



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES
POSGRADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE MATERIALES

*“Síntesis y caracterización de la red interpenetrante (net-PEG)-inter-(net-PNiPAAm)
mediante radiación gamma y su potencial uso como material antiadherente”*

T E S I S

que para optar por el grado de:

Doctora en Ciencia e Ingeniería de Materiales

Presenta:

M. en C. Gloria Angélica Cruz Gómez

Tutora principal:

Dra. Sofia Guillermina Burillo Amezcua

Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

Miembros del Comité Tutor:

Dra. Alejandra Ortega Aramburu

Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

Dr. Ernesto Rivera García

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

Ciudad Universitaria, febrero de 2023.



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.

Jurado

Dr. Juan Manuel Navarrete Tejero

Facultad de Química

Presidente

Dra. Sofia Guillermina Burillo Amezcua

Instituto de Ciencias Nucleares

Primer vocal

Dr. Daniel Pérez Calixto

Facultad de Ciencias

Segundo vocal

Dra. Alicia Negrón Mendoza

Instituto de Ciencias Nucleares

Tercer vocal

Dra. Lidia Escutia Guadarrama

Facultad de Química

Secretaria

LISTA DE ABREVIATURAS

% w/w	porcentaje peso/peso
°C	grado Celsius
¹³ C	isótopo de carbono 13
4EGDMA	tetraetilenglicol dimetacrilato
⁶⁰ Co	isótopo de cobalto 60
ADN	ácido desoxirribonucleico
CFU	unidades formadoras de colonia
cm	centímetro
CO ₂	dióxido de carbono
CP/TOSS	Cross Polarized / TOtal Sideband Supression
CR	centro reactivo
CTC	complejo de transferencia de carga
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
ETC	Estado de Transición Cíclico
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FT-IR	infrarrojo por transformada de Fourier
g/L	concentración en gramos por litro
h	hora
IPN	red interpenetrante

IR	infrarrojo
kGy	kilo Gray
LCST	Temperatura Crítica Mínima de Disolución
M	concentración molar en mol/L
Hz	hertz
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
Mn	peso molecular en número
<i>net</i> -PEG	red/hidrogel de PEG
NiPAAm	N-isopropilacrilamida
nm	nanómetro
PDMAEMA	poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato)
PEG	polietilenglicol
PEO	poli(óxido de etileno)
pH	potencial de hidrógeno
PNiPAAm	poli(N-isopropilacrilamida)
ppm	partes por millón
PSA	persulfato de amonio
PVCL	polivinilcaprolactama
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RRO	Reacción Radiolítica de Oxidación
RRP	Reacción Radiolítica de Polimerización
RRR	Reacción Radiolítica de Reducción
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TMS	tetrametilsilano

USCT	Temperatura Crítica Máxima de Disolución
UV-Vis	ultravioleta visible
W_0	masa inicial de la muestra
W_f	masa final de la muestra
$W_{IPN\ seco}$	masa de la red interpenetrante seca
$W_{net-PEG\ seco}$	masa de la red de PEG seca

RESUMEN

Esta tesis aborda la síntesis de una red interpenetrante de PEG y NiPAAm, polímeros conocidos por ser biocompatibles y estímulo-sensibles a la temperatura. El primer paso fue la obtención de la red de PEG mediante radiación ionizante gamma de ^{60}Co ; en este experimento se varió el peso molecular en número Mn del PEG, la temperatura de reacción y las dosis absorbidas del hidrogel primario. Los hidrogeles de PEG con mejores propiedades mecánicas aparentes fueron aquellos con una dosis absorbida de 20 kGy, sintetizados a baja temperatura ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$). El segundo paso fue la reacción para obtener la red interpenetrante variando la concentración del segundo monómero (NiPAAm) y el tiempo de reacción. Estas redes se caracterizaron por medio de su valor de hinchamiento límite, con lo cual se demostró que estos polímeros son superabsorbentes por su capacidad de retención de agua alrededor de 1000%. Se obtuvieron imágenes de SEM que permiten medir el tamaño de poro y mostrar la morfología de las redes. Se caracterizó la adherencia de proteínas, bacterias (*E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermis*) y de células a la superficie de las redes interpenetrantes, obteniendo resultados favorables para clasificarse como material antiadherente y citocompatible. Finalmente, se caracterizaron sus propiedades mecánicas a través de pruebas de indentación y relajación a nivel micrométrico, lo cual servirá para determinar si el módulo de Young obtenido es similar al de ambientes biológicos con potenciales aplicaciones biomédicas como los apósitos de heridas.

ABSTRACT

This thesis project address synthesis of an interpenetrated polymer network made of PEG and PNiPAAm, known because of their biocompatibility and thermo-responsiveness. The first step was the obtention of the **net**-PEG through ionizing gamma radiation from ^{60}Co . In these experiments the PEG's number molecular weight, reaction temperature and absorbed gel doses were the variables to study. The hydrogels with the best apparent mechanical properties were those synthesized with an absorbed dose of 20 kGy at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Subsequently, the next step was the PNiPAAm interpenetration to obtain the IPNs varying the concentration and reaction time.

The resulting networks were characterized by their swelling behavior, proving to be superabsorbent systems because they are capable of retain water about 1000% their weight. Additionally, SEM images allowed to observe the morphology of the IPNs and to measure an approximate pore size.

The adherence to proteins, microorganisms (*E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermis*) and cells was tested; the results showed that the interpenetrated networks possess anti-adherence and can be called cito-compatible.

