± 0.32	0.75 ± 0.40

The thermal parameters of the membranes and of pristine Gel from TGA curves (supplementary figure S5) are summarized in table 4. PCL showed a single weight loss step at a temperature of maximum weight loss rate (T_{\max}) of 394 °C. Pristine Gel showed a first weight loss step at T_{\max} of 67 °C followed by a broad degradation step, where two weight loss peaks were identified at T_{\max} of 288 °C and 317 °C. PCL-G and PCL-G-Zn membranes exhibited an initial weight loss at $T_{\max} \approx$

35 °C–32 °C, followed by two weight loss peaks at $T_{\max} \approx$ 389 °C–379 °C and at $T_{\max} \approx$ 325 °C–316 °C. PCL-G30-6Zn and PCL-G45-6Zn membranes exhibited additional weight loss peaks at $T_{\max} = 227$ °C and 213 °C, respectively.

The calorimetric properties of the membranes from the heating DSC scans (supplementary figure S6) are summarized in table 4. A unique endothermic peak corresponding to the melting temperature (T_m)

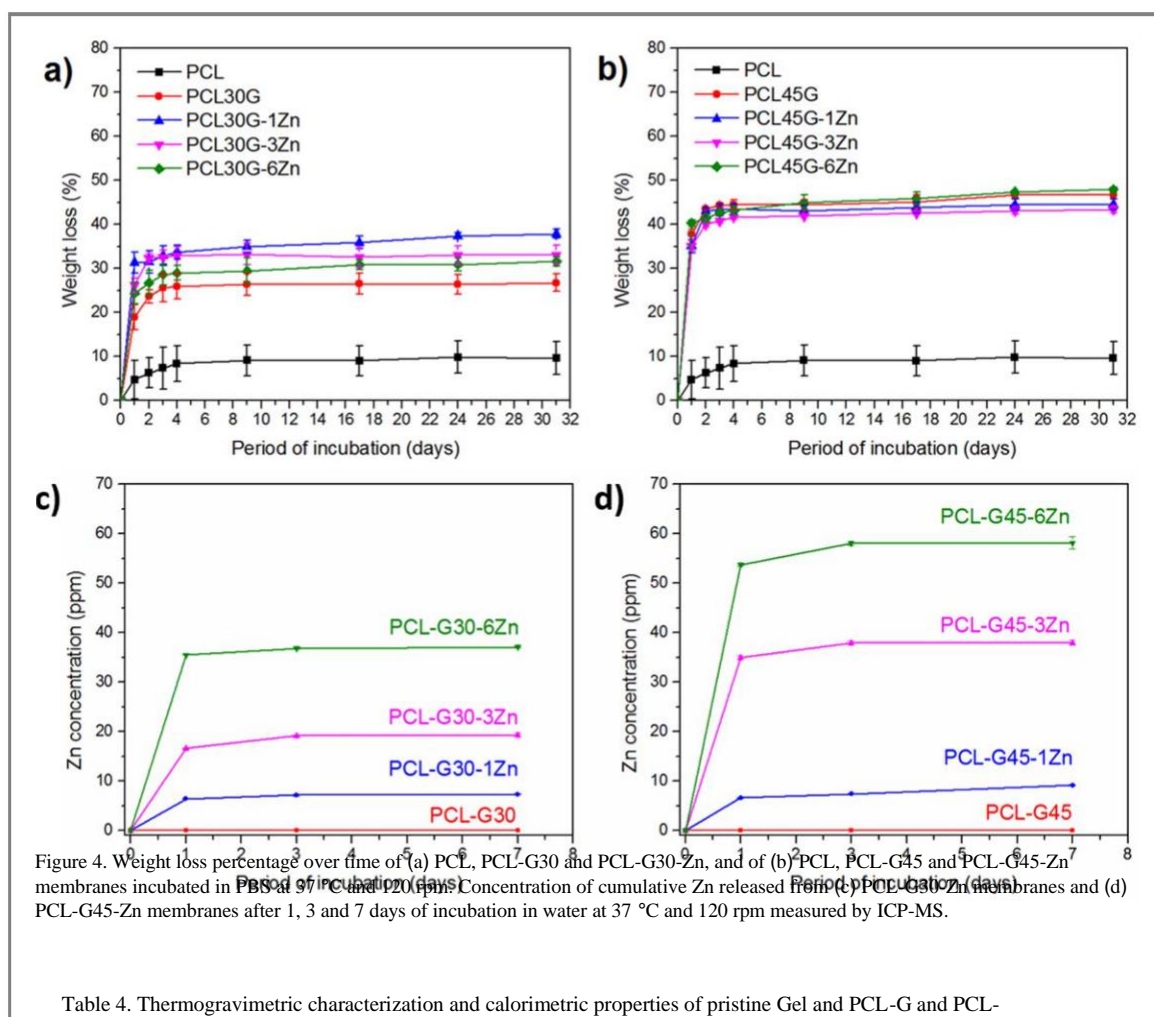


Table 4. Thermogravimetric characterization and calorimetric properties of pristine Gel and PCL-G and PCL-G-Zn nanocomposite membranes.

Material	Temperature of maximum weight loss rate for each degradation step					T_m^a (°C)	H_m^b (J g ⁻¹)	H_m^c [PCL] (%)	χC^d -DSC (%)	χC^e -XRD
	T_{max} (°C)									
Pristine gelatin	67	288	317	—	—	—	—	—	—	—
PCL	—	—	—	394	49	54	70	49	46	—
PCL-G30	35	—	324	389	35	56	50	35	40	—
PCL-G30-1Zn	35	—	324	389	33	56	45	33	39	—
PCL-G30-3Zn	35	—	324	389	31	56	44	31	39	—
PCL-G30-6Zn	33	227	317	376	28	56	38	28	37	—
PCL-G45	32	—	318	387	29	56	41	29	35	—
PCL-G45-1Zn	32	—	318	387	29	56	41	29	34	—
PCL-G45-3Zn	32	—	318	387	29	56	40	29	36	—
PCL-G45-6Zn	35	213	316	381	24	56	36	24	30	—

^a melting temperature;

^b melting enthalpy;

^c melting enthalpy per gram of PCL;

^d degree of crystallinity from melting enthalpy; and

^e degree of crystallinity from XRD patterns.

of the PCL component was detected at 55 °C for all membranes. The endothermic melting enthalpy (H_m) of the PCL-G membranes decreased as the Gel concentration increased and with the presence of 6 wt% ZnO-NPs. The presence of 1 and 3 wt% of ZnO-

NPs in the membranes did not alter the H_m values, indicating that χC -DSC only decreased with the increasing Gel concentration and with the highest ZnO-NPs concentration studied (PCL-G30-6Zn and PCL-G45-6Zn) in the membranes.

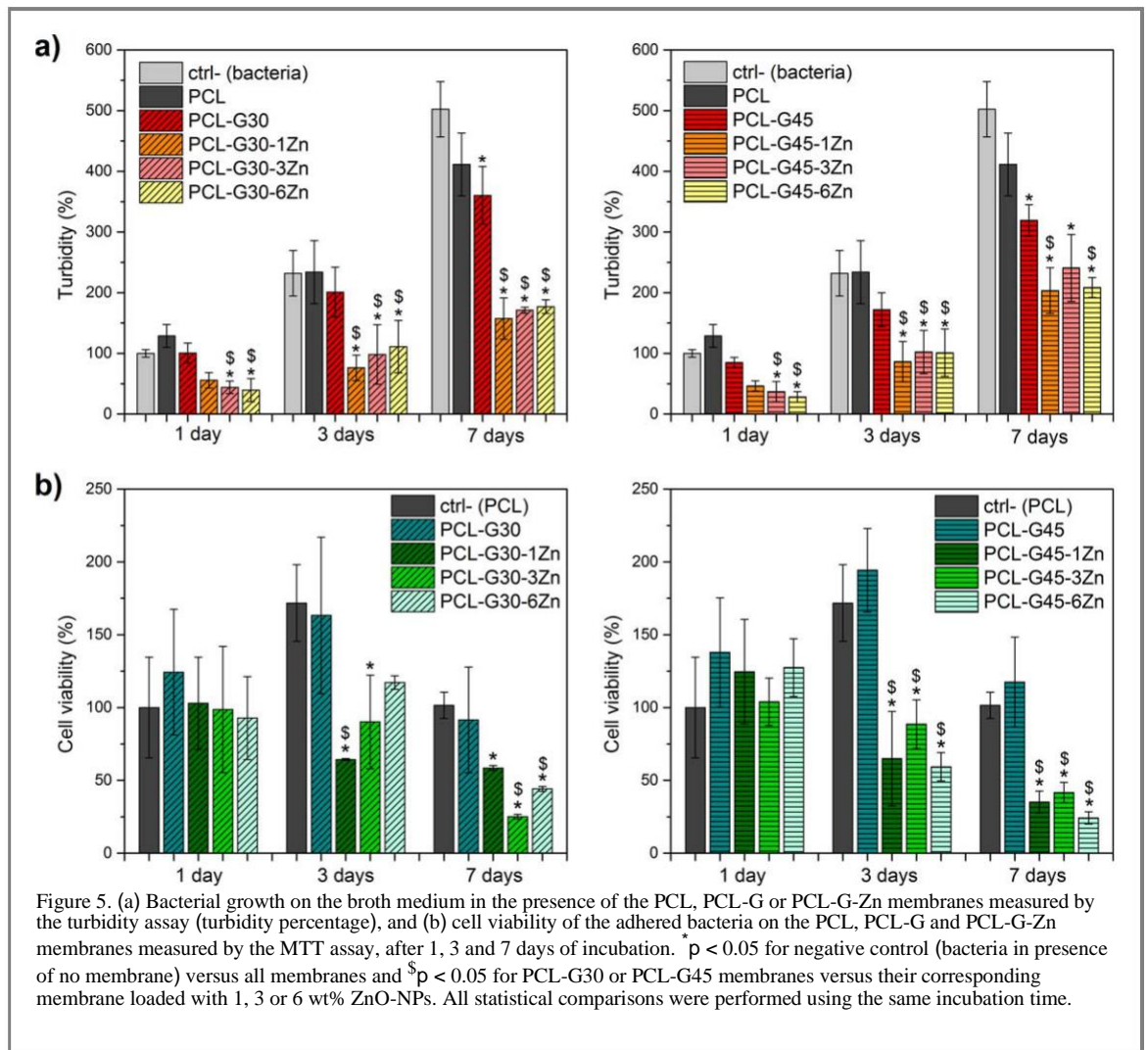


Figure 5. (a) Bacterial growth on the broth medium in the presence of the PCL, PCL-G or PCL-G-Zn membranes measured by the turbidity assay (turbidity percentage), and (b) cell viability of the adhered bacteria on the PCL, PCL-G and PCL-G-Zn membranes measured by the MTT assay, after 1, 3 and 7 days of incubation. $p < 0.05$ for negative control (bacteria in presence of no membrane) versus all membranes and $^{\$}p < 0.05$ for PCL-G30 or PCL-G45 membranes versus their corresponding membrane loaded with 1, 3 or 6 wt% ZnO-NPs. All statistical comparisons were performed using the same incubation time.

Figure 4 shows the weight loss of the membranes as a function of the incubation time and the cumulative Zn released from the PCL-G-Zn membranes. In figure 4(a) it can be seen that the PCL membranes did not show significant degradation ($W_{\text{loss}} < 8\%$) after 31 days of incubation, while the PCL-G and PCL-G-Zn membranes experienced a significantly larger degradation ($W_{\text{loss}} \approx 35\%–46\%$), which was faster during the first 3 days. The W_{loss} was slightly affected by the ZnO-NP concentration for the PCL-G30-Zn membranes, where W_{loss} slightly increased with the increment of ZnO content in the PCL-G30 membranes. For the PCL-G45-Zn membranes no significant differences were observed in W_{loss} with the increasing content of ZnO-NPs (figure 4(b)).

The release of Zn in water increased over time as the ZnO-NP concentration increased in the PCL-G membranes, independently of the Gel concentration (figures 4(c) and (d)). However, the Zn amount released from all membranes gradually diminished with the incubation time. The release of Zn from PCL-G45 membranes with 3 and 6 wt% of ZnO-NPs was significantly higher than that from their corresponding PCL-G30 membranes, while the Zn amount

released from the PCL-G30 and PCL-G45 membranes with 1 wt% of ZnO-NPs was comparable.

The inhibition of planktonic bacterial growth measured by the turbidity assay at 1, 3 and 7 days of incubation (figure 5(a)) showed that the PCL-G membranes (PCL-G30 and PCL-G45) slightly reduced turbidity over time compared to the PCL membrane. Furthermore, the addition of ZnO-NPs to the PCL-G membranes significantly reduced planktonic growth at the three incubation times; moreover, the bacterial growth inhibition was effective independently of the ZnO-NPs concentration. On the other hand, a significant decrease in the viability of the attached bacteria on the membranes (figure 5(b)) was observed with the addition of ZnO-NPs to PCL-G membranes. Although no clear trend could be inferred regarding the NPs concentration at the different incubation times, significantly reduced levels of viable bacteria were detected on the membranes loaded with ZnO-NPs at 7 days of incubation.

Representative SEM micrographs of the PCL, PCL-G and PCL-G-1Zn membranes at 7 days of bacterial incubation are shown in figure 6. PCL-G-Zn with only 1 wt% of ZnO-NPs presented an important reduction of the adhered bacteria in comparison to

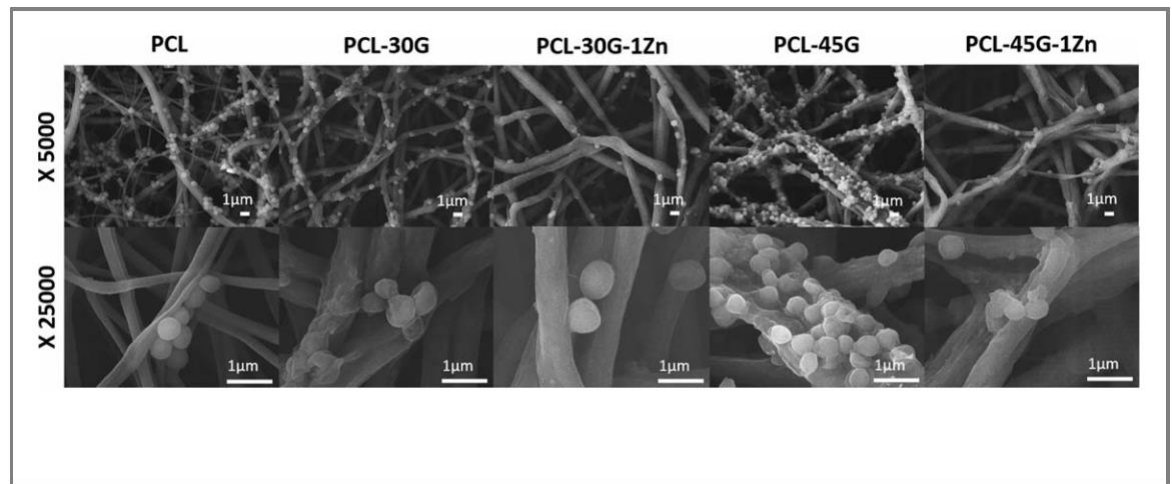


Figure 6. Representative SEM micrographs of PCL, PCL-G30, PCL-G30-1Zn, PCL-G45 and PCL-G45-1Zn membranes after 7 days of bacterial inoculation.

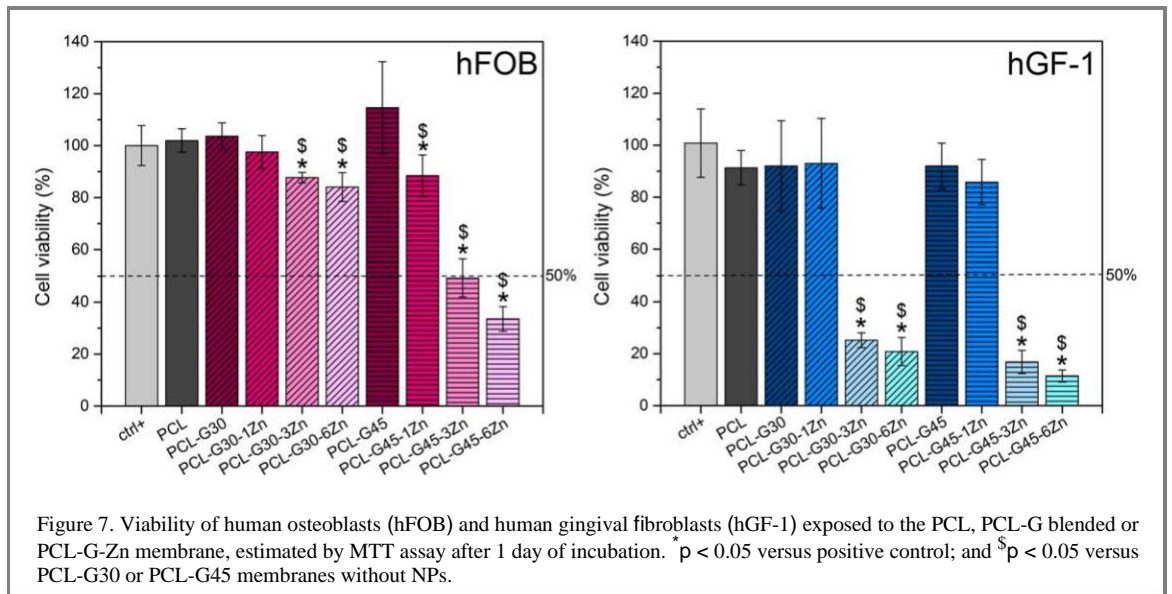


Figure 7. Viability of human osteoblasts (hFOB) and human gingival fibroblasts (hGF-1) exposed to the PCL, PCL-G blended or PCL-G-Zn membrane, estimated by MTT assay after 1 day of incubation. * $p < 0.05$ versus positive control; and \$ $p < 0.05$ versus PCL-G30 or PCL-G45 membranes without NPs.

membranes with no ZnO-NPs added. Moreover, the SEM micrographs showed that the fibrillar structure of the membranes was preserved after the 7 days in culture with bacteria.

3.2. In vitro biocompatibility of membranes

The viability (as determined by the MTT assays) of hFOB and hGF-1 cells exposed to the membrane lixivates is shown in figure 7. In general, neither of the cell types showed significant differences in the percentage of cell viability (CV%) when exposed to the release products of the PCL and PCL-G membranes in comparison to the positive control, but the presence of ZnO-NPs in the membranes decreased the CV% in a Zn concentration-dependent manner. However, both cell types exhibited more than 85% of CV% after 24 h of culture in the presence of PCL-G30-1Zn or PCL-G45-1Zn membrane lixivates. It is interesting to notice that hFOB cells were less sensitive to the ZnO-NPs, since only hFOB cells exposed to the PCL-G45-6Zn membrane lixivates presented less than 50% of cell viability in comparison to the positive control. On

the contrary, hGF-1 cells showed a significant decrease in the CV% when exposed to PCL-G membranes with 3 and 6 wt% of ZnO-NPs, in comparison to the positive control.