Finally, the materials were characterized by indentation and relaxation tests to demonstrate that their Young's modulus is similar to biological environments with potential biomedical applications like wound dressings.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a mi asesora, la **Dra. Guillermina Burillo**, por su enorme paciencia y su pasión por la investigación. **Por todo el apoyo** que me brindó no solo en asuntos profesionales, y su fortaleza moral que mostró cuando más lo necesite. **Gracias por su calidez humana** y por enseñarme que una investigadora exitosa también puede ser una apasionada bailadora.

Gracias a la Dra. Alejandra Ortega por sus guías y aportaciones a lo largo de toda mi estancia en el laboratorio de Macromoléculas II. Eres otra persona que me inspira.

Gracias al Dr. Ernesto Rivera por aceptar ser parte de mi comité tutor, en condiciones como las que vivimos durante la pandemia. Otro gran ejemplo de un desempeño sobresaliente en la investigación.

Doy gracias por el apoyo técnico brindado a todo el personal de la Unidad de Irradiación: **al Maestro Benjamín Leal, al Técnico Acad. Javier y a Francisco García y Francisco Isidoro.**

Gracias por la orientación y amable guía **a Martín Cruz**. Gracias por la ayuda para realizar las pruebas microbiológicas al Dr. Héctor Magaña y por el apoyo en la caracterización al Maestro Gerardo Cedillo.

Agradezco de corazón a Saúl y con especial cariño a Chayito, que siempre saludaba con una gran sonrisa cuando llegaba de correr. Muchas **gracias a todo el personal del ICN** por ser personas sonrientes y educadas.

A las personas que me dieron una oportunidad en todo este trayecto: Dr. Paleo, Maestro Miguel Vasconcelos. Al Dr. Pedro, la Dra. Delia y al Dr. Arturo, con los que emprendí el camino.

Indirectamente, doy las gracias a las personas que, en lugar de alegrías, me brindaron aprendizajes, aunque dolorosos, fueron al mismo tiempo grandes maestros.

Dedicado con mucho cariño a

Dios

A la Virgen de Juquila, por estar con mi hermano.

Mamá y Papá. No tengo cómo darles las gracias por su amor, apoyo y tiempo. Porque todo siempre me lo brindan desde el corazón, con enorme ternura. Los amo inmensamente.

Te dedico cariñosamente este trabajo a ti hermano, Quique, por ser tan fuerte este último año, por cuidar y amar a Jordan y por enseñarme a ser valiente. Eres una persona muy valiosa en mi vida.

A la Yolis que siempre acompaña en las noches de desvelo también despierta.

A ti Luiso ☆. Gracias, mi rumbero oaxaqueño favorito, por tomar mi mano, enseñarme a ser mejor persona y todas las risas compartidas.

A quienes me han cambiado la vida para bien: Jordan ☆, Kali, Michibú y Killua. Por enseñarme a amar de muchas y distintas formas.

A Tona, el más sincero amigo y mejor físico del mundo; a Stef, la chiapaneca que ganó mi cariño y a Herr Abitia.

A los mejores roomies del mundo, Erika y Esteban, que me han enseñado a ser siempre bondadosa y buena compañera.

A la mejor chocolatera del mundo, Yolito.

A mi abuelita Leonor, a mis padrinos Dulce y Jorge, mis primos queridos Dannita
y Jorge y personas bellas de Oaxaca.

Para mi tía Gely y mi madrina Tere. Siempre están conmigo.

Y, sobre todo, con todo mi corazón para ti abuelita Quechita.

Hasta que volvamos a estar juntas. <3

*a los que buscan
aunque no encuentren*

*a los que avanzan
aunque se pierdan*

*a los que viven
aunque se mueran*

M. Benedetti

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Radiaciones en Macromoléculas II que se encuentra en las instalaciones del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

El proyecto pudo llevarse a cabo gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca de doctorado con número de becaria 592339 y al proyecto DGAPA no. IN203019.

Parte de los resultados de este proyecto fueron presentados en los siguientes congresos internacionales:

14th Tihany Symposium on Radiation Chemistry

XXIX International Materials Research Congress

Además, se generó la siguiente publicación en la revista indexada:

Cruz-Gómez, A., Pérez-Calixto, M., Velazco-Medel, M. A. & Burillo, G., 2022. Antifouling IPNs made of poly(ethylene glycol)/poly(N-isopropyl acrylamide) using gamma radiation. *MRS Communications*, pp. 12, 272-278.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xvii
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 1 -
HIPÓTESIS	- 1 -
OBJETIVOS	- 3 -
GENERAL	- 3 -
ESPECÍFICOS	- 3 -
INTRODUCCIÓN	- 5 -
1. GENERALIDADES	- 7 -
1.1 SÍNTESIS QUÍMICA DE POLÍMEROS	- 8 -
1.1.1 <i>Polimerización por condensación</i>	- 9 -
1.1.2 <i>Polimerización por adición</i>	- 10 -
1.1.2.1 <i>Polimerización iniciada por la radiación</i>	- 11 -
1.2 POLÍMEROS CON RESPUESTA A ESTÍMULOS EXTERNOS (ESTÍMULO-SENSIBLES)	- 12 -
1.2.1 <i>Termosensibilidad</i>	- 13 -
1.3 LOS POLÍMEROS Y ALGUNAS APLICACIONES EN EL ÁREA BIOLÓGICA	- 17 -
1.3.1 <i>PNiPAAm</i>	- 17 -
1.3.2 <i>PEG</i>	- 20 -
1.4 HIDROGELES	- 21 -
1.4.1 <i>Redes Interpenetrantes</i>	- 24 -
1.5 HERIDAS Y CICATRIZACIÓN	- 27 -
1.5.1 <i>Apósitos para heridas</i>	- 29 -
1.5.2 <i>Hidrogeles como apósitos para heridas</i>	- 31 -
1.5.3 <i>Infecciones debidas a heridas</i>	- 32 -
1.6 ADHERENCIA	- 34 -