4. Discussion

Phase separation of PCL and Gel mixtures, due to their dissimilar physico-chemical properties, negatively affects their electrospinning process generating poorly blended inhomogeneous membranes. In the current study, fibrillar membranes of PCL and Gel loaded with different amounts of ZnO-NPs were fabricated by the electrospinning technique using AcAc. It is worth mentioning that AcAc is considered a 'green' solvent, since it is less toxic than other solvents, such as hexafluoro-2-propanol or trifluoroethanol, frequently used for miscible Gel-PCL electrospinning solutions [32, 43]. As a consequence of the synthesis conditions, hydrogen bonds between PCL and Gel were exhibited by the FTIR, and this hydrogen bonding influenced the structural and mechanical properties of the

membranes. The decrement of the average fiber diameter of the PCL-G membranes was Gel concentration-dependent and this might be attributed to the increment of charge density of the PCL-Gel electrospinning solutions in comparison to the PCL-only solution [44]. The amino groups in the amphoteric Gel molecules can be easily protonated at pH below their isoelectric point ($\text{pH} \approx 2.4$ for AcAc) increasing the charge density and conductivity of the electrospinning solution, an effect not expected for the PCL solution since it is a non-ionic molecule [45]. During the electrospinning process, the increased charge density and conductivity in the jet causes the jet to elongate by electrical forces, producing narrower fibers [46]. A similar reductive effect in the average fiber diameter of PCL-G membranes was observed when the ZnO-NPs were added. The incorporation of Zn-based NPs in the PCL-G-Zn membranes was confirmed by TEM and EDS, hence it can be assumed that ZnO-NPs were successfully embedded in the PCL-G membranes. It is important to mention that in a previous work developing PCL/ZnO-NPs membranes, we observed the formation of zinc acetate after a partial reaction of the ZnO-NPs and AcAc in electrospinning solutions [47]; however, in the present work there was no evidence of a similar reaction, maybe due to the smaller ZnO-NPs concentrations (preventing the observation of really small Zn acetate FTIR bands or XRD peaks) or a particular effect of the Gel in the present membranes. The addition of ZnO-NPs in the electrospinning solutions can increase the number of ions, increasing the charge density of the PCL-G-Zn solutions compared to PCL-G solutions, resulting in even narrower fibers. The average pore size of PCL-G membranes drastically decreased with the presence of ZnO-NPs, and this phenomenon can be attributed to the effect of reduced fiber diameter. Sanders et al theoretically demonstrated that smaller fiber diameters increase the number of fiber crossings and decrease its distance, creating a smaller pore size [48]. Interestingly, the fiber diameter of the PCL-G membranes decreased with the presence of the Gel, but their average pore size was larger than that of the PCL membranes. The cause of this phenomenon is not clear; however, it was hypothesized that the dominant phenomenon that produced the pore size of PCL-G membranes was the charge–charge repulsion between fibers when they were deposited on the collector during the electrospinning process. As the charge density of the PCL-Gel electrospinning solutions increased in comparison to the PCL-only solution, the generated charge–charge electrostatic repulsion between the charged surface of the fibers also increased, facilitating their separation and increasing the pore size of the PCL-G membranes in comparison to PCL membranes. The repulsion phenomenon did not considerably influence the expected relation between pore size and fiber diameter of the PCL-G and PCL-G-Zn membranes, possibly because of the

difference in the charge densities between the PCL-Gel and PCL-Gel-ZnO solutions.

The interconnected porosity is an essential factor when designing GTR membranes. In the current work, the intrinsic interconnectivity and average pore size of the PCL-G-Zn composite membranes (ranging from 4.5 to $36.6 \mu\text{m}^2$) are expected to be large enough to permit the diffusion of physiological nutrients but small enough to act as a cellular barrier [49].

Another relevant characteristic was the change from the hydrophobic to hydrophilic character for the PCL-G membranes in comparison to PCL membranes. Since the GTR membranes will be in direct contact with physiological fluids, hydrophilic surfaces are preferred to promote cell proliferation and to enhance tissue regeneration [50, 51]. The addition of ZnO-NPs increased the WCA, but the hydrophilic character remained in all the PCL-G-Zn membranes. This could be explained by possible physical interactions (van der Waals forces) between the PCL or/and the Gel molecules and the ZnO-NPs that could reduce the surface energy of the membranes and consequently their wettability [52]. Another possible explanation is the smaller pore size of PCL-G-Zn membranes compared with their corresponding PCL-G membranes, which might affect the easy distribution/absorption of water droplets on the membranes [53].

In terms of their thermal degradation properties, PCL-G and PCL-G-Zn membranes showed an initial small weight loss peak that could be attributed to the evaporation of absorbed water mostly from the highly hydrophilic Gel component. The second main weight loss peak corresponded to the rupture of PCL chains and depolymerization of PCL molecules [54]. The last weight loss peak can be ascribed to Gel molecule degradation due to protein chain breakage and peptide bond rupture [55, 56]. Therefore, thermal degradation of the membranes displayed the contribution of both polymeric components of the membranes, indicating a good blend composition. Interestingly, the PCL-G-Zn membranes with the highest ZnO-NPs content (PCL-G30-6Zn and PCL-G45-6Zn) showed an additional weight loss peak at lower temperatures, which might have been caused by an increase in the chain mobility due to a weak interaction between the polymer matrix and the ZnO-NPs [57, 58]. All membranes exhibited a unique melting endothermic peak corresponding to the semi-crystalline PCL component. The

H_m of PCL-G membranes decreased as the Gel concentration increased, but the presence of 1 and 3 wt% ZnO-NPs did not affect the H_m values within the experimental error. Only the presence of 6 wt% of ZnO-NPs decreased the H_m value of the membranes; consequently, the crystallinity only decreased with increasing concentration of the amorphous component (Gel) and with the increment of ZnO-NPs concentration. This result was confirmed by XRD analysis. Diffraction peaks from ZnO-NPs were not

observed in the XRD patterns of the PCL-G-Zn membranes, possibly because the NP concentration is too small compared to the overall polymeric weight of the membranes.

The PCL-G and PCL-G-Zn membranes developed in the present study exhibited appropriate mechanical stability. Compared with three commercial collagen membranes [59], the elastic modulus of the present membranes ($E \approx 6\text{--}65$ MPa) was lower than the elastic modulus of the three reported commercial membranes ($E \approx 90\text{--}700$ MPa), reflecting higher flexibility. Accordingly, the elongation at break of PCL-G30-Zn composite membranes ($\epsilon \approx 14\%\text{--}117\%$) was higher than that of reported commercial collagen membranes ($\epsilon \approx 5.6\%\text{--}7.9\%$). The higher plasticity of PCL-G30-Zn membranes could confer them better structural integrity during GTR treatment. Although the tensile strength of the PCL-G30-Zn membranes ($\sigma_{\max} = 1.43\text{--}1.67$ MPa) was lower than that of commercially available collagen membranes ($\sigma_{\max} = 5.33\text{--}22.5$ MPa), they met the mechanical requirements for their clinical use in GTR procedures as they are not subjected to high tensile strength when they are immobilized at the defect site. Thus, the PCL-G30-Zn membranes developed in the present work have adequate mechanical properties to offer good clinical manipulation and excellent conformability to the defect site.

The degradation (weight loss) of the PCL-G membranes was significantly larger than that of the PCL membranes. Total weight loss after 3 days of incubation corresponded to 30% and 45% for PCL-G30- and PCL-G45-based membranes, respectively, and this can be mainly attributed to the rapid Gel solubilization in aqueous media [60]. To confirm this, a Biuret assay was performed (supplementary figure S7), where it was confirmed that dissolution of $\approx 90\%\text{--}100\%$ of Gel contained in the PCL-G membranes (30 wt% and 45 wt% of total mass for PCL-G30- and PCL-G45-based membranes, respectively) occurred during the first three days of incubation. Furthermore, the higher wettability of PCL-G membranes compared with PCL membranes facilitated water surface interaction and consequently could also have increased hydrolytic degradation of PCL [54]. After day 31 of incubation, the membrane weight loss occurred at a lower rate, and, thus representing enough time for the membranes to have structural stability to allow the bone cell repopulation needed for regeneration of the defect site during GTR procedures. Iglhaut et al reported that bone cell migration reaches its peak 7 days after surgery, with mitotic activity decreased to nearly normal levels by the end of the third week [61]. The period in which GTR membranes must remain intact depends on the defect depth; the longest treatments in which the membranes are used are those of root coverage, which would require membranes to remain mechanically stable from 6 to 24 months post-membrane implantation [12, 62].

Bacterial colonization in the defect site and on the membranes is known to significantly compromise the outcome of GTR procedures. The antibacterial results demonstrated that the present PCL-G-Zn membranes possessed antibacterial activity against *S. aureus*, a strain that has been found in the oral cavity and the perioral region [63], this being advantageous in comparison to some commercial membranes (composed of xenogenic collagen) that have failed to disrupt the growth of *S. aureus* [64]. Turbidity assays showed that PCL-G-Zn membranes significantly inhibited planktonic bacterial growth compared with the negative control (bacteria in the presence of no membranes) and that inhibition was similar for all ZnO-NPs concentrations. This might be due to the release of ZnO-NPs or Zn^{2+} ions in the broth culture media when membrane degradation begins once immersed in the media, which is directly related to the concentration of Zn released from the membranes in the aqueous medium (ICP-MS results). ZnO-NPs antibacterial effects have been frequently attributed to three mechanisms: (1) mechanical disruption of the cell membrane after contact with NPs [65], (2) destabilization of bacterial membranes by electrostatic interactions with Zn^{2+} ions [28], and (3) oxidative stress by production of reactive oxygen species through photocatalysis [28, 66]. The third mechanism was not evaluated here since membranes were not incubated under UV radiation; hence, it can be inferred that the antibacterial action observed resulted from the combination of the first two mechanisms due to the membranes released from Zn^{2+} and NPs in the medium. The bacterial cell viability measured by the MTT assay showed that the PCL-G-Zn membranes significantly reduced the bio-film growth on them in comparison to the PCL and PCL-G membranes after 7 days of incubation. This long-term antibacterial effect can be primarily assigned to the action of the ZnO-NPs still embedded in the membranes, mainly in the PCL component since the Gel component was dissolved during the first 3 days of incubation. A recent study also reported the antibacterial efficacy of PCL-Gel electrospun membranes but loaded with considerably higher concentrations of ZnO-NPs (5, 15 and 30 wt% relative to the total polymer weight) than those in the present study [32]. The use of low antibacterial NPs concentration in GTR membranes is an important contribution of the present work. Although NPs are a very promising alternative antibacterial agent for medical applications, there are still concerns about the possible long-term side effects of NPs in living beings; thus, it is necessary to limit the concentration of NPs released into the host tissue by using the minimum effective doses [33, 67]. Moreover, in future clinical applications, the reduction of the amount of NPs in membranes would reduce their production costs. Currently, there are a few valuable reports of GTR electrospun membranes with NPs-based antibacterial properties such as PCL/silica-NPs, PCL/ZnO-NPs, PCL/Gel/ZnO-NPs,

PCL/polyethyleneglycol/bioactive glass nanopowders, and PCL-fumarate (PCL-F)/gelatin based with Si and Mg co-doped fluorapatite NP membranes [32, 68–71]. However, the GTR membranes developed in this study seem to be more efficient in terms of the NP effective dose, easier to manufacture, and more stable in a wet environment than the aforementioned membranes.

On the other hand, the potential toxicity associated with the release products of the membranes may negatively influence the ability of periodontal cells to repopulate and regenerate the defect site, causing further problems. The viability of hFOB and hGF-1 cells after exposure to lixiviates from the membranes indicated that PCL-G30-Zn membranes with 1, 3 and 6 wt% of ZnO-NPs were biocompatible as they exhibited $\approx 100\%$, $\approx 85\%$ and $\approx 80\%$ of hFOB viability, respectively, in comparison with the positive control; however, in the case of PCL-G45 membranes, only the PCL-G45-1Zn membrane showed more than $\approx 50\%$ of hFOB viability (CV% $\approx 85\%$). The viability of hGF-1 indicated that only PCL-G-Zn membranes with 1 wt% of ZnO-NPs were biocompatible as they displayed $\approx 90\%$ of hGF-1 viability relative to the positive control. From the ICP-MS test measurements, it could be inferred that the Zn toxic dose in the medium for hFOB was between ≈ 35 and ≈ 53 ppm, and for hGF-1 between ≈ 7 and ≈ 16 ppm. These results are in agreement with previous reports of ZnO-NPs release effects on eukaryotic cells [58, 72], and with the reported Zn-based NP dosages of median lethal concentration for small invertebrates (1.79–67.97 ppm) [73]. Therefore, the present PCL-G30-1Zn and PCL-G45-1Zn membranes are expected to appropriately sustain the viability of periodontal cells around them but significantly inhibit bacterial adhesion and consequently biofilm formation.

5. Conclusion

The PCL-G30 membranes loaded with 1 wt% of ZnO-NPs showed the most appropriate physical, chemical and mechanical properties for use as GTR membranes. Additionally, these membranes prevented planktonic and biofilm growth of *S. aureus* and were simultaneously biocompatible with human osteoblasts (hFOB) and gingival fibroblasts (hGF-1). The present work provides valuable information for the development of biocompatible, biodegradable and mechanically stable membranes with local antibacterial properties that could be used as a promising alternative to improve the clinical success of GTR treatments.

Acknowledgments

Gina Prado-Prone gratefully acknowledges the postdoctoral fellowship (POSDOC program) provided by

DGAPA-UNAM. This study was supported by UNAM-PAPIIT IT200319 and partially supported by UNAM-PAPIIT IA206418, CONACyT CB-2016-01/ 288101 and CONACyT FC-2016/1740. The authors acknowledge the SEM technical support of O Novelo-Peralta and L Bazán-Díaz from the Instituto de Investigaciones en Materiales at UNAM, and R Hernández and D Quiterio from the Instituto de Física at UNAM. The authors also acknowledge general laboratory technical support from X Guerrero and the support and advice of V Martínez-López M.Sc. (in vitro cytocompatibility assays) from the Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR-LGII). The Italian Ministry of University and Research (MIUR) is also acknowledged.

Competing interests

The authors declare that no competing interests are present, and there is no conflict of interest.

ORCID iDs

Gina Prado-Prone  <https://orcid.org/0000-0002-2808-9444>

Phaedra Silva-Bermudez  <https://orcid.org/0000-0001-6830-3321>

Masoomah Bazzar  <https://orcid.org/0000-0002-9831-095X>

Argelia Almaguer-Flores  <https://orcid.org/0000-0003-0014-9772>

References

- [1] Karring T, Nayman S, Gottlow J and Laurell L 1993 Development of the biological concept of guided tissue regeneration—animal and human studies *Periodontology* **1** 26–35
- [2] Bosshardt D D and Sculean A 2009 Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontology* **51** 208–19
- [3] Ahuja A, Ahuja V and Singh K 2016 Current concepts of regenerative biomaterials in implant dentistry *J. Int. Clin. Dent. Res. Organ.* **7** 34
- [4] Sander L and Karring T 1995 New attachment and bone-formation in periodontal defects following treatment of submerged roots with guided tissue regeneration *J. Clin. Periodontol* **22** 295–9
- [5] Giannitelli S M et al 2015 Graded porous polyurethane foam: a potential scaffold for oro-maxillary bone regeneration *Mater. Sci. Eng. C* **51** 329–35
- [6] Vasilev K, Cook J and Griesser H J 2009 Antibacterial surfaces for biomedical devices *Expert Review of Medical Devices* **6** 553–67
- [7] Robb B and Lennox B 2011 Chapter 3.- The electrospinning process conditions and control *Electrospinning for tissue regeneration* ed L A Bosworth and S Downes (Cambridge, UK: Woodhead Publishing) (<https://doi.org/10.1533/9780857092915>)
- [8] Guarino V, Alvarez-Perez M, Cirillo V and Ambrosio L 2011 HMSC interaction with PCL and PCL/gelatin platforms: a comparative study on films and electrospun membranes *J. Bioact. Compat. Polym.* **26** 144–60
- [9] Qian Y, Zhang Z, Zheng L, Song R and Zhao Y 2014 Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone blended with chitosan-gelatin complex nanofibrous mats *J. Nanomater.* **2014** 1–7

- [10] Gomes S R et al 2015 In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: a comparative study *Mater. Sci. Eng. C* **46** 348–58
- [11] Van Doren S 2015 Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin *Matrix Biol.* **44–46** 224–31
- [12] Bunyaratavej P and Wang H L 2001 Collagen membranes: a review *J. Periodontol.* **72** 215–29
- [13] Van Vlierberghe S, Vanderleyden E, Boterberg V and Dubruel P 2011 Gelatin functionalization of biomaterial surfaces: strategies for immobilization and visualization *Polymers (Basel)* **3** 114–30
- [14] Başaran İ and Oral A 2018 Grafting of poly(ϵ -caprolactone) on electrospun gelatin nanofiber through surface-initiated ring-opening polymerization *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **67** 1051–8
- [15] Feng B, Duan H, Fu W, Cao Y, Zhang W J and Zhang Y 2015 Effect of inhomogeneity of the electrospun fibrous scaffolds of gelatin/polycaprolactone hybrid on cell proliferation *J. Biomed. Mater. Res. A* **103** 431–8
- [16] Kishan A P et al 2015 In situ crosslinking of electrospun gelatin for improved fiber morphology retention and tunable degradation *J. Mater. Chem. B* **3** 7930–8
- [17] Papa A, Guarino V, Cirillo V, Oliviero O and Ambrosio L 2017 Optimization of bicomponent electrospun fibers for therapeutic use: post-treatments to improve chemical and biological stability *J. Funct. Biomater.* **8** 47
- [18] Jiang Y C, Jiang L, Huang A, Wang X F, Li Q and Turng L S 2017 Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell/matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds *Mater. Sci. Eng. C* **71** 901–8
- [19] He X et al 2015 Electrospun gelatin/polycaprolactone nanofibrous membranes combined with a coculture of bone marrow stromal cells and chondrocytes for cartilage engineering *Int. J. Nanomedicine* **10** 2089–99
- [20] Fee T, Surianarayanan S, Downs C, Zhou Y and Berry J 2016 Nanofiber alignment regulates NIH3T3 cell orientation and cytoskeletal gene expression on electrospun PCL+gelatin nanofibers *PLoS One* **11** 1–12
- [21] Strobel H A, Calamari E L, Beliveau A, Jain A and Rolle M W 2018 Fabrication and characterization of electrospun polycaprolactone and gelatin composite cuffs for tissue engineered blood vessels *J. Biomed. Mater. Res. B* **106** 817–26
- [22] Xue J et al 2014 Drug loaded homogeneous electrospun PCL/ gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes *Biomaterials* **35** 9395–405
- [23] Marques M S, Zepon K M, Petronilho F C, Soldi V and Kanis L A 2017 Characterization of membranes based on cellulose acetate butyrate/poly(caprolactone)triol/ doxycycline and their potential for guided bone regeneration application *Mater. Sci. Eng. C* **76** 365–73
- [24] Shi R et al 2019 Infection-responsive electrospun nanofiber mat for antibacterial guided tissue regeneration membrane *Mater. Sci. Eng. C* **100** 523–34
- [25] World Health Organization 2014 Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 257
- [26] Pati R et al 2014 Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages *Nanomedicine* **10** 1195–208
- [27] Salem W et al 2015 Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* *Int. J. Med. Microbiol.* **305** 85–95
- [28] Sarwar S, Chakraborti S, Bera S, Sheikh I A, Hoque K M and Chakraborti P 2016 The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: variation in response depends on biotype *Nanomedicine* **12** 1499–509
- [29] He W et al 2016 Production of reactive oxygen species and electrons from photoexcited ZnO and ZnS nanoparticles: a comparative study for unraveling their distinct photocatalytic activities *J. Phys. Chem. C* **120** 3187–95
- [30] Sultana S, Rafiuddin, Khan M Z and Shahadat M 2015 Development of ZnO and ZrO₂ nanoparticles: Their photocatalytic and bactericidal activity *J. Environ. Chem. Eng.* **3** 886–91
- [31] Qiu K et al 2013 Doxorubicin-loaded electrospun poly(l-lactic acid)/mesoporous silica nanoparticles composite nanofibers for potential postsurgical cancer treatment *J. Mater. Chem. B* **1** 4601–11
- [32] Münchow E A et al 2015 Development and characterization of novel ZnO-loaded electrospun membranes for periodontal regeneration *Dent. Mater.* **31** 1038–51
- [33] Huang Y W, Cambre M and Lee H J 2017 The toxicity of nanoparticles depends on multiple molecular and physicochemical mechanisms *Int. J. Mol. Sci.* **18** 1–13
- [34] Papajani B, Qoku E, Malkaj P and Dilo T 2015 The study of phase compound and the degree of crystallinity of recycled LDPE by x-ray diffractometer and optical Microscope **4** 2228–32
- [35] Ruland W 1961 X-ray determination of crystallinity and diffuse disorder scattering *Acta Crystallographica* **14** 1180–5
- [36] Taghizadeh A and Favis B D 2013 Carbon nanotubes in blends of polycaprolactone/thermoplastic starch *Carbohydr. Polym.* **98** 189–98
- [37] Shieh Y-T, Yang H-S, Chen H-L and Lin T-L 2005 Nonisothermal crystallization of compatible PCL/PVC blends under supercritical CO₂ *Polym. J.* **37** 932–8
- [38] Govorcin E, Ocelic V, Slouf M and Šitum A 2014 Characterization of biodegradable polycaprolactone containing titanium dioxide micro and nanoparticles. *World Academy of Sciences, Engineering and Technology.* **8** 577–81
- [39] Benkaddour A, Jradi K, Robert S and Daneault C 2013 Grafting of polycaprolactone on oxidized nanocelluloses by click chemistry *Nanomaterials* **3** 141–57
- [40] Hernández A R, Contreras O C, Acevedo J C and Moreno L G N 2013 Poly(ϵ -caprolactone) degradation under acidic and alkaline conditions *Am. J. Polym. Sci.* **3** 70–5
- [41] Gautam S, Dinda A K and Mishra N C 2013 Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method *Mater. Sci. Eng. C* **33** 1228–35
- [42] Abdelrazek E M, Hezma A M, El-khodary A and Elzayat A M 2016 Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/ PMMA biopolymer blend *Egypt. J. Basic. Appl. Sci.* **3** 10–5
- [43] Prado-Prone G et al 2020 Single-step, acid-based fabrication of homogeneous gelatin-polycaprolactone fibrillar scaffolds intended for skin tissue engineering *Biomed. Mater.* ([https:// doi.org/10.1088/1748-605X/ab673b](https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab673b))
- [44] Feng B, Tu H, Yuan H, Peng H and Zhang Y 2012 Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL *Biomacromolecules* **13** 3917–25
- [45] Zhang Y, Ouyang H, Chwee T L, Ramakrishna S and Huang Z M 2005 Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds *J. Biomed. Mater. Res. B* **72** 156–65
- [46] Angamma C J and Jayaram S H 2011 Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology *IEEE Trans. Ind. Appl.* **47** 1109–17
- [47] Prado-Prone G, Silva-Bermúdez P, Almaguer-Flores A, García-Macedo J A, García V I, Rodil S E, Ibarra C, Velasquillo C et al 2018 Enhanced antibacterial nanocomposite mats by coaxial electrospinning of polycaprolactone fibers loaded with Zn-based nanoparticles *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **14** 1695–706
- [48] Sanders J E, Lamont S E, Mitchell S B and Malcolm S G 2005 Small fiber diameter fibro-porous meshes: Tissue response sensitivity to fiber spacing *J. Biomed. Mater. Res. A* **72** 335–42
- [49] Scaffaro R, Lopresti F, Botta L, Rigogliuso S and Ghersi G 2016 Melt processed PCL/PEG scaffold with discrete pore size gradient for selective cellular infiltration *Macromol. Mater. Eng.* **301** 182–90
- [50] Calciolari E, Hamlet A, Ivanovski S and Donos N 2018 Pro-osteogenic properties of hydrophilic and hydrophobic

- titanium surfaces: crosstalk between signalling pathways in in vivo models *J. Periodontol Res.* **53** 598–609
- [51] Ma Z, Mao Z and Gao C 2007 Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces* **60** 137–57
- [52] Acosta E J 2019 Solid-liquid-liquid wettability and its prediction with surface free energy models *Adv. Colloid Interface Sci.* **264** 28–46
- [53] Ding S G, Cheng X Q, Jiang Z X, Bai Y P and Shao L 2015 Pore morphology control and hydrophilicity of polyacrylonitrile ultrafiltration membranes *Journal of Applied Polymer Science* **132** 1–9
- [54] Bartnikowski M, Dargaville T R, Ivanovski S and Huttmacher D W 2019 Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment *Prog. Polym. Sci.* **96** 1–20
- [55] Li J et al 2017 Combined membrane emulsification with biomimetic mineralization: designing and constructing novel organic-inorganic hybrid microspheres for enzyme immobilization *Compos. Sci. Technol.* **141** 56–64
- [56] Frazier S D and Srubar W V 2016 Evaporation-based method for preparing gelatin foams with aligned tubular pore structures *Mater. Sci. Eng. C* **62** 467–73
- [57] Mallakpour S and Nouruzi N 2016 Modification of morphological, mechanical, optical and thermal properties in polycaprolactone-based nanocomposites by the incorporation of diacid-modified ZnO nanoparticles *J. Mater. Sci.* **51** 6400–10
- [58] Felice B et al 2018 Controlled degradability of PCL-ZnO nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering and their antibacterial activity *Mater. Sci. Eng. C* **93** 724–38
- [59] Coic M, Placet V, Jacquet E and Meyer C 2010 Mechanical properties of collagen membranes used in guided bone regeneration: a comparative study of three models *Elsevier Masson SAS* **111** 286–90
- [60] Guarino V, Altobelli R, Cirillo V, Cummaro A and Ambrosio L 2015 Additive electrospinning: a route to process electrospun scaffolds for controlled molecular release *Polym. Adv. Technol.* **26** 1359–69
- [61] Iglhaut J, Aukhil I, Simpson D M, Johnson M C and Koch G 1988 Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds *J. Periodontol Res.* **23** 107–17
- [62] Wang H L, Modarressi M and Fu J H 2012 Utilizing collagen membranes for guided tissue regeneration-based root coverage *Periodontology* **59** 140–57
- [63] McCormack M G, Smith A J, Akram A N, Jackson M, Robertson D and Edwards G 2015 *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? *Am. J. Infect. Control* **43** 35–7
- [64] Slutzkey S, Kozlovsky A, Artzi Z and Matalon S 2015 Collagen barrier membranes may accelerate bacterial growth in vitro: a potential clinical risk to regenerative procedures *Quintessence Int. (Berl)* **46** 43–50
- [65] Guo B L et al 2015 The antibacterial activity of Ta-doped ZnO nanoparticles *Nanoscale Res. Lett.* **10** 336
- [66] Stankic S, Suman S, Haque F and Vidic J 2016 Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties *J. Nanobiotechnology* **14** 73
- [67] Maurizi L, Papa A L, Boudon J, Sudhakaran S, Pruvot B, Vandroux D, Chluba J, Lizard G, Millot N et al 2018 Toxicological risk assessment of emerging nanomaterials: cytotoxicity, cellular uptake, effects on biogenesis and cell organelle activity, acute toxicity and biodistribution of oxide nanoparticles *Unraveling the Safety Profile of Nanoscale Particles and Materials - From Biomedical to Environmental Applications* ed A C Gomes and M P Sarria (London, UK: IntechOpen) pp 18–33
- [68] Nasajpour A et al 2018 A multifunctional polymeric periodontal membrane with osteogenic and antibacterial characteristics *Adv. Funct. Mater.* **28** 1703437
- [69] Castro A, Diba M, Kersten M, Jansen J A, Van den Beucken J and Yang F 2018 Development of a PCL-silica nanoparticles composite membrane for guided bone regeneration *Mater. Sci. Eng. C* **85** 154–61
- [70] Soltani Dehnavi S, Mehdikhani M, Raffienia M and Bonakdar S 2018 Preparation and in vitro evaluation of polycaprolactone/ PEG/bioactive glass nanopowders nanocomposite membranes for GTR/GBR applications *Mater. Sci. Eng. C* **90** 236–47
- [71] Ahmadi T, Monshi A, Mortazavi V, Fathi M H, Sharifi S, Kharaziha M, Khazdooz L, Zarei A, Dehaghani M T et al 2020 Fabrication and characterization of polycaprolactone fumarate/gelatin-based nanocomposite incorporated with silicon and magnesium co-doped fluorapatite nanoparticles using electrospinning method *Mater. Sci. Eng. C* **106** 1–10
- [72] Osorio R, Alfonso-Rodríguez C A, Medina-Castillo A L, Alaminos M and Toledano M 2016 Bioactive Polymeric Nanoparticles for Periodontal Therapy *PLoS One* **11** 1–18
- [73] Hou J, Wu Y, Li X, Wei B, Li S and Wang X 2018 Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms *Chemosphere* **193** 852–60

PAPER

Bismuth subsalicylate incorporated in polycaprolactone-gelatin membranes by electrospinning to prevent bacterial colonization

To cite this article: Ximena Vidal-Gutiérrez *et al* 2021 *Biomed. Mater.* **16** 045036

View the [article online](#) for updates and enhancements.

Biomedical Materials



PAPER

Bismuth subsalicylate incorporated in polycaprolactone-gelatin membranes by electrospinning to prevent bacterial colonization

RECEIVED
4 December 2020REVISED
10 May 2021ACCEPTED FOR PUBLICATION
26 May 2021PUBLISHED
11 June 2021**Ximena Vidal-Gutiérrez^{1,2,3}, Gina Prado-Prone^{2,4}, Sandra E Rodil⁵, Cristina Velasquillo⁴, Ibarra Clemente⁶, Phaedra Silva-Bermudez^{3,*} and Argelia Almaguer-Flores^{2,*}**

¹ Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, CDMX C.P. 04510, México

² Laboratorio de Biointerfases, Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, CDMX C.P. 04510, México

³ Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Av. México-Xochimilco No. 289 Col. Arenal de Guadalupe, CDMX C.P. 14389, México

⁴ Laboratorio de Biotecnología, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Av. México Xochimilco No. 289 Col. Arenal de Guadalupe, CDMX C.P. 14389, México

⁵ Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, CDMX C.P. 04510, México

⁶ Dirección General, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Av. México Xochimilco No. 289 Col. Arenal de Guadalupe, CDMX C.P. 14389, México

* Authors to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: pssilva@inr.gob.mx and aalmaguer@comunidad.unam.mx

Keywords: electrospinning, bismuth subsalicylate, polycaprolactone, gelatin, antibacterial membrane, GTR membrane Supplementary material for this article is available [online](#)

Abstract

Periodontitis is a chronic, multifactorial, inflammatory disease characterized by the progressive destruction of the periodontal tissues. Guided tissue regeneration (GTR), involving the use of barrier membranes, is one of the most successful clinical procedures for periodontal therapy. Nevertheless, rapid degradation of the membranes and membrane-related infections are considered two of the major reasons for GTR clinical failure. Recently, integration of non-antibiotic, antimicrobial materials to the membranes has emerged as a novel strategy to face the bacterial infection challenge, without increasing bacterial resistance. In this sense, bismuth subsalicylate (BSS) is a non-antibiotic, metal-based antimicrobial agent effective against different bacterial strains, that has been long safely used in medical treatments. Thus, the aim of the present work was to fabricate fibrillar, non-rapidly bioresorbable, antibacterial GTR membranes composed of polycaprolactone (PCL), gelatin (Gel), and BSS as the antibacterial agent. PCL-G-BSS membranes with three different BSS concentrations (2 wt./v%, 4 wt./v%, and 6 wt./v%) were developed by electrospinning and their morphology, composition, water wettability, mechanical properties, Bi release and degradation rate were characterized. The Cytotoxicity of the membranes was studied *in vitro* using human osteoblasts (hFOB) and gingival fibroblasts (HGF-1), and their antibacterial activity was tested against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* and *Staphylococcus aureus*. The membranes obtained exhibited adequate mechanical properties for clinical application, and appropriate degradation rates for allowing periodontal defects regeneration. The hFOB and HGF-1 cells displayed adequate viability when in contact with the lixiviated products from the membranes, and, in general, displayed antibacterial activity against the four bacteria strains tested. Thus, the PCL-G-BSS membranes showed to be appropriate as potential barrier membranes for periodontal GTR treatments.

1. Introduction

Periodontitis is a chronic multifactorial inflammatory disease associated with dysbiotic dental biofilms, characterized by the progressive destruction of the periodontal tissues, finally producing tooth loss [1–3]. Different regenerative surgical modalities have been performed to achieve regeneration of the peri-odontal tissues [4], where one of the most successful is the Guided Tissue Regeneration (GTR) [5]. The biological basis of GTR periodontal treatment consists of the use of a barrier membrane to prevent epithelial tissue migration into the defective area, consequently, allowing the appropriate formation of bone, cementum, and periodontal ligament [6, 7].

One of the major drawbacks of GTR is the contamination of the barrier membranes with oral bacteria. It has been reported that the presence of periodontopathogens such as *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* negatively impacts the success of this periodontal treatment [8–10]. Thus, different antibacterial GTR membranes have been developed and studied against Gram-positive bacteria commonly found in the oral cavity such as *Staphylococcus aureus*, and Gram-negative enteric rods such as *Escherichia coli* [11–13].

The ideal barrier membrane should be biocompatible, antibacterial, biodegradable, and mechanically stable for appropriate surgical handling [14, 15]. Current bioabsorbable GTR membranes are composed of natural and synthetic resorbable polymers such as collagen, chitosan, poly (glycolic acid), poly (lactic acid), polycaprolactone (PCL), and their copolymers [5]. In this sense, one of the limitations of commercial membranes, mainly of those composed of natural polymers, is the early rupture of the membrane due to its rapid degradation once it is placed in the surgical site [5, 7, 16].

Advances in the field of science and technology have led to the development of new approaches for enhancing periodontal GTR treatment, such as (a) membranes coated with antibiotics, alginate, hyaluronic acid or chitosan, (b) addition of silicon, titanium and silver ions into the membranes, (c) membranes' surface modifications by electron beam irradiation, and (d) development of fibrillar membranes by electrospinning [17]. In particular, electrospinning is an interesting, simple and versatile technique that can produce continuous fibers from natural and synthetic polymers, allowing the integration of different nanoparticles (NPs) or powder materials, and thus, enabling the successful development of membranes that can mimic the extracellular matrix and present tailored properties for successful GTR treatment [18, 19].

PCL has been widely used in different biomedical studies due to their biocompatibility, biodegradability, availability, and high mechanical strength [20]. However, due to its slow degradation rate, PCL is

normally blended or copolymerized with other polymers to achieve adequate properties for biomedical applications [21]. One option for PCL blending is gelatin (Gel), which specific integrin-binding sites for cell adhesion and differentiation can positively influence cell behavior [22]. Gelatin presents high solubility in physiological conditions, and consequently, high degradation rates and poor mechanical properties. Nevertheless, its blending with PCL allows tailoring of its properties resulting in PCL-Gel materials with suitable properties for different biomedical applications, such as wound healing, tissue engineering and GTR [23–29].

The exposure of the membranes to the oral environment causes bacterial colonization increasing the inflammatory response that impedes tissue regeneration. Thus, the development of membranes with antibacterial properties is a necessary strategy for successful periodontal GTR treatment [30]. Membranes loaded with antibiotics might lead to the development of bacterial resistance [31]. Therefore, non-antibiotic agents such as chlorhexidine, chitosan, and metallic or ceramic-based compounds and NPs have been proposed to develop GTR membranes with antibacterial properties [32–35]. Bismuth compounds have not been added into GTR membranes before, but they are classified as effective, non-antibiotic, antimicrobial agents that have been clinically used to treat enteric bacterial diseases, and have proved to develop no bacterial resistance, even after prolonged use [36–38]. In particular, bismuth subsalicylate (BSS), extensively used for prevention and treatment of the travelers' diarrhea, possesses antimicrobial properties against different bacterial strains and viruses with minor toxicity effects [36, 38–42]. Recently, BSS antibacterial effectiveness in different nanometric scales has been explored [43, 44]. In addition, BSS is easy to obtain, and its generic uses reduce its overall cost and might reduce the environmental impact upon large-scale production [43].

When combining natural and synthetic polymers and non-antibiotic antibacterial agents, one of the main challenges is to develop materials with adequate biodegradability, appropriate biocompatibility, and significant antibacterial activity for the specific intended use. Considering this, we developed microfibrillar PCL-Gel membranes loaded with different concentrations of BSS, aiming for membranes with appropriate biocompatibility, biodegradability, mechanical stability, and antibacterial activity for GTR applications. The membranes were fabricated by electrospinning and their morphology, atomic structure, elemental and chemical compositions, water contact angle, degradation rate and Bi release were characterized. Their antimicrobial activity was tested against four clinically relevant bacteria, two aerobic bacteria; *E. coli* and *S. aureus*, and two anaerobic bacteria; *A. actinomycetemcomitans* serotype b and *P. gingivalis*. The cytotoxicity of the membranes was

Table 1. Electrospun membranes.