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	- 38 -
2.1 SUSTANCIAS Y DISOLVENTES	- 38 -
2.1.1 Purificación del monómero de NiPAAm	- 38 -
2.2 INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPO	- 39 -
2.2.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	- 39 -
2.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	- 39 -
2.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	- 40 -
2.2.4 Fuente de irradiación	- 40 -
2.2.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido	- 40 -
2.2.6 Espectrofotometría UV-Vis	- 41 -
2.2.7 Pruebas de microindentación y relajación	- 41 -
2.2.8 Ensayo de viabilidad celular	- 42 -
2.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	- 42 -
2.4 SÍNTESIS DE LA RED INTERPENETRANTE	- 44 -
2.4.1 Preparación del hidrogel <i>net</i> -PEG por radiación	- 44 -
2.4.2 Síntesis de la red interpenetrante (<i>net</i> -PEG)- <i>inter</i> -(<i>net</i> -PNiPAAm) método químico	- 47 -
2.5 CARACTERIZACIÓN	- 48 -
2.5.1 Determinación del porcentaje de hinchamiento límite en agua destilada a temperatura amb	- 48 -
2.5.2 Determinación del valor de temperatura crítica por medio de hinchamiento límite	- 49 -
2.5.3 Determinación de la temperatura crítica por medio de DSC	- 50 -
2.6 ELUCIDACIÓN DE ESTRUCTURA POR RMN DE ¹³ C EN ESTADO SÓLIDO (CPTOSSS)	- 50 -
2.7 CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS PELÍCULAS A TRAVÉS ENSAYOS DE RELAJACIÓN E INDENTACIÓN	- 51 -
2.8 OBTENCIÓN DE MICROGRAFÍAS POR SEM	- 51 -
2.9 ENSAYO CELULAR	- 52 -
2.9.1 Ensayo de citotoxicidad	- 52 -
2.9.1.1 Preparación del ensayo	- 52 -
2.9.1.2 Ejecución del ensayo	- 53 -
2.9.2 Pruebas de adhesión celular	- 53 -
2.9.2.1 Preparación de los hidrogeles e IPNs	- 53 -
2.9.2.2 Cultivo celular	- 53 -
2.9.2.3 Viabilidad celular (prueba de adhesión)	- 54 -
2.10 ADSORCIÓN DE OVOALBÚMINA	- 54 -
2.11 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS	- 55 -
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	- 56 -
3.1 SÍNTESIS DE LA RED INTERPENETRANTE (<i>net</i> -PEG)- <i>INTER</i> -(<i>net</i> -PNiPAAm)	- 56 -
3.1.1 Formación del hidrogel de PEG (<i>net</i> -PEG) por radiación ionizante	- 56 -
3.1.1.1 Formación de los radicales en la estructura principal del PEG	- 56 -
3.1.2 Polimerización y entrecruzamiento de la PNiPAAm vía química	- 58 -

3.2	ESTUDIO DE FORMACIÓN DEL PORCENTAJE DE GEL EN PEG	- 65 -
3.3	ESTUDIO Y DETERMINACIÓN DEL HINCHAMIENTO DE LOS HIDROGELES SINTETIZADOS	- 67 -
3.4	DETERMINACIÓN DEL VALOR DE TEMPERATURA CRÍTICA	- 72 -
3.4.1	<i>Determinación de la LCST por medio de hinchamiento</i>	- 73 -
3.4.2	<i>Determinación de la temperatura crítica por DSC</i>	- 75 -
3.5	ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA IPN	- 76 -
3.5.1	<i>Identificación de grupos funcionales por medio de espectroscopía de infrarrojo</i>	- 76 -
3.5.2	<i>Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C en estado sólido</i>	- 78 -
3.6	VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE PORO POR SEM	- 79 -
3.7	RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CELULARES	- 82 -
3.7.1	<i>Viabilidad celular (in vitro)</i>	- 82 -
3.7.2	<i>Adhesión celular</i>	- 83 -
3.8	ADSORCIÓN DE OVOALBÚMINA SOBRE (n&t-PEG)-InT&R-(n&t-PNIPAAm)	- 85 -
3.9	PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS	- 86 -
3.10	CARACTERIZACIÓN MECÁNICA	- 90 -
4.	CONCLUSIONES	- 94 -
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ELECTRÓNICAS	- 97 -
	ANEXO I	- 104 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de estructuras de polímeros	- 7 -
Figura 2. Criterios comunes de clasificación de los polímeros.	- 8 -
Figura 3. Estructura de un polímero obtenido por condensación.	- 9 -
Figura 4. Polimerización del etileno por medio de adición da lugar a uno de los termoplásticos más utilizados en la actualidad.	- 10 -
Figura 5. Ejemplo del cambio en la estructura de cadenas poliméricas al recibir un estímulo del medio. En este caso, el polímero cambia de volumen al estar sometido a un estímulo	- 13 -
Figura 6. Diagrama de fases. Comportamientos termosensibles de polímeros con LCST y USCT.	- 15 -
Figura 7. Conformaciones de las cadenas poliméricas debido a los cambios en la temperatura.	- 16 -
Figura 8. Estructura química de A) monómero de NiPAAm y B) polímero de NiPAAm	- 19 -
Figura 9. Estructura química del PEG.	- 20 -
Figura 10. Tipos de entrecruzamiento por el que se obtiene un hidrogel.	- 22 -
Figura 11. Mezclas de polímeros	- 24 -
Figura 12. Representación de la estructura de: A) un hidrogel; B) una red interpenetrante.	- 26 -
Figura 13. Factores que influyen en las propiedades antiadherentes de una superficie.	- 35 -
Figura 14. Superficies que muestran distintos tipos de antiadherencia.	- 37 -
Figura 15. Reactivos utilizados en la experimentación.	- 44 -
Figura 16. Eliminación de oxígeno de la disolución de PEG.	- 44 -
Figura 17. Preparación de las placas de PEG para su irradiación.	- 45 -
Figura 18. Arreglo de placas listo y colocado en el soporte para ser irradiado.	- 46 -
Figura 19. Red interpenetrante para su medición en el equipo de microindentación.	- 51 -
Figura 20. Formación de radicales primarios en la cadena de PEG sobre un carbono.	- 57 -
Figura 21. Combinación de los radicales formados en la cadena de PEG para su reticulación.	- 57 -
Figura 22. Formación del Complejo de Transferencia de Carga entre el TEMED y PSA.	- 58 -
Figura 23. Formación de radicales	- 59 -
Figura 24. Iniciación de la reacción de interpenetración de la NiPAAm.	- 60 -
Figura 25. Fase de propagación de la reacción de polimerización de la NiPAAm.	- 60 -
Figura 26. Reacción del 4EGDMA con radicales formados en la cadena de NiPAAm.	- 61 -
Figura 27. Terminación de la polimerización de la NiPAAm por medio de combinación.	- 62 -
Figura 28. Formación de cadenas poliméricas de NiPAAm por medio de desproporción.	- 63 -
Figura 29. Obtención del hidrogel de PNiPAAm.	- 64 -
Figura 30. Porcentaje de gel de PEG en función de la dosis a diferentes pesos moleculares y temperaturas.	- 65 -

Figura 31. Porcentaje de hinchamiento en función del tiempo en hidrogeles de PEG con Mn:6000 sintetizados a diferentes dosis de radiación absorbida.	- 68 -
Figura 32. Hinchamiento límite de net -PEG20 sintetizados a temperatura ambiente).	- 69 -
Figura 33. Hinchamiento límite de net -PEG (Mn: 20000) sintetizadas a -4 °C.	- 70 -
Figura 34. Determinación del hinchamiento límite de las redes interpenetradas con diferentes porcentajes de NiPAAm.	- 72 -
Figura 35. Determinación de la temperatura crítica mediante hinchamiento.	- 74 -
Figura 36. Determinación de la temperatura crítica por medio de DSC.	- 75 -
Figura 37. Espectro infrarrojo de la red interpenetrante, PNiPAAm y net -PEG.	- 77 -
Figura 38. Espectros de RMN (¹³ C) de sólidos obtenidos para a) net -PEG; b) y c) IPNs formadas con distinto porcentaje de PNiPAAm (100 y 50% respectivamente).	- 78 -
Figura 39. Morfología del net-PEG20H y las redes interpenetrantes con PNiPAAm a distinta concentración y tiempo de reacción. (a) net-PEGH con aumento de 500X; (b) IPN-A ₁₃ con aumento de 600X; (c) IPN-B ₈₅ con aumento de 500X; (d) IPN-C ₁₈₈ . con 188 % de concentración de net-PNiPAAm respecto al PEG y aumento de 600X.	- 80 -
Figura 40. Viabilidad celular de las redes interpenetrantes de PEG y PNiPAAm.	- 83 -
Figura 41. Adherencia de las células Balb/3T3 en (a) control positivo, (b) net-PEG20H, (c) IPN con relación PEG:PNiPAAm (1:0.25) y (d) IPN-B ₈₅ con relación PEG:PNiPAAm (1:0.85)	- 84 -
Figura 42. Prueba de adsorción de ovalbúmina con respecto al tiempo en IPNs con relación PEG:PNiPAAm 1:1.	- 86 -
Figura 43. Porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> en IPNs con distintos porcentajes de PNiPAAm interpenetrada después de 24 h y 48 h.	- 87 -
Figura 44. Porcentaje de inhibición de la bacteria <i>S. Epidermis</i> que presentan las IPNs con distinto porcentaje de PNiPAAm presente.	- 88 -
Figura 45. Porcentaje de inhibición de <i>E. coli</i> en IPNs con distintos porcentajes de PNiPAAm interpenetrada después de 24 h.	- 89 -
Figura 46. Valores de rigidez de la red de PEG y las IPNs variando la cantidad de PNiPAAm.	- 91 -
Figura 47. Propiedades mecánicas de algunos polímeros en comparación con algunos tejidos.	- 93 -
Figura 48. Curva de calibración de ovalbúmina para su cuantificación por medio de espectroscopía UV-Vis.	- 105 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. LCST de los diferentes sistemas, determinado mediante el % de absorción de agua.	- 73 -
Tabla 2. Tamaño de poro y desviación estándar la red net-PEG20H y de las diferentes IPNs.	- 81 -
Tabla 3. Valores de rigidez obtenidos por microindentación y ensayos de relajación.	- 92 -
Tabla 4. Tabla de datos de la curva de calibración de ovoalbúmina.	- 106 -

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las heridas son un problema de salud pública. Su tratamiento involucra el uso de materiales como apósitos para promover una rápida recuperación. Este proceso de sanación se ve frecuentemente afectado porque suelen presentarse infecciones debidas a la falta de higiene a lo largo del tratamiento, la colonización de los materiales que conforman el apósito por agentes patógenos (p. ej. bacterias u hongos) y su contaminación con proteínas o partículas indeseadas. Se ha observado que las complicaciones se ven favorecidas porque la materia prima tradicionalmente utilizada en estos apósitos (gasas, curitas, vendas, tela adhesiva, entre otros) posee poca transpirabilidad, baja humedad, además que, el cambio del material de curación requiere de personal con experiencia para su cuidado.