Membrane	PCL (wt.%) ^a	Gel (wt.%) ^a	BSS (wt./v %) ^b	PCL:Gel:BSS (mass ratio)
PCL	100	0	0	100:0:0
PCL-G	70	30	0	70:30:0
PCL-G-2BSS	70	30	2	65:28:7
PCL-G-4BSS	70	30	4	61:26:13
PCL-G-6BSS	70	30	6	57:25:19

^aRelative to the total content of polymer in the electrospinning solution. ^bRelative to the total volume of the electrospinning solution.

studied *in vitro* using human gingival fibroblasts (HGF-1) and human osteoblasts (hFOB), as representative cells from two important tissues expected to be in close contact with the membranes during peri-odontal GTR treatment.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PCL (Mn = 80,000 Da), lysozyme from chicken egg white and lipase from *Pseudomonas* sp. were acquired from Sigma-Aldrich, USA. Gelatin type B and glacial acetic acid (AcAc, 99.5%) were purchased from J T Baker, USA. BSS was supplied by FarmaQuimia, Mexico. For antibacterial assays, two anaerobic bacterial strains; *A. actinomycetemcomitans* serotype b (*A. actinomycetemcomitans* sero-type b; ATCC® 43718™) and *P. gingivalis* (*P. gin-givalis*; ATCC® 33277™), and two aerobic strains; *E. coli* (*E. coli*; ATCC® 33780™) and *S. aureus* (*S. aureus*; ATCC® 25923™), were used. *Myco-plasma* broth base, enriched Hektoen (HK) agar base, trypticase soy broth and trypticase agar base were acquired from Becton-Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA. Defibrinated sheep blood was purchased from Microlab Laboratory S.A. de C.V., Mexico. Hemin and menadione were purchased from Sigma-Aldrich, USA. DNeasy Ultraclean Microbial Kit (Cat. No. 12224-50) was acquired from QIAGEN GmbH, Germany. For cell viability assessment (cytotoxicity), human gingival fibroblasts (HGF-1, ATCC® CRL-11372™) and human osteoblasts (hFOB, ATCC® CRL-2014™) were used. Dul-becco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin 0.25%, trypsin-EDTA 0.25% and phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.4) were obtained from GIBCO, USA. Geneticin G418 was acquired from ATCC®. Hanging cell culture inserts were purchased from Millicell®, USA. 2-propanol (99%), ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) (MTT) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich, USA.

2.2. Synthesis of electrospun membranes

A stock PCL-Gel solution was prepared by dissolving PCL (19% wt./v) in glacial AcAc and incorporating

the appropriate amount of Gel to obtain a solution with a final PCL:Gel mass ratio of 70:30 [24]. Based on previous studies of the correlations between the concentration and the antimicrobial activity of BSS against different aerobic and anaerobic bacteria strains [44–46], different amounts of BSS were weighted and individually dispersed into PCL-Gel solution at a BSS concentration of 2% wt./v, 4% wt./v, and 6% wt./v, to finally result in three independent electrospinning solutions with PCL:Gel:BSS mass ratios of 65:28:7, 61:26:13, and 57:25:19. An only PCL (19% wt./v in glacial AcAc) solution was also prepared as control. Solutions were blended at 90–120 rpm for 48 h at room temperature (RT) and then, electrospun in a horizontal equipment assembled in our laboratory. For electrospinning, solution feeding was maintained at 1 ml h⁻¹ (NE-4000 2-channel syringe pump), an optimized voltage of 14–15 kV was applied (EH60P1.5 Glassman High Voltage Inc. power supply), and needle-collector distance was kept at 14 cm for PCL-Gel and PCL-Gel-BSS solutions, and 15 cm for PCL solution. After electrospinning, the electrospun fibers (membranes) were removed from the collector, double washed with ethanol (EtOH; 70%) and double distilled water (dd-H₂O), dried at RT, and sterilized under ultraviolet light for 20 min on each side. Membranes were labeled accordingly to their composition as described in table 1.

2.3. Physicochemical characterization

The as-received BSS powder was characterized by transmission electron microscopy (TEM; ARM200F) and high-angle annular dark-field scanning TEM (HAADF-STEM). A sample of the as-received BSS powder was dispersed in glacial AcAc, stirred for 48 h, dried at RT, and then, characterized by TEM and HAADF-STEM to evaluate the possible interactions between glacial AcAc and BSS that might have occurred during blending of the PCL-G-BSS electrospinning solutions, where glacial AcAc was used as solvent. Distances between atomic planes in HAADF-STEM were measured by obtaining the fast Fourier transform using the Digital Micrograph software (Gatan, Pleasanton, CA)

The micromorphology and elemental composition of the electrospun membranes were

characterized by SEM (SEM; JEOL-JSM-7600 F) at 10 kV and energy dispersive x-ray spectrometry (EDS, INCA Energy+, Oxford Instruments), respectively. Membranes samples were sputter coated with gold before SEM and EDS characterization. Average fibers' diameter and pore size in the membranes was estimated from SEM micrographs (AxioVision software; Carl Zeiss Microscopy). Incorporation and distribution of BSS into the PCL-G-BSS membranes was characterized by TEM. Membranes for TEM analysis were specifically electrospun for only 4 min (thin membranes) and carbon-coated. Elemental mapping of the membranes was performed by EDS-TEM (AZtecTEM Software, Oxford Instruments).

Chemical functional groups in the membranes and in pristine Gel were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR; Nicolet 380 FT-IR with attenuated total reflection). The BSS powder, as-received and after immersion in acetic acid (48 h in AcAc and dried at RT), was characterized by FTIR in transmission mode (Nicolet Nexus 670 FT-IR), using KBr pellets of the compounds.

FTIR spectra were acquired from 400 to 4000 cm^{-1} .

The atomic structure of the membranes and of the as-received BSS powder were determined by X-ray diffraction (XRD; Bruker D8 XRD diffractometer with $\text{CuK}\alpha$ radiation) in a 2θ configuration, with $2\theta = 3-$

70° . Degree of crystallinity of the membranes was calculated from XRD patterns as:

$$\chi_{\text{c(XRD)}} = \left(\frac{\text{Area of crystalline peaks(100 and 200)}}{\text{Total area of diffractogram}} \right)$$

Thermal properties of the membranes, pristine Gel, and pristine PCL were analyzed by Thermo-gravimetry (TGA; TGAQ5000 IR, TA Instruments) and differential scanning calorimetry (DSC; Q2000; TA Instruments) under nitrogen atmosphere. TGA measurements were performed by heating from RT to

700°C at a heating rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$. DSC measurements were acquired from -90°C to 150°C at a heating rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Quench-cooling was applied after the first heating scan; then, a second heating scan was performed to erase the thermal history, and it was used to estimate the real thermal response of the membranes. Crystallinity degree of PCL contained in

the membranes ($\chi_{\text{c(PCL)}}$) was calculated from DSC thermograms as:

$$\chi_{\text{c(PCL)}} = \left(\frac{\Delta H_{\text{m}}[\text{PCL}]}{\Delta H_{\text{m}}^0} \right) \times 100$$

where ΔH_{m} is the melting enthalpy per gram of PCL and ΔH_{m}^0 is the melting enthalpy of 100% crystalline PCL; $\Delta H_{\text{m}}^0 = 142.0 \text{ J g}^{-1}$ [47, 48]. PCL is the only component in the membranes that can develop a crystalline phase at the temperature range studied, since Gel is amorphous with no specific melting temperature associated to it, and BSS cannot experiment a phase-transition at the temperature range evaluated.

Data from TGA and DSC measurements were analyzed with the Universal Analysis® software.

Mechanical properties of the membranes in their dry and fully hydrated states were determined through mechanical uniaxial stress-strain tests, using a universal test machine (Shimadzu, AGS-X) with 100 N load cell, under a cross-head speed of 1 mm min^{-1} at ambient conditions ($\approx 23^\circ\text{C}$ and 56% of relative humidity). $25 \times 5 \text{ mm}^2$ specimens of each membrane, according to the ASTM D1708-06a test specimen size and shape, were analyzed. The elastic modulus (E), elongation at break (E) and maximum tensile strength (σ_{max}) were determined from the stress-strain curves. Measurements were performed by triplicate.

Water contact angles (WCA) on the membranes were measured via the static sessile drop method in an OCA 15EC goniometer (Dataphysics Company). WCA were continuously measured for 5 s after deposition of a $4 \mu\text{l}$ dd- H_2O drop on the surface of dry membrane samples. To exclude the water absorption effect, WCA were also measured on fully hydrated membrane samples. Biodegradation tests were performed in enzymatic solution at $\text{pH} = 7$ and 37°C intending to simulate physiological conditions.

For the enzymatic solution, 0.013 mg ml^{-1} lysozyme and 0.005 mg ml^{-1} lipase were dissolved in PBS, aiming to simulate enzymes concentrations in human serum [49]. Dry samples of the membranes were weighed (W_0) and independently incubated in enzymatic solution at 37°C and 120 rpm. The enzymatic solution was changed every week to simulate semi-static conditions. After 1, 3, 7, 14, 28 and 42 days, samples were collected, washed, dried and weighed again (W_1). Experiments were performed by triplicate. Weight loss in percentage (W_{loss}) was estimated as:

$$W_{\text{loss}} = \left(\frac{W_0 - W_1}{W_0} \right) \times 100$$

To evaluate the Bi release from the electrospun membranes, 1 cm in diameter circular samples of the membranes were individually incubated in 1 ml of supplemented DMEM-F12 at 37°C and 100 rpm for 7 days. Supernatants (incubation media) were collected at 1, 3 and 7 days and replenished with fresh cultured medium. Bi concentration in the collected supernatants was measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS; iCAP Qc, Thermo Scientific).

2.4. Antibacterial test

The antibacterial activity of the membranes added with BSS was studied by evaluating the effect of the lexiviated products of the membranes on the bacterial planktonic growth using the turbidity assay (planktonic growth inhibition; %), and measuring the quantity of bacterial DNA present in the supernatants

from bacterial incubation (with and without membranes). The inhibition percentage of the bacterial adhesion on the membranes (biofilm growth inhibition; %) was analyzed using the MTT viability assay. Besides, the agar disk-diffusion test was also used to determine the antimicrobial susceptibility of the bacterial strains tested against the PCL-G-BSS membranes.

Pure cultures of each bacterial strain were harvested on individual tubes containing enriched culture broth, and the optical density (OD) was adjusted to 1 at $\lambda = 600$ nm (BioPhotometer D30). Suspensions of 1×10^5 cells ml^{-1} of each aerobic bacteria and 1×10^6 cells ml^{-1} of each anaerobic bacteria were individually inoculated on membranes samples placed in 48-well culture plates, by triplicate. Samples were incubated at 35°C in an orbital shaker at 120 rpm in aerobic or anaerobic conditions, accordingly to the bacteria strain tested. Assays were performed after 1, 3 and 7 days of incubation for aerobic bacteria, and after 7 and 14 days of incubation for anaerobic bacteria.

The capability of the lixiviated products of the experimental membranes to inhibit the bacterial planktonic growth was estimated from the turbidity of the inoculated culture media at OD $\lambda = 595$ nm (filter max F5 multi-mode microplate reader). The planktonic growth inhibition (%) was calculated according to the following equation:

$$\text{Planktonic growth inhibition (\%)} = \frac{(\text{OD}_{B1} - \text{OD}_{B2}) - (\text{OD}_{A1} - \text{OD}_{A2})}{(\text{OD}_{B1} - \text{OD}_{B2})} \times 100$$

where OD_{A1} = absorbance of supernatants from bacterial incubation with the membranes, OD_{B1} = absorbance of supernatants from bacteria incubation with no membranes (negative control), OD_{A2} = absorbance of supernatants from membranes incubation with no bacteria, OD_{B2} = absorbance of culture media only.

The bacterial DNA was extracted directly from 1 ml of supernatants from bacterial incubation using the DNeasy Ultraclean Microbial Kit, following the manufacturer's protocol. Subsequently, the quantity of bacterial DNA was analyzed spectrophotometrically (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) per triplicate.

To assess the inhibition of the bacterial adhesion on the membranes, and consequently, the inhibition of biofilm growth, after bacterial incubation, membranes were washed once with fresh culture medium to detach loosely-attached bacteria, transferred to new culture plates, and incubated with MTT:culture media, 1:10, solution for 3 h at 35°C and 120 rpm. After incubation, formazan crystals, metabolized by viable bacterial cells adhered on the membranes, were solubilized and absorbance was read at OD

$\lambda = 570$ nm (Filter Max F5; Molecular Devices). Finally, the inhibition of biofilm growth (%) on the membranes was estimated as:

$$\text{Biofilm growth inhibition (\%)} = \frac{(\text{OD}_{B1} - \text{OD}_{B2}) - (\text{OD}_{A1} - \text{OD}_{A2})}{(\text{OD}_{B1} - \text{OD}_{B2})} \times 100;$$

where OD_{A1} = absorbance of solubilized formazan crystals from bacteria adhered on the membranes, OD_{B1} = absorbance of solubilized formazan crystals from viable bacteria adhered on PCL membranes (negative control), OD_{A2} = absorbance from membranes with no bacteria, and OD_{B2} = absorbance from PCL membranes with no bacteria.

For the agar diffusion method, suspensions of 1×10^8 cells ml^{-1} of pure cultures of aerobic or anaerobic bacteria were individually cultured on enriched agar plates. Circular (5 mm in diameter) membranes samples were placed on the agar plates after bacterial inoculation. PCL membranes samples with chlorhexidine at 0.2% were used as positive controls. The agar plates were incubated at 35°C under aerobic conditions for 24 h, or under anaerobic conditions for 7 days, depending on the bacterial strain.

2.5. Cytotoxicity test

Cytotoxicity of the membranes was tested by studying the effect of the lixiviated products from the membranes on the cell viability of hFOB and HGF-1 cells. Confluent cell cultures were treated with 0.05% trypsin-EDTA, collected by centrifugation, seeded at 5000 cells cm^{-2} on tissue culture 24-well plates and incubated at 37°C and 5% CO_2 with culture medium, that is, DMEM-F12 supplemented with 10% v/v FBS, and 3% v/v geneticin or 1% penicillin/streptomycin (0.25%) for hFOB or HGF-1, respectively. After 24 h of cell culture, sterile circular (6 mm in diameter) membranes samples were individually placed in hanging inserts on top of the wells where cells were seeded 24 h earlier (supplementary figure S1 (available online at stacks.iop.org/BMM/16/045036/mmedia)), and culture plates were restored in the incubator. After 1, 3, and 7 days of culture, from independent culture wells, hanging inserts with membranes samples were removed and cell viability was assessed by the MTT assay. For this, cells were incubated with MTT:DMEM-F12 (1:10) solution for 3 h at 37°C and 5% CO_2 . After incubation, cell-metabolized formazan crystals were solubilized in isopropanol:DMSO (1:1) solution and absorbance was read at $\lambda = 570$ nm (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader). Cell viability in percentage was estimated according to:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{ASA1} - \text{ASA2})}{(\text{ASB1} - \text{ASA2})} \times 100;$$

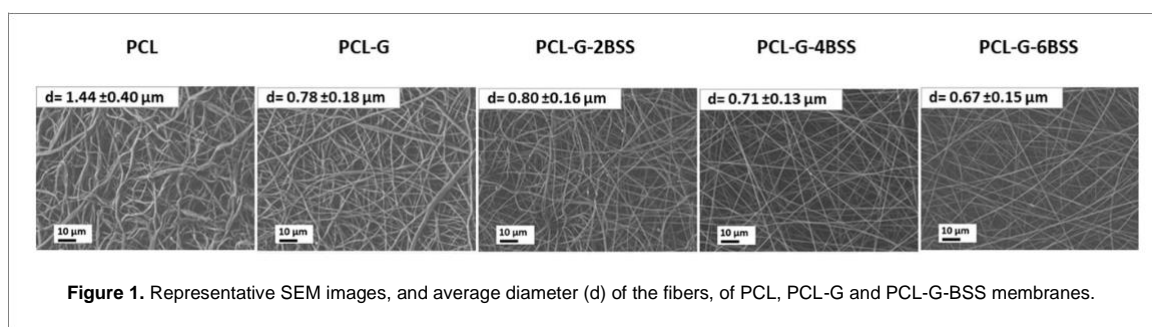


Figure 1. Representative SEM images, and average diameter (d) of the fibers, of PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes.

where, ASA_1 = absorbance of solubilized formazan crystals from cells cultured with the membranes lix-iviated products, ASB_1 = absorbance of solubilized formazan crystals from cells cultured with culture media only and no membranes, and ASA_2 = absorbance of isopropanol:DMSO, 1:1.

2.6. Statistical analysis

Biological experiments were conducted twice by triplicate; $n = 6$. Results are expressed as the mean \pm standard deviation. The statistical significance of the differences observed was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey *post hoc* test for multiple comparisons, a 5% significance level was used, $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Physical-chemical properties of the membranes

Macroscopically, the membranes were white, soft, flexible and with a thickness of ~ 0.4 mm (supplementary figure S2). In their microscopic structure, figure 1, the membranes exhibited randomly oriented fibers, where the homogeneity of the fibers' shape improved with Gel addition and BSS increasing concentration, exhibiting fibers with fewer defects (beads) for PCL-G and PCL-G-BSS, compared to PCL membrane. Fibers in PCL-G presented a straighter, less tangled arrangement than fibers in the PCL membrane, and this characteristic was further marked with BSS concentration increasing. The mean diameter (d) of the fibers decreased from $1.44 \mu\text{m}$ for PCL membrane to $0.78 \mu\text{m}$ for PCL-G, and it further decreased down to $0.67 \mu\text{m}$ as BSS concentration in the membranes increased; figure 1. On the other hand, the inter-fiber pore size increased from $68.8 \pm 34.7 \mu\text{m}^2$ (PCL membrane) to $101.8 \pm 47.26 \mu\text{m}^2$ with Gel addition (PCL-G membrane) as shown in table 2. Within BSS-containing membranes, the inter-fiber pore size tended to increase in correlation to BSS concentration; nevertheless, differences observed were not significant.

Representative TEM and HAADF-STEM micrographs of the BSS powder, as-received and after 48 h of immersion in AcAc, are shown in figure 2. The as-received BSS powder exhibited aggregates of large

Table 2. Inter fiber pore size of the membranes.