Por lo anterior, una de las estrategias que podrían ayudar a tratar más eficientemente las heridas es el uso de apósitos primarios constituidos por materiales antiadherentes que disminuyan la cantidad de infecciones secundarias y contribuyan a una mejor recuperación.

HIPÓTESIS

Es posible lograr disminuir las complicaciones que se tienen al tratar una herida si se mejoran las propiedades de los materiales que se utilizan como apósitos primarios. Concretamente se propone el uso de un hidrogel con

características antiadherentes, ya que esto podría disminuir la cantidad de infecciones producidas por bacterias u otros contaminantes (proteínas) presentes frecuentemente al momento de realizar una curación.

El material por utilizar deberá contar no solo con antiadherencia, sino que, al estar pensado para estar en contacto con tejidos como la piel, deberá ser biodegradable y biocompatible. Para la síntesis de este material, se propone utilizar dos polímeros que naturalmente cuenten con estas propiedades. De igual forma, la presencia de propiedades estímulo-sensibles podría brindar una ventaja en su aplicación, ya que podría ser portador de fármacos que coadyuven en la recuperación. Adicionalmente, el material deberá ser modificable mediante radiación gamma para disminuir el uso de agentes químicos. Para cumplir con los requisitos mencionados, se propone obtener una red interpenetrante (IPN) de polietilenglicol en conjunto con NiPAAm: el primer polímero aportará principalmente las propiedades altamente hidrofílicas con efecto antiadherente y su facilidad de modificación a través de radiación ionizante, mientras que la NiPAAm brindará un carácter estímulo-sensible frente a la temperatura.

Así también, por su naturaleza, la IPN sintetizada contará con una microestructura altamente porosa, con la capacidad de retener una gran capacidad de agua que además de asemejarse en propiedades mecánicas a los tejidos blandos, evita la adherencia de microorganismos debido al efecto de las capas hidrofílicas que se forman superficialmente.

OBJETIVOS

General

Obtener un polímero con morfología de una red interpenetrante de PEG y PNiPAAm, sintetizado a través de radiación ionizante gamma y métodos químicos con potencial aplicación como material antiadherente (antifouling) para su uso en apósitos de heridas.

Específicos

- ✓ *Encontrar una ruta de síntesis* en la que se disminuya la cantidad de agentes químicos para la obtención de la red interpenetrada (IPN) formada de PEG y NiPAAm.
- ✓ *Encontrar las condiciones óptimas de síntesis de la IPN* por el método directo por radiación y por método químico.
- ✓ *Caracterizar la estructura* del material sintetizado mediante técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido, Espectroscopía Infrarroja y Resonancia Magnética Nuclear.
- ✓ *Estudiar la capacidad máxima de retención de agua de la IPN* a través de estudios de hinchamiento límite.

- ✓ *Estudiar la termosensibilidad de la red interpenetrante y analizar la respuesta obtenida utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido e hinchamiento crítico.*
- ✓ *Estudiar la antiadherencia que presentan las IPNs al contacto con ovalbúmina como modelo de proteína, *S. aureus*, *S. epidermis* y *E. Coli* (bacterias más comunes) y células de fibroblastos de ratón (BALB 3T3).*
- ✓ *Estudiar las propiedades mecánicas de las IPNs a través de los valores de módulo de Young y módulo de relajación por medio de un estudio de Microindentación.*

INTRODUCCIÓN

Los polímeros y su importancia en la vida actual

Quizá el término más popular asociado a los polímeros es la palabra plástico; sin embargo, el estudio de los polímeros desde esta visión es corto e incompleto para ilustrar el rol fundamental que desempeñan estas macromoléculas en la vida. De forma natural, los polímeros desarrollan tareas primordiales en la preservación de la vida, por ejemplo: el ADN es la macromolécula encargada del resguardo y transmisión de la información genética de todos los seres vivos; por otro lado, la celulosa es el polímero natural más abundante en la tierra ya que constituye la pared celular de los organismos del reino vegetal, lo que da lugar a diversos materiales también útiles y aprovechables para la actividad humana como la madera, el algodón o el papel. Ahora bien, con el desarrollo de las ciencias, así como de la industria química, la humanidad ha desarrollado técnicas que permiten la obtención de materiales poliméricos sintéticos que han cubierto las necesidades de la población mundial, las cuales van creciendo al ritmo que lo hacen las urbes y los asentamientos humanos. Esto se ilustra claramente al revisar los cambios en las actividades humanas de los últimos siglos (finales del XIX, XX y actualmente el XXI), donde los llamados *'commodities'* sustituyeron el uso de los recursos naturales (árboles, plantas y animales) en el calzado, vestimenta, contenedores, instrumentos de la vida cotidiana; mientras tanto, otros polímeros sintéticos más especializados, tuvieron

cabida en el desarrollo de los procesos industriales al sustituir a los metales por ser una opción más económica, y finalmente, se encontraron múltiples beneficios, más allá de los prácticos y evidentes, los cuales tienen un valor incalculable ya que mejoraron las condiciones y calidad de la vida humana. Para muestra se puede prestar atención al área de la salud, donde se han desarrollado materiales poliméricos con amplias aplicaciones: se pueden encontrar en sondas, bolsas para recolección y conservación de sangre, catéteres, jeringas, contenedores de medicamentos o fluidos, entre otros, de forma tal que se ha mejorado la calidad y efectividad de los tratamientos médicos. Sin embargo, con el uso de estos materiales, algunos retos importantes se han ido presentando a lo largo de los años, uno de los más importantes es sin duda la disposición de los residuos generados, su lenta degradación y reintegración al medio ambiente. De forma particular para el área biológica, la compatibilidad e inocuidad de los polímeros utilizados en este ámbito, es también un reto por considerar. Hoy en día la obtención de nuevos polímeros está enfocada en una síntesis lo más sostenible posible, con la menor cantidad de agentes y disolventes químicos agresivos con el ambiente, donde los residuos se puedan reutilizar o reintegrar al medio de manera amigable; asimismo, y especialmente para los polímeros que tienen aplicaciones médicas y biológicas, o que están en contacto con organismos vivos, la producción de materiales biocompatibles, biodegradables, bio-sostenibles, de fuentes renovables, es fundamental para el desarrollo de tecnologías de nuevos materiales con mejores funcionalidades en su desempeño.