Membrane	Inter-fiber pore size (μm^2)
PCL	68.8 ± 34.7
PCL-G	101.8 ± 47.3
PCL-G-2BSS	96.6 ± 44.8
PCL-G-4BSS	121.7 ± 61.1
PCL-G-6BSS	136.3 ± 68.9

rod-like particles ($6\text{--}10 \mu\text{m}$) and small agglomerated needle-like particles (≈ 250 nm) that presented amorphous and crystalline structures, respectively (figure 2(A)). From the analysis of the HAADF-STEM high resolution images and the corresponding electron diffraction patterns (figure 2(B)), it is possible to say that the interplanar distances of the crystalline particles are similar to those reported for crystalline structures of bismuth organic complexes [50, 51]. After immersion in AcAc, the dried BSS powder showed the same kind of small needle-like crystalline particles (≈ 250 nm) as those observed for the as-received BSS powder, but the particles were smaller and better dispersed (figure 2(C)). The interplanar distance in these crystalline structures (figure 2(D)) also corresponded to the interplanar distances of bismuth organic complexes crystalline structures [50, 51]. FTIR spectroscopy exhibited the same IR bands for the BSS powder, as-received and after immersion in AcAc for 48 h, showing no traces of AcAc and no indications of chemical interaction between AcAc and BSS (supplementary figure 3).

Representative TEM micrographs (bright field) and TEM-EDS elemental mapping (dark field) micrographs of the membranes are shown in figure 3. Dark needle-like nanostructures embedded in the fibers can be observed from the bright field TEM micrographs of BSS-containing membranes. TEM-EDS elemental mapping revealed a homogenous distribution of Bi all over the fibers of the BSS-containing membranes with higher Bi concentration in the zones corresponding to where the bright NPs (dark field TEM micrographs) were observed in the fibers. Elemental analysis by EDS coupled to SEM, resumed in table 3, showed carbon ($\approx 54\text{--}68$ wt.%) and oxygen ($\approx 18\text{--}38$ wt.%) in all membranes. In addition, BSS-containing membranes exhibited Bi average concentrations that tended to increase with

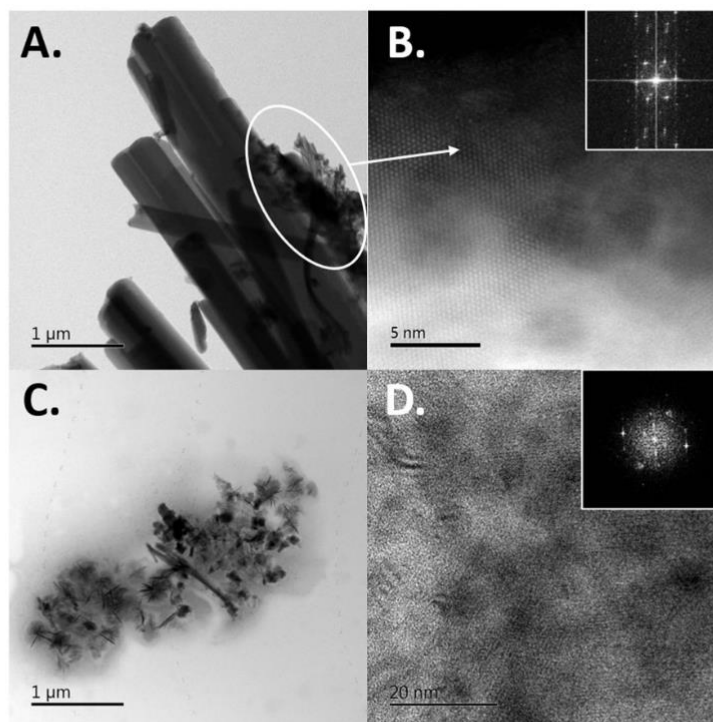


Figure 2. Representative bright field TEM micrographs of (A) as-received BSS powder showing aggregated particles formed by large amorphous rod-like particles and crystalline small structures, and its corresponding (B) high resolution TEM images and Fast Fourier Transform (FFT) analysis. Representative bright field TEM micrographs of (C) dry BSS powder after 48 h of immersion in acetic acid, showing small crystalline structures, and its corresponding (D) high resolution TEM images and FFT analysis.

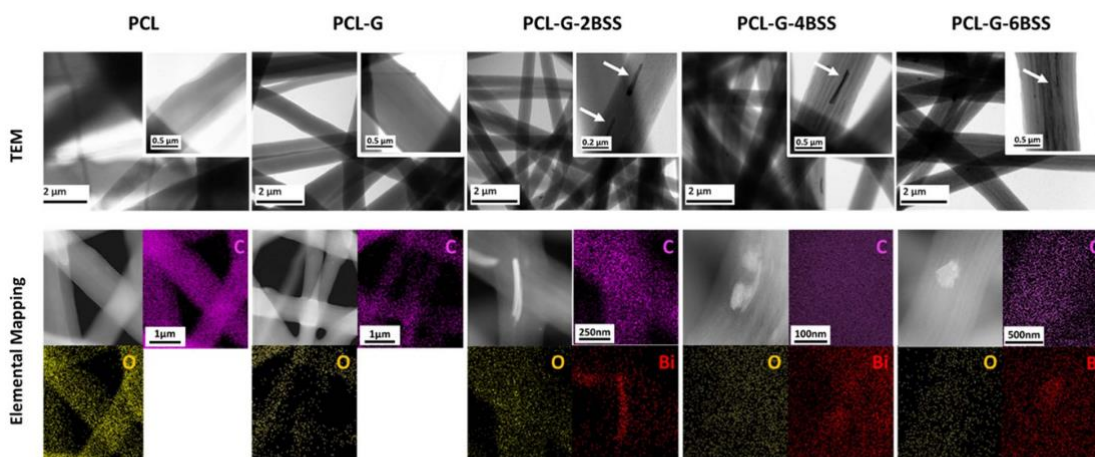


Figure 3. Representative, bright field transmission electron microscopy (TEM) images and TEM-EDS elemental mapping micrographs (dark field TEM images along with EDS elemental mapping of O; yellow, C; magenta and Bi; red) of PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes. White arrows in bright filed TEM micrographs point to Bi-containing particles observed embedded in the fibers of the membranes

the amount of BSS powder added to the electrospinning solutions from which the membranes were electrospun (table 3).

FTIR spectra of the membranes, the as-received BSS powder, and the pristine Gel are presented in figure 4. For PCL membrane, the main IR bands were observed at 2945 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$), 2859 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$), 1731 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), 1294 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-C}}$), 1240 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$), 1175 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{C-O-C}$) and

1045 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$), in agreement with the characteristic IR bands expected for PCL [52, 53]. Pristine Gel exhibited the characteristic IR bands of the amide I ($\nu_{\text{C=O}}$) and amide II ($\delta_{\text{N-H}}$) at 1651 cm^{-1} and 1538 cm^{-1} , respectively [52]. The PCL-G membrane exhibited the characteristic IR bands expected from its PCL and Gel components, and in addition, exhibited a broad band centered at 3296 cm^{-1} , that can be attributed to the overlapping of the

Table 3. Elemental composition by EDS (acquired during SEM studies) of the electrospun membranes.

Membrane	Elemental composition by EDS (wt.%)		
	C	O	Bi
PCL	61.4 ± 1.25	38.6 ± 1.25	—
PCL-G	67.45 ± 2.36	32.55 ± 4.21	—
PCL-G-2BSS	67.73 ± 4.12	21.23 ± 8.18	11.57 ± 5.53
PCL-G-4BSS	54.40 ± 7.34	23.21 ± 7.56	19.67 ± 5.83
PCL-G-6BSS	59.65 ± 4.29	17.77 ± 3.44	22.58 ± 4.21

O–H groups from PCL and the N–H groups from Gel [52]. This broadband was also observed for the BSS-containing membranes. FTIR spectra of the BSS-containing membranes exhibited clear bands corresponding to BSS located at 1600 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), 1420 cm^{-1} (νasCOO^-), and 864 cm^{-1} , 807 cm^{-1} , 704 cm^{-1} and 664 cm^{-1} (from Bi–O vibration) [54, 55].

XRD patterns of the as-received BSS powder, pristine Gel, and the membranes are presented in figure 5. No diffraction peaks were observed for pristine Gel since it is fully amorphous. The two characteristic diffraction peaks of the semi-crystalline PCL structure at $2\theta = 21.11^\circ$ and 23.99° , corresponding to the (110) and (200) planes, were observed in the diffraction patterns of all membranes [56]. However, the intensity of the 110 peak slightly decreased with Gel addition to the membranes (PCL-G), in comparison with PCL membrane. The intensity of the two diffraction peaks from semicrystalline PCL further decreased as BSS concentration in the membranes increased, while the amorphous component in the membranes increased as BSS concentration increased. No clear peaks corresponding to BSS (main peak expected at $2\theta = 5.3^\circ$ corresponding to the (001) plane) were observed in neither PCL-G-2BSS, PCL-G-4BSS or PCL-G-6BSS, probably due to the small amount of BSS in the membranes, and then, the peaks being easily overlapped by the broad amorphous component observed in the XRD patterns of the BSS-containing membranes. The crystallinity degree ($X_c(\text{XRD})$) of the membranes, as calculated from their XRD spectra, corresponded to 45.76%, 38.38%, 20.56%, 13.56% and 10.10% for PCL, PCL-G, PCL-G-2BSS, PCL-G-4BSS and PCL-G-6BSS, respectively, exhibiting a decrease in the overall $X_c(\text{XRD})$ of the membranes upon incorporation of Gel, and BSS concentration increasing.

Heating DSC scans of pristine Gel, pristine PCL, and PCL, PCL-G, and PCL-G-BSS membranes are presented in figure 6(A), while calorimetric properties are summarized in table 4. For pristine Gel no melting peak was observed in the heating scan, while a single endothermic peak was detected for pristine PCL, and PCL, PCL-G, and PCL-G-BSS membranes. This peak was attributed to the phase-transition point of the PCL at a melting temperature (T_m) of 55°C – 57°C . The melting enthalpy (ΔH_m) of

the PCL membrane (67 J g^{-1}) was larger than that of pristine PCL (56 J g^{-1}), while the ΔH_m of the PCL-G membrane (46 J g^{-1}) decreased in comparison to that of the PCL membrane (67 J g^{-1}). ΔH_m further decreased as the BSS concentration in the membranes increased (from $\Delta H_m = 39\text{ J g}^{-1}$ for PCL-G-2BSS to $\Delta H_m = 34\text{ J g}^{-1}$ for PCL-G-6BSS). This can be attributed to the PCL concentration in the membranes decreasing as the BSS concentration increased (table 1), influencing the overall crystallinity degree of the membranes, as the main crystalline contribution to the membranes corresponded to their PCL component. Nevertheless, the melting enthalpy per gram of PCL ($\Delta H_m[\text{PCL}]$) in the PCL-G-BSS membranes slightly increased (from 63 to 74 J g^{-1}) with the increment of BSS concentration. From these data, crystallinity degree of the PCL component in the membranes ($X_c(\text{PCL})$) resulted within 44% and 52%, similar to $X_c(\text{PCL})$ in the PCL membrane ($X_c(\text{PCL}) = 47\%$), which was slightly higher than $X_c(\text{PCL})$ of pristine PCL (39%).

TGA curves of pristine Gel, pristine PCL, and the PCL, PCL-G, and PCL-G-BSS membranes are shown in figure 6(B), whereas quantitative data are summarized in table 5. Pristine Gel showed an initial weight loss at 53°C – 170°C associated with evaporation of the water content, followed by a broad degradation step where two temperatures of maximum weight loss (T_{max}) can be identified at 289°C and 310°C . For pristine PCL and the PCL membrane, the main weight loss occurred in the temperature ranges of

303°C – 480°C with T_{max} of 390°C , and 291°C – 551°C with T_{max} of 389°C , respectively. The PCL-G and PCL-G-BSS membranes also exhibited an initial weight loss at 47°C – 53°C , due to evaporation of the water, mainly absorbed by the Gel component of the membranes. A second weight loss peak at

377°C – 386°C was observed for the PCL-G and PCL-G-BSS membranes, which can be attributed to their PCL component. Finally, a broad degradation step, with two weight loss peaks at 257°C – 282°C and at

302°C – 316°C , was observed for these membranes, corresponding to the degradation of their Gel component, the peaks intensities increased with BSS concentration.

Mechanical properties obtained from the stress-strain curves of the membranes (supplementary figure S4) in their dry and wet states are reported in table 6. In the dry state, Gel addition to the membranes (PCL-G) increased the elastic modulus (E); however, PCL-G membranes became brittle exhibiting a significantly smaller elongation at break (ϵ), in comparison with the PCL membrane. Upon addition of BSS, the E of the membranes was not significantly different from that of PCL-G; however, ϵ significantly decreased for PCL-G-2BSS ($\epsilon = 3.4 \pm 0.6\%$) and PCL-G-4BSS ($\epsilon = 24.8 \pm 13.9\%$), in comparison with PCL-G ($\epsilon = 81.6 \pm 25.7\%$). PCL-G-6BSS

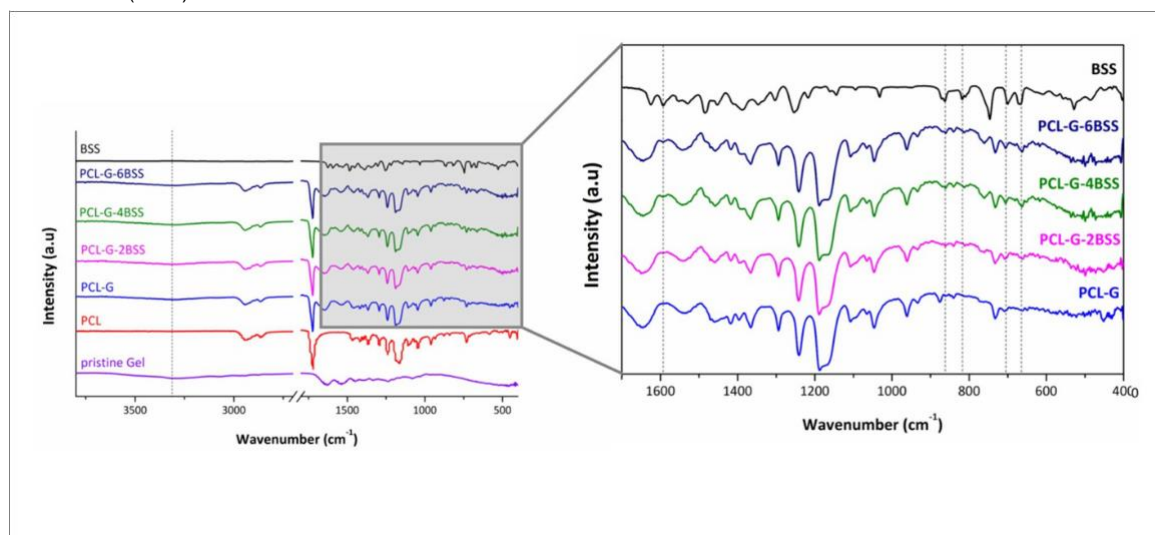


Figure 4. FTIR spectra of as-received BSS powder, pristine Gel, and PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes. Main IR bands associated to the presence of BSS in the membranes are marked with grey dotted lines.

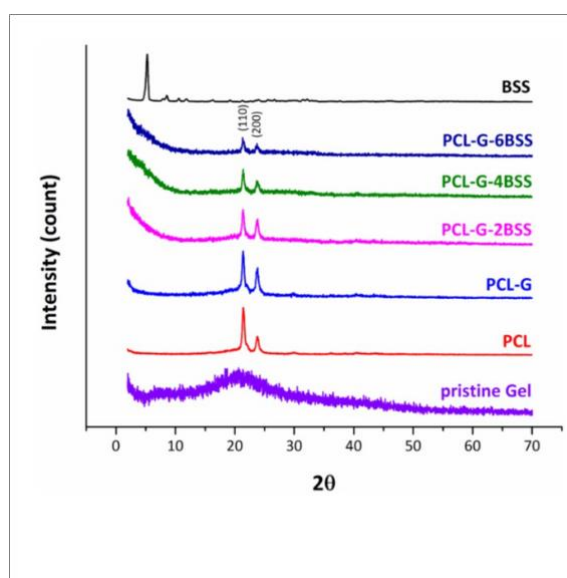


Figure 5. XRD patterns of the as-received BSS powder, pristine Gel, and PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes.

($\varepsilon = 92.9 \pm 35.6\%$) presented an ε value similar to that of PCL-G. The maximum tensile strength (σ_{\max}) was similar for all membranes in their dry state.

In their fully hydrated (wet) state of the membranes, E and σ_{\max} values of the membranes slightly increased with Gel addition (PCL-G), in comparison with the PCL membrane. Nevertheless, σ_{\max} slightly decreased with increasing BSS concentration for the PCL-G-BSS membranes, in comparison with PCL-G. On the other hand, ε significantly increased (a three-fold increment) for PCL-G, in comparison with the PCL membrane. With the addition of BSS, ε decreased for the smallest BSS concentration used in the membranes (PCL-G-2BSS; $\varepsilon = 75.3\%$), in comparison with PCL-G ($\varepsilon = 234.9\%$), and then,

ε increased again with BSS concentration increasing ($\varepsilon \approx 181\%$ for PCL-G-4BSS and PCL-G-6BSS). Nevertheless, ε of PCL-G-BSS membranes did not increase back to the same values observed for PCL-G ($\varepsilon = 234.9\%$), even for the highest BSS concentration used in the present study.

The WCA results in the dry and wet states of the membranes are shown in figure 7. In dry conditions, figure 7(A), all membranes, except for PCL-G, showed a hydrophobic character. WCA in the membranes dry state exhibited that the addition of BSS to the membranes significantly increased the WCA, in comparison to PCL-G, with all the BSS-containing membranes displaying a hydrophobic character in their dry state, similar to that of PCL membrane. In the wet (fully hydrated) state, figure 7(B), the BSS-containing membranes exhibited a hydrophilic character, contrarily to their dry state where they exhibited a hydrophobic character. WCA for PCL-G-2BSS and PCL-G-6BSS were similar to that of the PCL-G membrane over time; nevertheless, PCL-G-4BSS exhibited a lower WCA at all time points measured, in comparison with PCL-G, PCL-G-2BSS or PCL-G-6BSS. PCL and PCL-G membranes in wet state, exhibited a slightly lower WCA, in comparison to their corresponding WCA in their dry state, but PCL membrane still exhibited a hydrophobic character as in its dry state, whereas PCL-G exhibited a hydrophilic character in the wet and dry states.

Membrane samples were incubated in enzymatic solution at 37°C aiming to simulate the degradation process in physiological conditions. The weight loss over incubation time is shown in figure 8(A). The PCL membrane gradually degraded with a constant degradation rate over time to reach a maximum weight loss of $\approx 20\%$ after 45 d of immersion in enzymatic solution. On the other hand, the Gel-containing membranes showed the largest weight loss (17%–30%, depending on the BSS concentration) during the first 5 days of immersion. After that, the weight loss rate for the Gel-containing membranes slowed down, exhibiting an almost constant weight loss from day 14 of incubation up to 45 days of incubation.

The non-cumulative (over time) bismuth release from the membranes upon incubation in DME-F12 at 37°C is shown in figure 8(B). The main release of

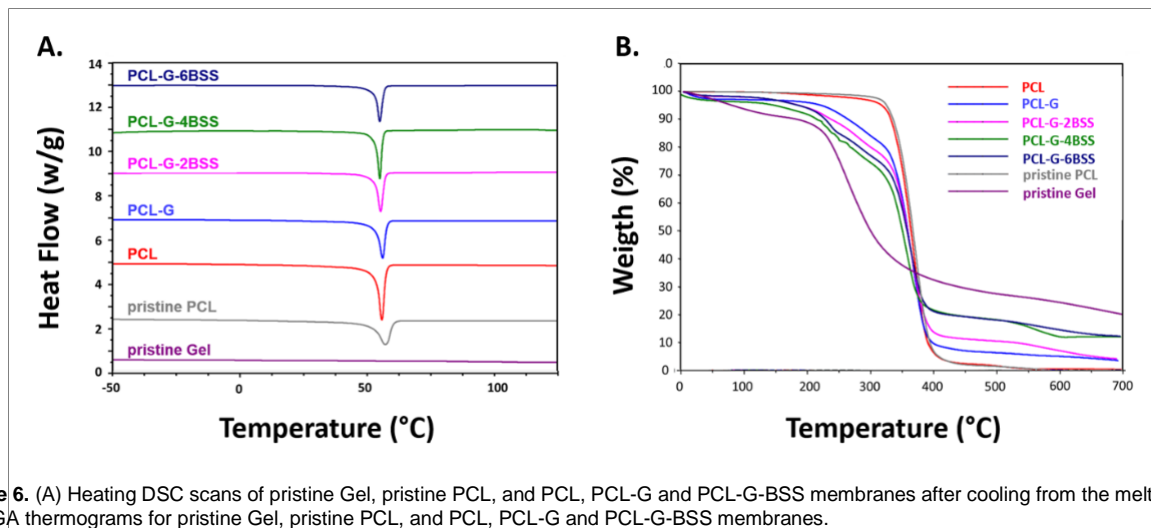


Figure 6. (A) Heating DSC scans of pristine Gel, pristine PCL, and PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes after cooling from the melt. (B) TGA thermograms for pristine Gel, pristine PCL, and PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes.

Table 4. Calorimetric properties of pristine PCL, and PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes.

Sample	T_m^a (°C)	ΔH_m^b (J g ⁻¹)	ΔH_m (PCL) ^c (J g ⁻¹)	χ_c (PCL) ^d (%)
Pristine Gel	—	—	—	—
Pristine PCL	57	56	56	39
PCL	56	67	67	47
PCL-G	56	46	66	46
PCL-G-2BSS	55	39	63	44
PCL-G-4BSS	55	38	70	49
PCL-G-6BSS	55	34	74	52

a Melting temperature;

b Melting enthalpy of samples;

c Melting enthalpy per gram of PCL in the samples;

d Degree of crystallinity of PCL in the samples, as calculated from ΔH_m (PCL).

Table 5. Thermogravimetric analysis of pristine Gel, pristine PCL, and PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes.

Sample	Main region of thermal decomposition			T_{max}^a (°C)		
	Temperature range (°C)	Weight loss (%)				
Pristine Gel	190–535	73	—	289	310	—
Pristine PCL	303–480	98	—	—	—	390
PCL	291–551	99	—	—	—	389
PCL-G	208–485	94	52	282	316	386
PCL-G-2BSS	150–475	89	53	257	306	383
PCL-G-4BSS	153–481	81	47	268	302	377
PCL-G-6BSS	144–477	81	52	263	309	383

a Temperatures of maximum weight loss rate observed for the different membranes.

Table 6. Mechanical parameters calculated from the strain–stress curves. Elastic modulus, E ; maximum tensile strength, σ_{max} ; elongation at break, ϵ .

Membrane	Dry			Wet		
	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ϵ (%)	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ϵ (%)
PCL	5.2±1.7	1.1±0.1	193.5±61.9	4.1±1.4	1.1±0.4	85.9±14.8
PCL-G	66.8±26.8	2±0.4	81.6±25.7	6.3±0.6	2±1.3	234.9±157.7
PCL-G-2BSS	82.3±4.4	1.6±0.1	3.4±0.6	4.4±1.1	2.6±0.3	75.3±7.4
PCL-G-4BSS	68.8±6.7	1.5±0.2	24.8±13.9	5.4±2.1	1.9±0.2	181.7±26.7
PCL-G-6BSS	75.1±3.1	1.9±0.2	92.9±35.6	4.7±0.3	1.2±0.2	181.9±59.2

bismuth was observed within the first 24 h of immersion in DMEM-F12, and after that a slow release of bismuth was observed. The largest release of Bi was observed from the membranes containing the largest amount of BSS.

3.2. Antibacterial activity of the membranes

The inhibition of the planktonic bacterial growth caused by the lixiviated products of the membranes was estimated by measuring the total bacterial DNA present on the supernatants from bacterial incubation

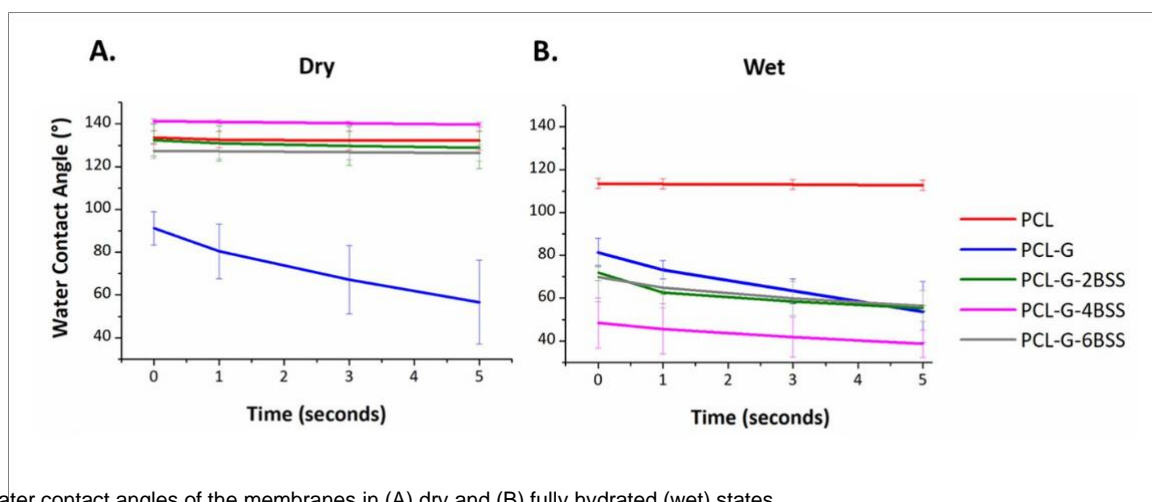


Figure 7. Water contact angles of the membranes in (A) dry and (B) fully hydrated (wet) states.

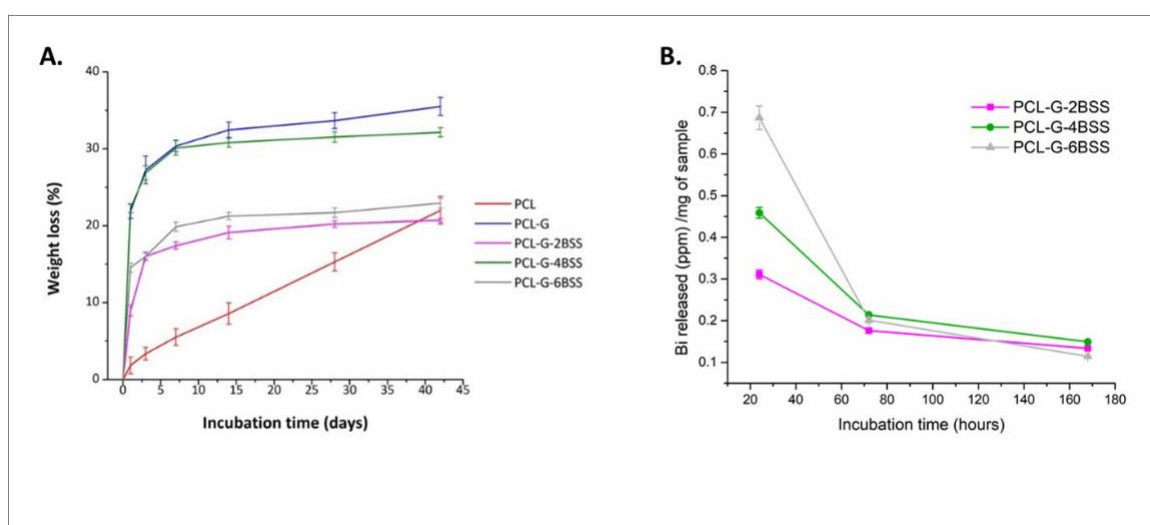


Figure 8. (A) Weight loss in percentage over time for PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes in enzymatic solution and (B) non-cumulative Bi release in ppm over time for PCL-G-BSS membranes in DMEM-F12.

and by the turbidity assay (figures 9(A) and (B)). In general, a decreased quantity of bacterial DNA was detected when bacteria were exposed to the BSS membranes at all incubation times, especially when the anaerobic strains were tested. No clear trend in the inhibitory effect respecting the BSS concentration in the membranes was observed for *S. aureus* and *P. gingivalis*. However, a trend to increase the inhibitory effect as BSS concentration in the membranes increase was observed for *E. coli* and *A. actinomycetemcomitans* serotype b (figure 9(A)). Similar results were obtained in the turbidity assay where the percentage of the planktonic growth inhibition was measured (figure 9(B)). After 7 days of incubation, the planktonic growth of *E. coli* was inhibited at 46.7%, 52.6%, and 41.6%, respectively, in the presence of PCL-G-2BSS, PCL-G-4BSS, and PCL-G-6BSS. While the inhibition of *S. aureus* was 40.6%, 26.1%, and 26.8%, respectively. For the anaerobic bacteria, the inhibition of the planktonic growth of *P. gingivalis* was higher when exposed to the PCL-G-4BSS membranes (75.1%) at 7 days of incubation, compared with the effect of the lixiviated products of

The other PCL-G-BSS membranes; nevertheless, the inhibition of the planktonic growth of *P. gingivalis* was higher when exposed to the PCL-G-6BSS membranes at 14 days of incubation, in comparison with the effect of the lixiviated products of the other PCL-G-BSS membranes. The PCL-G-BSS membranes significantly inhibited the planktonic growth of *A. actinomycetemcomitans* serotype b (53.8%, 82.4%, and 97.9%, respectively for PCL-G-2BSS, PCL-G-4BSS and PCL-G-6BSS) in a BSS concentration depending on manner.

The inhibition of the adhesion, that is, the inhibition of the biofilm growth, on the BSS-membranes is presented in figure 9(C). In general, the presence of the BSS showed an inhibitory effect of the adhesion, biofilm formation, for all bacterial strains; however, no clear correlation between the BSS concentration and the antibacterial effect was observed. After 7 days of incubation, only PCL-G-4BSS and PCL-G-6BSS membranes inhibited the biofilm growth of *E. coli* (50.1%, and 46.5%, respectively), while *S. aureus* seems to be more sensitive to BSS, since an inhibition percentage of 75.4%, 70.6%, and 70.7% was

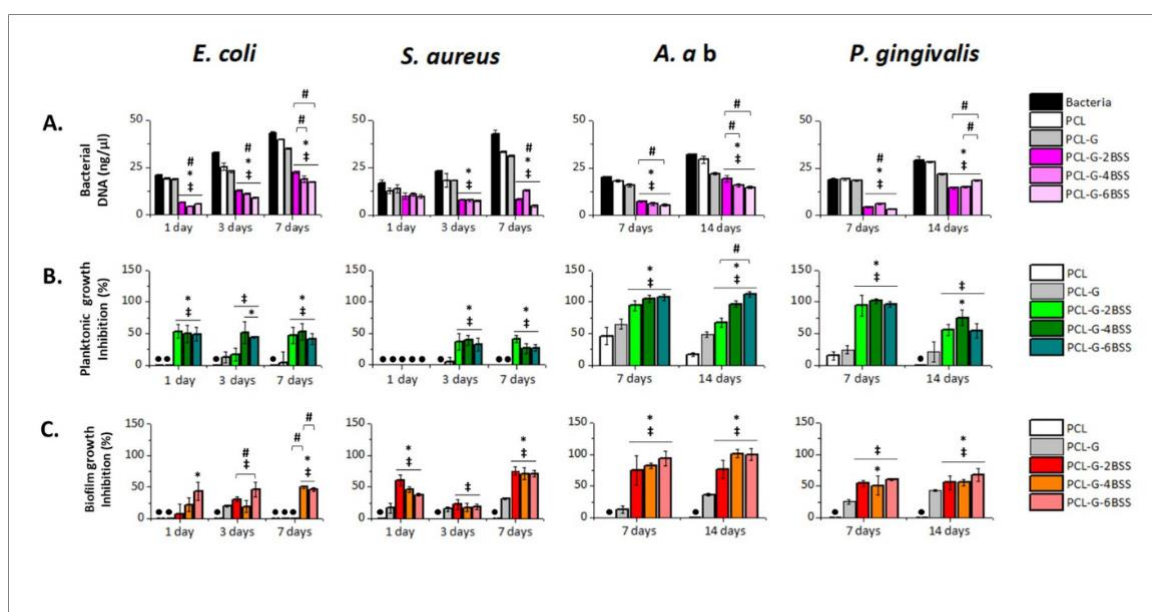


Figure 9. Antibacterial activity of the membranes against aerobic (*E. coli* and *S. aureus*), and anaerobic bacteria (*A. actinomycetemcomitans* serotype b (*A. a b*) and *P. gingivalis*) at different incubation times. (A) Total Bacterial DNA concentration ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) in the culture medium in the presence of the PCL, PCL-G, or PCL-G-BSS membranes. (B) Planktonic growth inhibition (%) in the presence of the PCL, PCL-G, or PCL-G-BSS membranes. (C) Biofilm growth (bacterial adhesion) inhibition on the PCL, PCL-G and PCL-G-BSS membranes. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test; ‡ $p < 0.05$ for PCL vs. PCL-G-BSS membranes; * $p < 0.05$ for PCL-G vs. PCL-G-BSS membranes; # $p < 0.05$ between membranes with different BSS concentrations. • No inhibition.

observed on PCL-G-2BSS, PCL-G-4BSS, and PCL-G-6BSS membranes, respectively. Regarding the anaerobic bacteria, BSS-membranes presented a higher antibacterial effect against the adhesion, biofilm formation, of *A. actinomycetemcomitans* serotype b than against *P. gingivalis*. After 14 days the inhibition of *P. gingivalis* was 55.3%, 55.7%, and 67.7%, respectively, whereas the inhibition of *A. actinomycetemcomitans* serotype b incubated with PCL-G-2BSS, PCL-G-4BSS, and PCL-G-6BSS was 76.1%, 100%, and 100%, respectively.

The results of the agar disk-diffusion tests are presented in figure 10. After bacterial incubation, a dark-colored zone around the BSS-containing membranes was observed on the agar. PCL and PCL-G membranes did not show antibacterial effect, contrary to the positive control that clearly showed an inhibition halo for all bacteria. The diameter of the inhibition halos formed in *E. coli* culture, ranged from 8 to 12 mm, which was correlated to the BSS concentration in the membranes. *P. gingivalis* was more sensitive to the BSS-membranes than *E. coli*, showing a larger diameter of the inhibition halo from 23 to 25 mm. Nevertheless, in this case, the inhibition halos diameter was not BSS concentration dependent. In the agar disk-diffusion test, the experimented membranes did not reveal an inhibitory effect against the growth of *S. aureus* and *A. actinomycetemcomitans* serotype b.

3.3. Cytotoxicity of membranes

Cytotoxicity of the membranes, estimated by the MTT assay in cells cultured in contact with the lixiviated products of the membranes, is shown in

Figure 11. The viability of hFOB cells (figure 11(A)) in contact with the lixiviated products of the membranes, showed no significant differences between the positive control (cells culture in fresh supplemented DMEM-F12) and cells exposed to the lixiviated products of the BSS-containing membranes, for a BSS concentration up to the maximum concentration studied in the present assay, PCL-G-6BSS, and for up to three days of incubation. At 7 days of incubation, hFOB cells in contact with the lixiviated products of PCL, PCL-G and BSS-containing membranes exhibited a slightly smaller cell viability in comparison to hFOB cells in the positive control. HGF-1 cells exposed to the lixiviated products of the BSS-containing membranes (figure 11(B)) showed a slight decrease in their viability at 1 and 3 days of incubation, and it was slightly correlated with the BSS concentration, and the BSS released from the membranes; nevertheless, cell viability was always larger than 75%. At 7 days of culture, HGF-1 cells exposed to the lixiviated products of the BSS-containing membranes exhibited a similar cell viability to that of HGF-1 exposed to the lixiviated products from PCL-G membranes.

4. Discussion

In the present study, fibrillar membranes of PCL-Gel loaded with different amounts of BSS were developed. BSS was used as an alternative, non-antibiotic, antibacterial compound, and the membranes were fabricated by electrospinning due to the well-known capability of this technique for producing composite polymer-based fibrillar structures advantageous

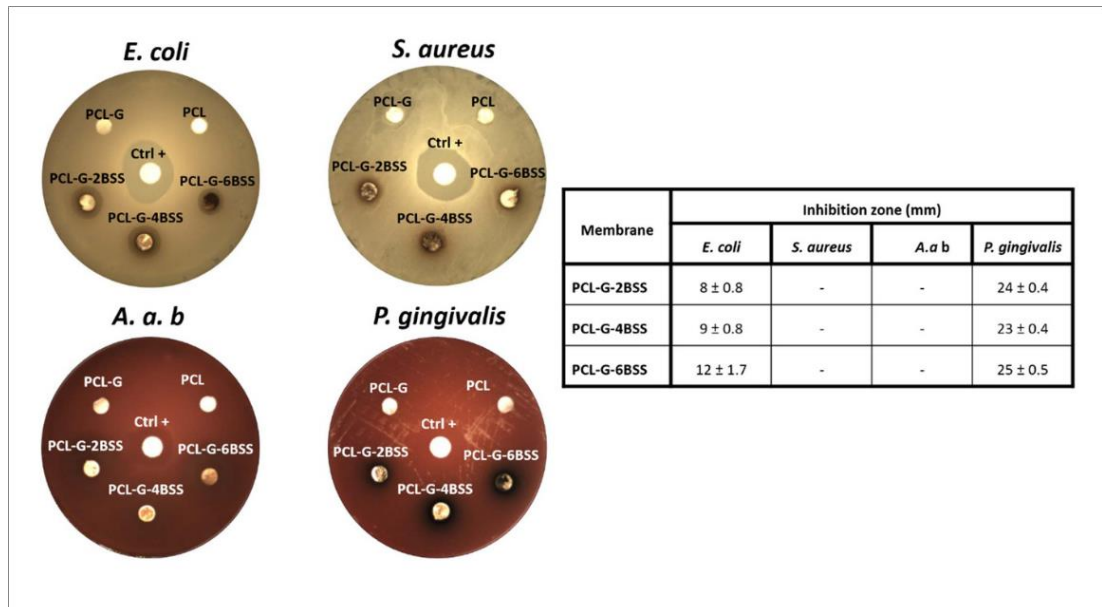


Figure 10. Antibacterial activity of the membranes in the agar disk-diffusion test. Bacterial growth inhibition halos are shown on the digital images of the agar plates, and their diameters are presented in the table. The values are presented as the mean ± SD ($n = 3$). A. a b; *A. actinomycetemcomitans* serotype b.