1. GENERALIDADES

Los polímeros son grandes estructuras químicas compuestas de unidades representativas que se repiten llamadas monómeros. Estas macromoléculas suelen clasificarse de acuerdo con diversas características como puede ser su configuración, conformación, tacticidad, etc.



Figura 1. Ejemplos de estructuras de polímeros de acuerdo con el acomodo tridimensional de las cadenas.

Por ejemplo, atendiendo a su acomodo en el espacio, su estructura puede considerarse como bidimensional (lineal, ramificada) o tridimensional (en forma de estrella, redes, etcétera) (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

Algunas otras clases de polímeros junto con ejemplos pueden ser consultados en la Figura 2.

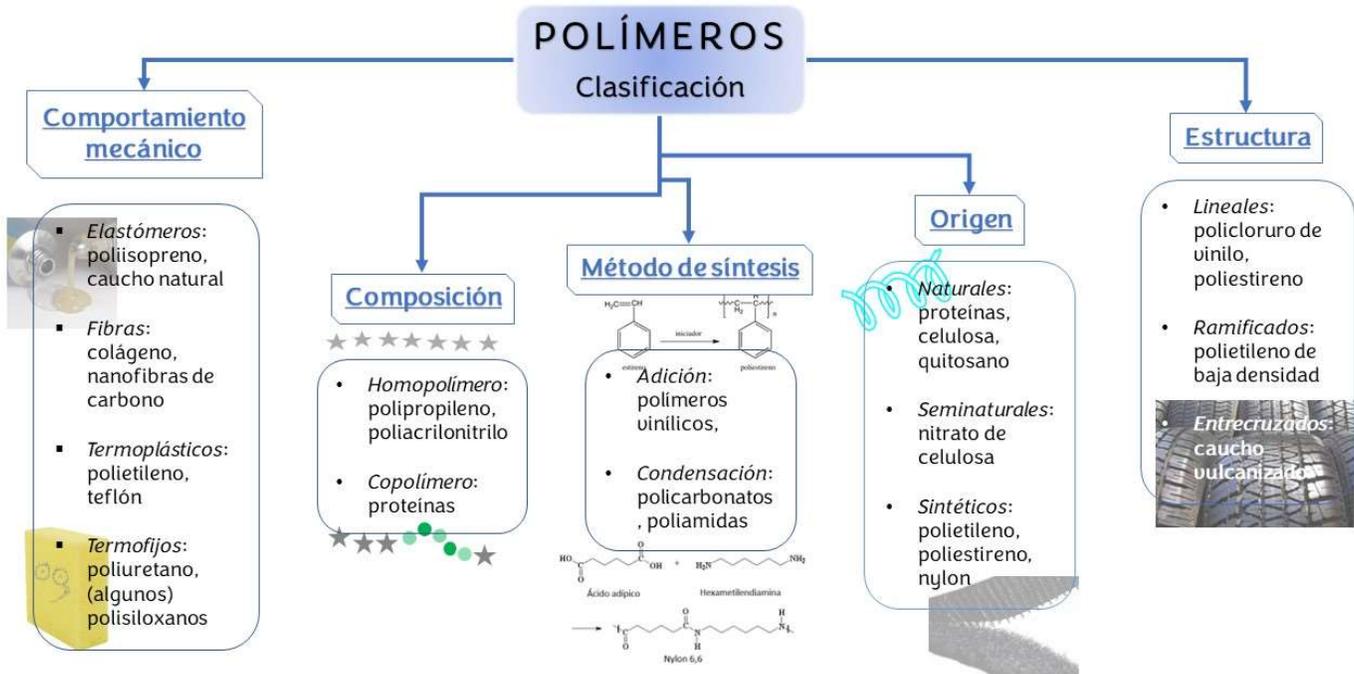


Figura 2. Criterios comunes de clasificación de los polímeros.

1.1 Síntesis química de polímeros

El proceso de síntesis de los polímeros es muy importante debido a que determina el diseño, estructura y propiedades finales del material. Las reacciones de polimerización son procesos mediante los cuales los monómeros se unen de manera covalente para dar lugar a macromoléculas donde se obtienen compuestos con cierta estructura y longitud de cadena, grado de polimerización y peso molecular. Estas reacciones se agrupan mayoritariamente en dos: polimerización por condensación (Ghobashy, 2018) y la polimerización por adición, las cuales se describen a continuación.

1.1.1 Polimerización por condensación

Un polímero sintetizado por medio de este tipo de reacciones cumple con las siguientes características:

- 1) Se obtiene por medio de una típica reacción de orgánica de condensación, o sea que elimina una pequeña molécula como subproducto (agua, amoníaco, hidrógeno, etc.) al momento de la polimerización.
- 2) Debe contener en la cadena principal los grupos funcionales que dieron origen al polímero (poliuretano).
- 3) En la cadena principal, la unidad repetitiva no cuenta con algún átomo presente en el monómero al cual supuestamente puede ser degradado (fenol-formaldehído).

Las poliamidas, poliésteres, proteínas, polisiloxanos, poliuretanos, entre otros, son ejemplos de polímeros que pueden ser obtenidos por este método.