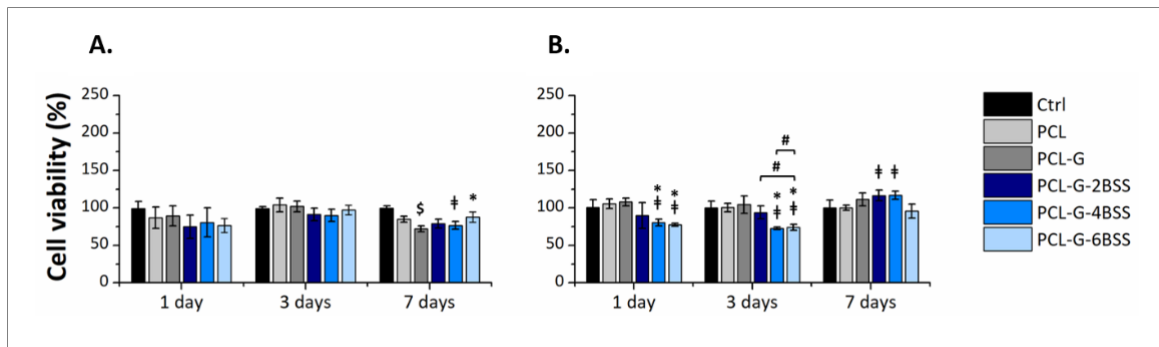


Figure 11. Viability of (A) human osteoblast (hFOB) and (B) human gingival fibroblasts (HGF-1) exposed to the lixiviated products of the membranes, after 1, 3 and 7 days of cells culture. Viability of cells in normal culture conditions (fresh complemented DMEM-F12 culture media) was considered as 100%. \$, $p < 0.05$, for PCL vs. PCL-G membranes; #, $p < 0.05$, for PCL-G-BSS membranes vs. PCL membrane, at same days of incubation; *, $p < 0.05$, for PCL-G-BSS membranes vs. PCL-G membrane at same days of incubation; #, $p < 0.05$ between membranes with different BSS concentration at same days of incubation.

for different tissue-engineering applications [57]. Particularly, for GTR treatment, electrospun membranes added with antibacterial agents might provide an effective, non-cytotoxic barrier function to control gingival tissue invasion into the periodontal defect, and antibacterial activity for preventing bacterial colonization.

Previous studies demonstrated that the use of AcAc as solvent for PCL-Gel electrospinning solutions improves their miscibility [21, 22]. This was corroborated in the present study by the FTIR spectra of PCL-G and PCL-G-BSS membranes exhibiting a broad band at 3296 cm^{-1} that suggested the formation of hydrogen bonds between the O-H and N-H groups of PCL and Gel, respectively [24, 52, 58]. On the other hand, the possible interaction of BSS with AcAc during blending of the electrospinning solutions was evaluated by FTIR, and TEM and HAADF-STEM, where both techniques suggested

that no chemical interaction occurred between BSS and AcAc. In the same sense, no evidence of BSS degradation by AcAc was observed, but only the dissolution and dispersion of the BSS powder into smaller crystalline BSS particles, in comparison with the particles observed for the as-received BSS powder. This is in agreement with previous reports evidencing the dissolution, but no degradation, and later precipitation, of bismuth salicylates from mineral acid solutions [54].

The addition of Gel to the membranes reduced the mean fiber diameter, in comparison with PCL membrane, which can be explained by the protonated amino groups in Gel solution at acid pH increasing the charge density of the solution and creating larger elongation forces during the electrospinning process, which resulted in more elongated fibers [52]. The addition of BSS did not significantly alter the diameter of the fibers in the membranes, when

compared with PCL-G. Nevertheless, BSS-containing membranes exhibited thinner and smoother fibers, even when differences in fiber diameter were not statistically significant, as BSS concentration increased. This possibly led to an increment in the inter-fiber pore size in the membranes as BSS increased. These changes might be produced by an increase in the charge density and conductivity of the electrospinning solutions in the presence of ionized BSS [59, 60]. Another possible explanation for the increment in the inter-fiber pore size in the BSS-containing membranes is the charge-charge repulsion between fibers when they were deposited on the collector during electrospinning. As the charge density of the PCL-Gel-BSS solutions was higher than that of the PCL-Gel solution, due to the ionized BSS particles, the generated charge-charge electrostatic repulsion between the charged surface of the fibers was also higher, facilitating their separation and increasing the inter-fiber pore size of the BSS-containing membranes, in comparison with PCL-G. The inherent porous structure of the BSS-containing membranes (inter-fiber pore diameter $\approx 93\text{--}136 \pm 60 \mu\text{m}^2$) can be advantageous to facilitate exchange of cellular nutrients and wastes, but smaller enough to prevent cellular crossing from side to side of the membranes. The inter-crossing of the fibers at the different depth levels of the membranes decreased the pore diameter of the interconnected pores across the thickness of the membranes, being this smaller enough to prevent tissue infiltration from one side of the membrane to the other [61]. According to Vaquette *et al* [62] a pore size of $\approx 220 \pm 144 \mu\text{m}$ in PCL based GTR-intended membranes would allow fully infiltration by cells and extracellular matrix. Additionally, the thickness ($\approx 340 \mu\text{m}$) of the experimental membranes developed in the present work is appropriate to provide a suitable space in which regeneration of tissue can take place, similar to the commercial membranes with thickness around 200–400 μm [63].

Successful incorporation of BSS into the membranes was confirmed by TEM, SEM and EDS. Bi average wt.% in the membranes increased as BSS concentration in the electrospinning solutions increased; however, Bi wt.% increment was not significant between PCL-G-4BSS and PCL-G-6BSS. This might be explained by a reduced dispersion of the BSS in the electrospinning solution as BSS concentration increased, leading to a faster BSS precipitation during the static (no stirring) electrospinning process, and finally resulting in a less efficient incorporation and dispersion of BSS into the electrospun membranes. Similar phenomena have been observed for electrospinning solutions when concentration of non-soluble components increases [24]. Bi concentration increased in the zones where BSS particles were observed embedded in the fibers; although, in general, an overall homogeneous distribution of Bi was observed in the fibers, over the whole membranes.

This suggests that BSS dissolution during blending of AcAc-PCL-Gel-BSS electrospinning solutions facilitated the homogeneous dispersion of BSS and its consequent homogeneous distribution in the electrospun membranes. As determined by TGA analysis, incorporation of BSS slightly decreased the thermal stability of the BSS-containing membranes in comparison with PCL-G. Probably, because the homogeneously embedded BSS microparticles in the fibers induced the breaking of some polymer chains of PCL and/or Gel, and consequently, those fragments degraded at lower temperatures [64]. Besides, the DCS and the XRD analyses suggested that the overall crystallinity of the membranes decreased with the addition of the amorphous Gel component to the membranes and further decreased with the addition of BSS. This probably resulted from the decrement of the concentration of the semi-crystalline PCL component in the membranes as the BSS concentration increased and not from the decrement of the crystallinity degree of the semi-crystalline PCL component in the membranes. Furthermore, the melting enthalpy per gram of PCL present in each membrane ($\Delta H_m[\text{PCL}]$) indicated that BSS did not restrict PCL chains mobility and its ability for crystallization remained unaltered. Nevertheless, the PCL membrane exhibited an 8% larger crystallinity than pristine PCL. Likely, because the acidity of the PCL electrospinning solution increased the number of polymeric chains terminal O–H groups due to a slight degradation, mainly in the amorphous region of the PCL [65], favoring the formation of hydrogen bonds between molecular chains oriented by the elongation forces during electrospinning, producing further crystallization of the PCL in the membranes, in comparison with pristine PCL [66].

In clinical settings, GTR membranes are required to have sufficient mechanical properties to maintain structural integrity during periodontal procedures and continuous mechanical disturbance during daily oral activities [5]. According to the mechanical properties obtained, the PCL-G-BSS membranes exhibited higher flexibility under dry ($E = 75\text{--}82 \text{ MPa}$) and wet ($E = 5\text{--}4 \text{ MPa}$) conditions than other resorbable, natural polymers-derived, commercial membranes ($E = 90\text{--}700 \text{ MPa}$) [67]. Nonetheless, the tensile strength of the BSS-containing membranes under dry and wet conditions ($\sigma_{\text{max}} = 1\text{--}3 \text{ MPa}$) was lower than that of the commercially available collagen membranes ($\sigma_{\text{max}} = 5\text{--}22 \text{ MPa}$); this should be considered when the membranes are immobilized into the defect site. In general, the BSS-membranes demonstrated higher elongation at break in dry ($\epsilon = 3\%\text{--}93\%$) and wet ($\epsilon = 75\%\text{--}182\%$) conditions, when compared to commercial collagen membranes ($\epsilon = 6\%\text{--}8\%$), conferring them an increased plasticity, which is essential during GTR treatment [67, 68]. The higher elongation at break, with smaller E values, for the present

Gel-containing membranes in their wet state, in comparison with their dry state, can be explained by the properties of gelatin, which can absorb large amounts of water, and then, presents brittle properties in its dry state but highly plastic properties in its wet state [23, 24].

Furthermore, wettability is a relevant property to enhance the success of GTR treatment, where hydrophobic membranes are expected to properly function as barrier membranes [69]. The present WCA results showed that integration of Gel to the membranes induced a hydrophilic surface in PCL-G membrane in both dry and wet (after full hydration) conditions. However, upon BSS incorporation, the membranes displayed a hydrophilic behavior in wet conditions but a hydrophobic surface in the dry state. The non-soluble in aqueous media (poor water interaction) BSS particles contained in the PCL-G-BSS membranes can explain their hydrophobic character in the dry state [70]. Also, the possible ionization of BSS in the membranes might reduce the surface energy and consequently their positive interaction with water, resulting in a hydrophobic character [71]. Whereas once full hydration of the membranes has been allowed (mainly by water penetrating and filling the porous of the fibrillar membranes, in a probably Gel-favored but time-wise longer phenomenon), then, a hydrophilic character is displayed by the PCL-G-BSS membranes, maybe due to water–water and water–Gel interactions dominating in the wet state of the PCL-G-BSS membranes.

The biodegradation rate is another factor that determines the efficiency of GTR periodontal membranes, which are expected to function as barriers for at least 6 weeks to promote total regeneration of periodontal tissues [72]. Fast degradation causes a premature collapse of the membranes [17]. In this study, the initial degradation rate of PCL-G-BSS membranes during the first week of immersion in enzymatic solution at 37 °C can be explained by the rapid solubilization of the Gel contained in the membranes. However, the addition of BSS, an insoluble salt, decreased this initial rapid degradation rate, in comparison with PCL-G membrane. The initial degradation rate of the membranes modulated by BSS can be advantageous because *in vivo* degradation during the first 4–6 weeks after membrane immobilization can be expected to be slower than that of collagen-based membranes but not as slow as that of PCL. Even more, Gel dissolution into the defect site during the first week within membrane immobilization might enhance tissue regeneration, allowing the membrane to properly function as a barrier, but also contributing to enhance the regeneration process [61, 73, 74].

Release of bismuth is also an important property highly related, and beneficial, to the potential of the membranes to inhibit planktonic and biofilm growth of bacteria. Nevertheless, Bi release might also

be related to a potential cytotoxicity of the bismuth-containing membranes. For the present membranes, a burst release of Bi upon the first 24 h of incubation in DMEM-F12 was observed. This might be related to the faster degradation of the membranes occurring upon the first days of immersion in aqueous media due to solubilization of the Gel contained in the membranes. For longer periods of immersion, a smaller, more controlled and sustained release of Bi was observed over time.

BSS has demonstrated high effectiveness against several microorganisms [42, 70, 75]. Thus, in this study, we developed electrospun PCL-Gel membranes loaded with different concentrations of BSS, which evidenced their antibacterial effectiveness when compared with the PCL and PCL-G membranes without BSS. Furthermore, the BSS-membranes demonstrated antibacterial capacity against four bacterial strains (*E. coli*, *S. aureus*, *A. actinomycetemcomitans* serotype b, and *P. gingivalis*). Among them, the periodontal pathogen *P. gingivalis* (Gram-negative) was the most sensitive to the BSS-membranes, while the opportunistic pathogen *S. aureus* (Gram-positive) showed the least sensitivity to the exposure of BSS, according to the agar-disk diffusion test.

The sustained inhibition of planktonic bacterial growth (measured by the bacterial DNA quantification and the turbidity assay) could be due to the release of BSS particles or Bi^{3+} ions from the PCL-G membranes as a result of the biodegradation process of the membranes under the incubation conditions, as it was observed from the ICP results. This Bi^{3+} ions can bind on the F1 subunit of the ATP synthase, reducing bacterial metabolism [76, 77]. Although the BSS mechanism of action has not been fully understood [42], it is known that BSS can react with the sulfur source of bacteria (cysteine for the aerobic and H_2S for the anaerobic bacteria) by hydrolysis in an acidic environment [78], producing bismuth salts (BiOCl and Bi_2S_3), bismuth ions (Bi^{3+}) and sodium salicylate [70, 79, 80], which, at sufficient concentrations, can achieve an antimicrobial effect [41, 70, 75].

While the effectiveness of the BSS-membranes to reduce the biofilm growth (MTT assay) may be due to the production of some transitory bismuth thiols by the BSS breakdown, that can inhibit the biofilm development on the membranes through the irruption of the wall polysaccharide O-acetylation mechanism, which is critical to provide the physicochemical properties to the extracellular matrix [81–83]. The antibacterial effect of the experimental membranes was not always correlated with the BSS concentration, although the ICP showed that Bi release was congruent with both the BSS concentration in the membranes and the immersion time. A plausible explanation may be the distribution of the BSS on the membrane's surface, which is controlled by features in the electrospinning process such as the

viscosity or conductivity of the solution, or the surface tension of the BSS-containing membranes [84]. Additionally, the intrinsic susceptibility of each microorganism to different antibacterial agents [85, 86] should also be considered. For example, the anti-microbial potential of BSS-membranes against *E. coli* and *P. gingivalis* (but not against *S. aureus* and *A. actinomycetemcomitans* serotype b) in the agar disk diffusion test suggests that Gram-negative bacteria are possibly more susceptible to BSS than Gram-positive bacteria such as *S. aureus*. A basic explanation for these results could be related to the bacterial cell-envelope structure [87]. Gram-negative bacteria have a thin peptidoglycan layer surrounded by an inner membrane and an outer membrane, forming the periplasmic space, while Gram-positive bacteria possess a thick cell wall consisting of peptidoglycan and teichoic acid layers anchored on the cytoplasmic

membrane, which could confer additional protection against BSS.

Regarding the dark-color around the BSS-membranes on the agar plates, this phenomena can be related to the reaction of the BSS particles with the Cysteine produced by the aerobic bacteria, or with the sulfur source (H_2S) of anaerobic bacteria, producing Bi_2S_3 , a highly insoluble black salt [38, 42], which suggests that the BSS particles in the membranes were released in the agar medium.

The primary role of GTR membranes is to perform as a biocompatible barrier to prevent the ingrowth of epithelial cells into the periodontal defect allowing the proliferation of periodontal cells such as bone, without invasion of epithelial cells, and consequently, the appropriate regeneration of the periodontal tissues [5]. The no-cytotoxicity or capacity to allow cell viability in presence of the PCL-G-BSS membranes was confirmed by using hFOB and HGF-1 cells. Adequate viability and proliferation (in comparison to the positive control) of hFOB and HGF-1 cells was observed after exposure of the cells to the leached products from the PCL-G-BSS membranes at all the BSS concentrations studied. Confirming, that the Bi release from the membranes, as it was observed by ICP, did not caused a cytotoxic effect on the cells, in agreement with the previously reported biocompatibility of BSS by *in vivo* and *in vitro* studies [40, 70, 88]. Other reports have also indicated that BSS might increase the intracellular Ca^{2+} activating the MAP-kinase-dependent pathway promoting the regulation of cell proliferation [88].

5. Conclusions

Fibrillar, composite, antibacterial membranes were successfully generated through electrospinning using PCL and Gel as the base structural components of the membranes, and BSS as a safe, alternative, non-antibiotic, antibacterial component. These novel antibacterial PCL-G-BSS electrospun membranes,

mainly PCL-G-4BSS, showed the potential to be used, for clinical management and application, as barrier membranes for GTR periodontal treatment, due to their biodegradation rate, mechanical properties, no-cytotoxicity to human gingival fibroblasts and osteo-blasts, and their capability to reduce bacterial colon-ization of Gram-positive and Gram-negative bacteria strains.

Data availability statement

All data that support the findings of this study are included within the article (and any supplementary files).