La estructura general de este tipo de polímeros es la que se muestra en la Figura 3:



Donde:

R es un grupo aromático o alifático

Z es un grupo funcional

Figura 3. Estructura de un polímero obtenido por condensación.

1.1.2 Polimerización por adición

Este tipo de polimerización se produce en monómeros con insaturaciones (generalmente en dobles enlaces, aunque los triples enlaces no están exentos).

El polímero se forma debido a la reacción producida por un centro reactivo (CR), el cual se genera a través de un iniciador, el cual puede ser de naturaleza radicalaria, aniónica, catiónica o derivado de un complejo metálico. El CR reacciona con los enlaces insaturados presentes en los monómeros vinílicos, y así da lugar a un producto intermediario que seguirá reaccionando hasta que las especies reactivas se hayan consumido o no tengan otra molécula con la cual reaccionar. En este tipo de reacción de polimerización no hay subproductos, el monómero reacciona con otro monómero para dar lugar a un dímero que reacciona con otra unidad monomérica, esto se repite hasta la obtención final del polímero que tiene la composición química de la suma de cada uno de los monómeros que lo conforman. El polietileno (Figura 4), policloruro de vinilo y poliestireno son ejemplos muy conocidos de este tipo de polimerización.

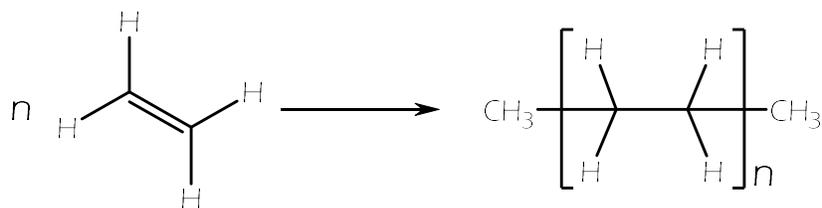


Figura 4. Polimerización del etileno por medio de adición da lugar a uno de los termoplásticos más utilizados en la actualidad.

1.1.2.1 Polimerización iniciada por la radiación

Este tipo de reacción es de especial interés debido a que reduce el uso de iniciadores químicos en el proceso, lo que disminuye la cantidad de agentes químicos involucrados, así como la necesidad de procesos de purificación. Gracias a las fuentes de energía ionizantes (rayos UV de alta energía, plasma, irradiación de electrones acelerados o rayos gamma) varios tipos de reacciones se pueden llevar a cabo, entre las que se encuentran la dimerización, oligomerización, curado, injerto y reticulación, que es el objeto de estudio de este trabajo.

Las reacciones de polimerización por medio de la radiación se pueden llevar a cabo en disolventes orgánicos, inorgánicos, polares o no polares, siempre y cuando estos sean buenos disolviendo los monómeros de interés y puedan ser sujetos de radiólisis. En el caso de utilizar agua como disolvente, el agua sufre un proceso de radiólisis que comienza cuando se da lugar a los radicales $H\cdot$ y $HO\cdot$. Estos radicales pueden originar otros tipos de reacciones como: la Reacción Radiolítica de Reducción, la Reacción Radiolítica de Oxidación y la Reacción Radiolítica de Polimerización (RRP) (Ghobashy, 2018). En el caso de la RRP, esta se puede llevar a cabo por vía catiónica, aniónica o radicalaria, por lo que generalmente el polímero se forma por medio de un mecanismo análogo al conocido mecanismo de crecimiento en cadena, donde se distinguen las etapas de iniciación, propagación y finalmente, terminación. El proceso en sí mismo es bastante amigable con el ambiente por la reducción en el uso de reactivos químicos, la temperatura de reacción que en muchos casos puede ser la del ambiente y el uso uno de agua como disolvente.

Algunas otras ventajas de utilizar radiación ionizante en el proceso de polimerización son:

- Es amigable con el ambiente. Tanto la reducción de agentes purificantes después de la reacción como del uso de disolventes orgánicos ayudan a que el proceso sea menos perjudicial al medio.
- Polimerización en estado sólido. Debido a la gran energía que aporta la radiación, las reacciones pueden llevarse a cabo no solamente en disolución sino también de forma directa al exponer al sólido directamente (Ghobashy, 2018).

1.2 Polímeros con respuesta a estímulos externos (estímulo-sensibles)

Hay un grupo de polímeros que son de particular interés debido a que pueden responder de una forma abrupta y perceptible en sus propiedades físicas o químicas como respuesta a un pequeño estímulo en el ambiente (temperatura, luz, pH, campo magnético, campo eléctrico o fuerza iónica, entre otros) (Wang, et al., 2016), esto se ilustra en la Figura 5. Generalmente, los cambios que sufren estos polímeros son en su forma, color, solubilidad, características de superficie, transiciones sol-gel, permeabilidad, etc.