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical support of Romero-Ibarra J E (TEM), Novelo-Peralta O (SEM), Tejeda-Cruz A (XRD), Reyes-Morales K E (Thermal properties), Garcia-López, F (ICP-MS) and Hernández-Mecinas E (Mechanical properties) from the Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors also acknowledge the technical support of Flores-Flores J O (FT-IR) from the Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, LUCE_ICAT_UNAM. The laboratory technical support from Guerrero-Alva X from the Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra and Cruz-Fonseca M L from the Facultad de Odontología, DEPeI, UNAM, are also acknowledged. The student Vidal-Gutiérrez X acknowledges the support from the program Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud at the Universidad Nacional Autónoma de México and their PhD scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (CVU: 630160). G Prado-Prone acknowledges the postdoctoral fellowship (POSDOC program) provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM). This study was supported by CONACyT FC-1740, CONACyT CB-2016-01 288101 and DGAPA-PAPIIT IT200319 grants.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

ORCID iDs

Ximena Vidal-Gutiérrez <https://orcid.org/0000-0002-3399-166X>

Gina Prado-Prone <https://orcid.org/0000-0002-2808-9444>

Sandra E Rodil <https://orcid.org/0000-0002-0275-4418>

Cristina Velasquillo <https://orcid.org/0000-0002-0135-5386>

Phaedra Silva-Bermudez
<https://orcid.org/0000-0001-6830-3321>
 Argelia Almaguer-Flores
<https://orcid.org/0000-0003-0014-9772>

References

- [1] Kinane D F, Stathopoulou P G and Papapanou P N 2017 Periodontal diseases *Nat. Rev. Dis. Primers* **3** 17038
- [2] Caton J G, Armitage G, Berglundh T, Chapple I L C, Jepsen S, Kornman K S, Mealey B L, Papapanou P N, Sanz M and Tonetti M S 2018 A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—introduction and key changes from the 1999 classification *J. Clin. Periodontol.* **45** S1–S8
- [3] Papapanou P N et al 2018 Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions *J. Clin. Periodontol.* **45** S162–70
- [4] Alshams M, Othman M, Haddad I and Abou Sulaiman A 2019 Evaluating the effects of non-surgical periodontal treatment on masticatory function in patients with aggressive periodontitis: a preliminary study *J. Clin. Diagn. Res.* **13** ZC14–ZC6
- [5] Bottino M C, Thomas V, Schmidt G, Vohra Y K, Chu T-M G, Kowolik M J and Janowski G M 2012 Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—a materials perspective *Dent. Mater.* **28** 703–21
- [6] Danesh-Meyer M J and Wikesjo U M E 2001 Gingival recession defects and guided tissue regeneration: a review *J. Periodont. Res.* **36** 341–54
- [7] Dimitriou R, Mataliotakis G I, Calori G M and Giannoudis P V 2012 The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence *BMC Med.* **10** 81
- [8] Ling L-J, Hung S-L, Lee C-F, Chen Y-T and Wu K-M 2003 The influence of membrane exposure on the outcomes of guided tissue regeneration: clinical and microbiological aspects *J. Periodont. Res.* **38** 57–63
- [9] Selvig K A, Nilveus R E, Fitzmorris L, Kersten B and Khorsandi S S 1990 Scanning electron microscopic observations of cell population and bacterial contamination of membranes used for guided periodontal tissue regeneration in humans *J. Periodontol.* **61** 515–20
- [10] Machtei E E 2001 The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis *J. Periodontol.* **72** 512–6
- [11] Chen D W-C, Lee F-Y, Liao J-Y, Liu S-J, Hsiao C-Y and Chen J-K 2013 Preclinical experiments on the release behavior of biodegradable nanofibrous multipharmaceutical membranes in a model of four-wall intrabony defect *Antimicrob. Agents Chemother.* **57** 9–14
- [12] Chen X B, Xu C and He H 2019 Electrospinning of silica nanoparticles-entrapped nanofibers for sustained gentamicin release *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **516** 1085–9
- [13] Hurt A P, Kotha A K, Trivedi V and Coleman N J 2015 Bioactivity, biocompatibility and antimicrobial properties of a chitosan-mineral composite for periodontal tissue regeneration *Polimeros* **25** 311–6
- [14] Larsson L, Decker A M, Nibali L, Pilipchuk S P, Berglundh T and Giannobile W V 2016 Regenerative medicine for periodontal and peri-implant diseases *J. Dent. Res.* **95** 255–66
- [15] Sallum E A, Ribeiro F V, Ruiz K S and Sallum A W 2019 Experimental and clinical studies on regenerative periodontal therapy *Periodontology 2000* **79** 22–55
- [16] Soldatos N K, Stylianou P, Koidou V P, Angelov N, Yukna R and Romanos G E 2017 Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration *Quintessence Int.* **48** 131–47
- [17] Florjanski W, Orzeszek S, Olchow A, Grychowska N, Wieckiewicz W, Malysa A, Smardz J and Wieckiewicz M 2019 Modifications of polymeric membranes used in guided tissue and bone regeneration *Polymers* **11** 5
- [18] Tan G Z and Zhou Y 2020 Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **69** 947–60
- [19] Meireles A B, Corrêa D K, Da Silveira J V, Mill'as A L, Bittencourt E, De Brito-melo G E and Gonz'alez-Torres L A 2018 Trends in polymeric electrospun fibers and their use as oral biomaterials *Exp. Biol. Med.* **243** 665–76
- [20] Abedalwafa M, Wang F J, Wang L and Li C J 2013 Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review *Rev. Adv. Mater. Sci.* **34** 123–40
- [21] Mochane M J, Motsoeneng T S, Sadiku E R, Mokhena T C and Sefadi J S 2019 Morphology and properties of electrospun PCL and its composites for medical applications: a mini review *Appl. Sci.* **9** 11
- [22] Gomez-Guillen M C, Gimenez B, Lopez-Caballero M E and Montero M P 2011 Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review *Food Hydrocoll.* **25** 1813–27
- [23] Prado-Prone G, Silva-Bermudez P, Bazzar M, Focarete M L, Rodil S E, Vidal-Gutiérrez X, García-Macedo J A, García-Pérez V I, Velasquillo C and Almaguer-Flores A 2020 Antibacterial composite membranes of polycaprolactone/gelatin loaded with zinc oxide nanoparticles for guided tissue regeneration *Biomed. Mater.* **15** 15
- [24] Prado-Prone G, Bazzar M, Focarete M L, Garcia-Macedo J A, Perez-Orive J, Ibarra C, Velasquillo C and Silva-Bermudez P 2020 Single-step, acid-based fabrication of homogeneous gelatin-polycaprolactone fibrillar scaffolds intended for skin tissue engineering *Biomed. Mater.* **15** 23
- [25] Hwang P T J, Murdock K, Alexander G C, Salaam A D, Ng J I, Lim D-J, Dean D and Jun H-W 2016 Poly(epsilon-caprolactone)/gelatin composite electrospun scaffolds with porous crater-like structures for tissue engineering *J. Biomed. Mater. Res. A* **104** 1017–29
- [26] Hu Y, Feng B, Zhang W J, Yan C X, Yao Q K, Shao C Y, Yu F, Li F and Fu Y 2019 Electrospun gelatin/PCL and collagen/PCL scaffolds for modulating responses of bone marrow endothelial progenitor cells. *Exp. Ther. Med.* **17** 3717–26
- [27] Xue J J, He M, Liu H, Niu Y Z, Crawford A, Coates P D, Chen D, Shi R and Zhang L 2014 Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes *Biomaterials* **35** 9395–405
- [28] Xue J J, He M, Liang Y Z, Crawford A, Coates P, Chen D F, Shi R and Zhang L 2014 Fabrication and evaluation of electrospun PCL–gelatin micro-/nanofiber membranes for anti-infective GTR implants *J. Mater. Chem. B* **2** 6867–77
- [29] Rather H A, Thakore R, Singh R, Jhala D, Singh S and Vasita R 2018 Antioxidative study of cerium oxide nanoparticle functionalised PCL-gelatin electrospun fibers for wound healing application *Bioact. Mater.* **3** 201–11
- [30] Ausenda F, Rasperini G, Acunzo R, Gorbunkova A and Pagni G 2019 New perspectives in the use of biomaterials for periodontal regeneration *Materials* **12** 13
- [31] Campoccia D, Montanaro L and Arciola C R 2013 A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces *Biomaterials* **34** 8018–29
- [32] Rai M, Ingle A P, Gupta I and Brandelli A 2015 Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery *Int. J. Pharm.* **496** 159–72

- [33] Vimbela G V, Ngo S M, Fraze C, Yang L and Stout D A 2017 Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials *Int. J. Nanomed.* **12** 3941–65
- [34] Jin S, Li J D, Wang J, Jiang J X, Zuo Y, Li Y B and Yang F 2018 Electrospun silver ion-loaded calcium phosphate/chitosan antibacterial composite fibrous membranes for guided bone regeneration *Int. J. Nanomed.* **13** 4591–605
- [35] Munchow E A, Albuquerque M T P, Zero B, Kamocki K, Piva E, Gregory R L and Bottino M C 2015 Development and characterization of novel ZnO-loaded electrospun membranes for periodontal regeneration *Dent. Mater.* **31** 1038–51
- [36] Sox T E and Olson C A 1989 Binding and killing of bacteria by bismuth subsalicylate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33** 2075–82
- [37] Tsai H H and Rhodes J M 1990 Bismuth subsalicylate, bismuth subcitrate and dextran sulphates inhibit faecal mucin sulphatase *Clin. Sci.* **79** P17–P
- [38] Manhart M D 1990 *In vitro* antimicrobial activity of bismuth subsalicylate and other bismuth salts *Clin. Infect. Dis.* **12** S11–S5
- [39] Ward R L, Sander D S and Knowlton D R 1985 *In vitro* activities of bismuth salts against rotaviruses and other enteric viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** 306–8
- [40] Bierer D W 1990 Bismuth subsalicylate: history, chemistry, and safety *Clin. Infect. Dis.* **12** S3–S8
- [41] Mahony D E, Lim-Morrison S, Bryden L, Faulkner G, Hoffman P S, Agocs L, Briand G G, Burford N and Maguire H 1999 Antimicrobial activities of synthetic bismuth compounds against *Clostridium difficile* *Antimicrob. Agents Chemother.* **43** 582–8
- [42] Pitz A M, Park G W, Lee D, Boissy Y L and Vinje J 2015 Antimicrobial activity of bismuth subsalicylate on *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* O157:H7, norovirus, and other common enteric pathogens *Gut Microbes* **6** 93–100
- [43] Budisak P and Abbas M 2021 *Bismuth Subsalicylate* (4 05 2021) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560697/>)
- [44] Vega-Jiménez A L, Almaguer-Flores A, Flores-Castañeda M, Camps E, Uribe-Ramírez M, Aztatzí-Aguilar O G and De Vizcaya-Ruiz A 2017 Bismuth subsalicylate nanoparticles with anaerobic antibacterial activity for dental applications *Nanotechnology* **28** 435101
- [45] Alipour M, Dorval C, Suntres Z E and Omri A 2011 Bismuth-ethanedithiol incorporated in a liposome-loaded tobramycin formulation modulates the alginate levels in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* *J. Pharm. Pharmacol.* **63** 999–1007
- [46] Flores-Castaneda M, Vega-Jimenez A L, Almaguer-Flores A, Camps E, Perez M, Silva-Bermudez P, Berea E and Rodil S E 2015 Antibacterial effect of bismuth subsalicylate nanoparticles synthesized by laser ablation *J. Nanopart. Res.* **17** 13
- [47] Govor˘cin B E, Oceli˘c B V, Slouf M and Šitum A 2014 Characterization of biodegradable polycaprolactone containing titanium dioxide micro and nanoparticles *Int. J. Mater. Metall. Eng.* **91** 611–5
- [48] Shieh Y-T, Yang H-S, Chen H-L and Lin T-L 2005 Nonisothermal crystallization of compatible PCL/PVC blends under supercritical CO₂ *Polym. J.* **37** 932–8
- [49] Azevedo H S and Reis R L 2004 Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* ed J San Roman (Boca Raton, FL: CRC Press) pp 177–202
- [50] Mendoza-Espinosa D and Hanna T A 2009 Synthesis, x-ray structures and reactivity of calix[5]arene bismuth(III) and antimony(III) complexes *Dalton Trans.* **26** 5211–25
- [51] Mendoza-Espinosa D, Rheingold A L and Hanna T A 2009 Synthesis of bismuth and antimony complexes of the “larger” calix[n]arenes (n = 6–8); from mononuclear to tetranuclear complexes *Dalton Trans.* **26** 5226–38
- [52] Gautam S, Dinda A K and Mishra N C 2013 Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method *Mater. Sci. Eng. C* **33** 1228–35
- [53] Zhou Q H, Zhang H L, Zhou Y, Yu Z P, Yuan H H, Feng B, Van Rijn P and Zhang Y 2017 Alkali-mediated miscibility of gelatin/polycaprolactone for electrospinning homogeneous composite nanofibers for tissue scaffolding *Macromol. Biosci.* **17** 12
- [54] Timakova E V, Udalova T A and Yukhin Y M 2008 Synthesis of bismuth (III) salicylates in the precipitation reactions from solutions 2008 Third International Forum on Strategic Technologies IFOST 2008: Proc. Third Int. Forum on Strategic Technologies (Novosibirsk, Russia, 23–29 June 2008) (IEEE) pp 127–30
- [55] Marzouk M A, El Batal H A and El Din F M E 2013 Optical properties and effect of gamma irradiation on bismuth silicate glasses containing SrO, BaO or PbO *Silicon* **5** 283–95
- [56] Abdelrazek E M, Hezma A M, El-khodary A and Elzayat A M 2016 Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend *Egypt. J. Basic Appl. Sci.* **3** 10–5
- [57] Rodriguez-Tobias H, Morales G and Grande D 2019 Comprehensive review on electrospinning techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers *Mater. Sci. Eng. C* **101** 306–22
- [58] Feng B, Tu H B, Yuan H H, Peng H J and Zhang Y Z 2012 Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL *Biomacromolecules* **13** 3917–25
- [59] Angamma C J and Jayaram S H 2011 Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology *IEEE Trans. Ind. Appl.* **47** 1109–17
- [60] Purushothaman A E, Thakur K and Kandasubramanian B 2020 Development of highly porous, electrostatic force assisted nanofiber fabrication for biological applications *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **69** 477–504
- [61] Wu J L and Hong Y 2016 Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration *Bioact. Mater.* **1** 56–64
- [62] Vaquette C, Saifzadeh S, Farag A, Huttmacher D W and Ivanovski S 2019 Periodontal tissue engineering with a multiphasic construct and cell sheets *J. Dent. Res.* **98** 673–81
- [63] Ortolani E, Quadri F, Bellisario D, Santo L, Polimeni A and Santarsiero A 2015 Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. *Ann. Ist. Super. Sanita* **51** 229–35
- [64] Castellano M, Alloisio M, Darawish R, Dodero A and Vicini S 2019 Electrospun composite mats of alginate with embedded silver nanoparticles *J. Therm. Anal. Calorim.* **137** 767–78
- [65] Ramírez Hernández A, Crisanto Contreras O, Conde Acevedo J and Navarro Moreno L G 2013 Poly(ϵ -caprolactone) degradation under acidic and alkaline conditions *Am. J. Polym. Sci.* **3** 70–5
- [66] Ero-Phillips O, Jenkins M and Stamboulis A 2012 Tailoring crystallinity of electrospun PIIa fibres by control of electrospinning parameters *Polymers* **4** 1331–48
- [67] Milella E, Ramires P A, Brescia E, La Sala G, Di Paola L and Bruno V 2001 Physicochemical, mechanical, and biological properties of commercial membranes for GTR *J. Biomed. Mater. Res.* **58** 427–35
- [68] Coic M, Placet V, Jacquet E and Meyer C 2010 Mechanical properties of collagen membranes used in guided bone regeneration: a comparative study of three models *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **111** 286–90
- [69] Kao D W K and Fiorellini J P 2012 Regenerative periodontal therapy *Periodontal Disease* ed D F Kinane and A Mombelli (Basel: Karger) pp 149–59
- [70] Salvador J A R, Figueiredo S A C, Pinto R M A and Silvestre S M 2012 Bismuth compounds in medicinal chemistry *Future Med. Chem.* **4** 1495–523
- [71] Stammitti-Scarpone A and Acosta E 2019 Solid-liquid-liquid wettability and its prediction with surface free energy models *Adv. Colloid Interface Sci.* **264** 28–46

- [72] Sculean A, Nikolidakis D and Schwarz F 2008 Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials—biological foundation and preclinical evidence: a systematic review *J. Clin. Periodontol.* **35** 106–16
- [73] Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Zu P, Liao L and Wei J 2016 Biodegradable polymer membranes applied in guided bone/tissue regeneration: a review *Polymers (Basel.)* **8** 115
- [74] Jiang T, Carbone E J, Lo K W-H and Laurencin C T 2015 Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration *Prog. Polym. Sci.* **46** 1–24
- [75] Alharbi S A, Mashat B H, Al-Harbi N A, Wainwright M, Aloufi A S and Alnaimat S 2012 Bismuth-inhibitory effects on bacteria and stimulation of fungal growth *in vitro Saudi J. Biol. Sci.* **19** 147–50
- [76] Beil W, Birkholz C, Wagner S and Sewing K-F 1995 Bismuth subcitrate and omeprazole inhibit *Helicobacter pylori* F₁ -ATPase *Pharmacology* **50** 333–7
- [77] Bland M V, Ismail S, Heinemann J A and Keenan J I 2004 The action of bismuth against *Helicobacter pylori* mimics but is not caused by intracellular iron deprivation *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** 1983–8
- [78] Mahony D E, Woods A, Eelman M D, Burford N and Van Zanten S 2005 Interaction of bismuth subsalicylate with fruit juices, ascorbic acid, and thiol-containing substrates to produce soluble bismuth products active against *Clostridium difficile* *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** 431–3
- [79] Barton L L, Granat A S, Lee S, Xu H F, Ritz N L, Hider R and Lin H C 2019 Bismuth(III) interactions with *Desulfovibrio desulfuricans*: inhibition of cell energetics and nanocrystal formation of Bi₂ S₃ and Bi₀ *Biometals* **32** 803–11
- [80] Kushkevych I, Cejnar J, Tremel J, Dordevic D, Kollar P and Vitezova M 2020 Recent advances in metabolic pathways of sulfate reduction in intestinal bacteria *Cells* **9** 16
- [81] Badireddy A R, Chellam S, Yanina S, Gassman P and Rosso K M 2008 Bismuth dimercaptopropanol (BisBAL) inhibits the expression of extracellular polysaccharides and proteins by *Brevundimonas diminuta*: implications for membrane microfiltration *Biotechnol. Bioeng.* **99** 634–43
- [82] Nivens D E, Ohman D E, Williams J and Franklin M J 2001 Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms *J. Bacteriol.* **183** 1047–57
- [83] Folsom J P, Baker B and Stewart P S 2011 *In vitro* efficacy of bismuth thiols against biofilms formed by bacteria isolated from human chronic wounds *J. Appl. Microbiol.* **111** 989–96
- [84] Suresh S, Becker A and Glasmacher B 2020 Impact of apparatus orientation and gravity in electrospinning—a review of empirical evidence *Polymers* **12** 11
- [85] Domenico P, Landolphi D R and Cunha B A 1991 Reduction of capsular polysaccharide and potentiation of aminoglycoside inhibition in Gram-negative bacteria by bismuth subsalicylate *J. Antimicrob. Chemother.* **28** 801–10
- [86] Domenico P, Reich J, Madonia W and Cunha B A 1996 Resistance to bismuth among Gram-negative bacteria is dependent upon iron and its uptake *J. Antimicrob. Chemother.* **38** 1031–40
- [87] Domalaon R, Idowu T, Zhanel G G and Schweizer F 2018 Antibiotic hybrids: the next generation of agents and adjuvants against Gram-Negative pathogens? *Clin. Microbiol. Rev.* **31** 45
- [88] Gilster J, Bacon K, Marlink K, Sheppard B, Deveney C and Rutten M 2004 Bismuth subsalicylate increases intracellular Ca²⁺, MAP-kinase activity, and cell proliferation in normal human gastric mucous epithelial cells *Dig. Dis. Sci.* **49** 370–8