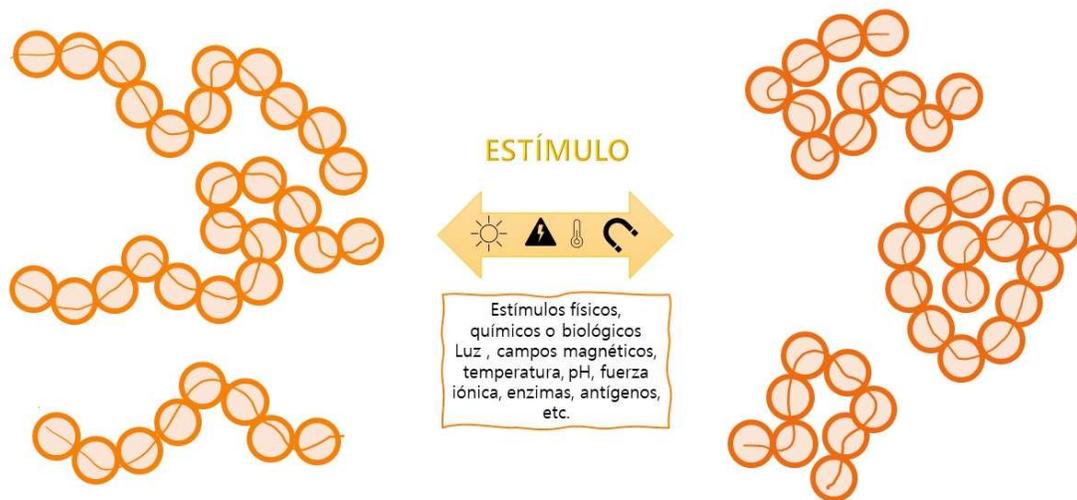


Figura 5. Ejemplo del cambio en la estructura de cadenas poliméricas al recibir un estímulo del medio. En este caso, el polímero cambia de volumen al estar sometido a un estímulo; pasan de estar expandidas a contraerse y viceversa.

Estos materiales son de particular interés, ya que la respuesta puede ser controlada eligiendo adecuadamente los grupos funcionales que conformarán la estructura, debido a que son los responsables de los cambios a los que se someterá el polímero. Esta particular característica hace evidente porqué estos polímeros tienen un gran campo de aplicación en áreas como la óptica, optoelectrónica, industria textil, farmacéutica, entre otras.

A continuación, se profundiza en los aspectos más importantes de la termosensibilidad.

1.2.1 Termosensibilidad

Existe una amplia variedad de polímeros que reaccionan con una transición de fase dependiendo la temperatura a la cual estén expuestos: estos

polímeros se denominan termosensibles y poseen una temperatura crítica mínima de disolución (LCST, en inglés). Esta propiedad sumamente atractiva ha sido aprovechada en diversas aplicaciones como la liberación controlada de fármacos, cultivo celular, biosensores, ingeniería de tejidos, terapia génica (Kolouchová, et al., 2021) (Zhang, et al., 2017), etc., todo esto gracias al cambio repentino de una especie soluble a una insoluble junto con una modificación en su estructura. Existen dos categorías que agrupan a los polímeros con termosensibilidad: la primera clase es aquella donde los polímeros se vuelven insolubles por encima de su valor de LCST (cuyas siglas en inglés significan Lower Critical Solution Temperature), lo que provoca una separación de las fases del sistema, es decir, la solubilidad del polímero disminuye conforme la temperatura se acerca al valor crítico hasta que finalmente, este precipita; por otro lado, la segunda clase de materiales estímulo-sensibles respecto a la temperatura es aquella donde el sistema sufre una separación de fases cuando el valor de la temperatura es menor al valor crítico del sistema, propiedad que se identifica como UCST (Upper Critical Solution Temperature, en inglés). Tanto la LCST como la UCST pueden visualizarse en el diagrama de fases que se muestra Figura 6, donde se muestra una curva binodal que representa el comportamiento límite en donde el polímero coexiste disuelto en el sistema acuoso a una determinada concentración.

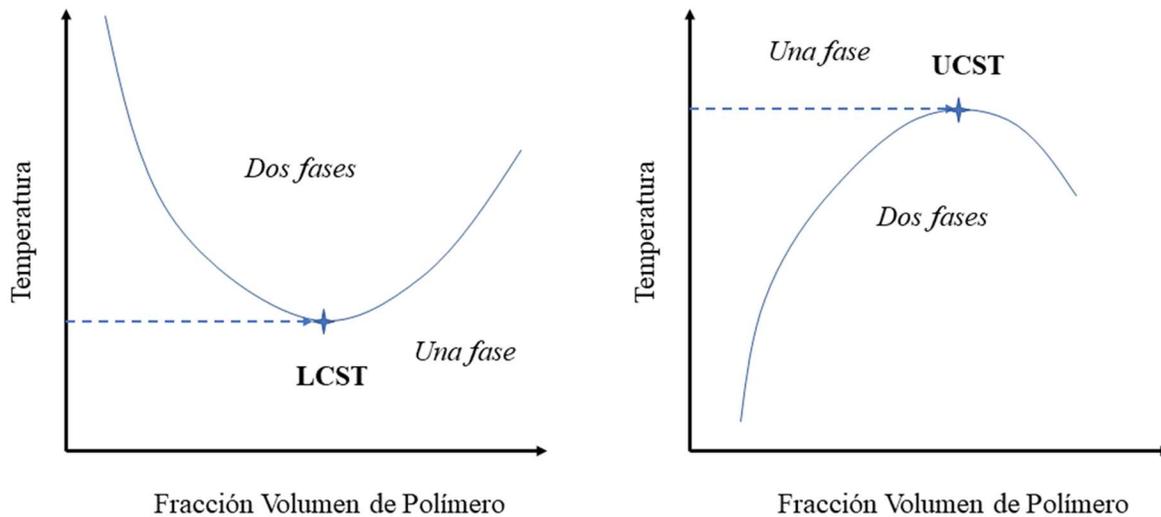


Figura 6. Diagrama de fases que identifica los comportamientos termosensibles de polímeros con LCST y UCST.

Un sistema acuoso que tenga disuelto un polímero con LCST sufrirá un cambio conformacional en sus cadenas de forma "bobina-glóbulo-agregado" cuando la temperatura va aumentando (observe la Figura 7). Mucho se ha especulado respecto a la explicación de este comportamiento. Algunas investigaciones señalan que debido a que los enlaces tipo puente de hidrógeno entre el agua y el polímero se rompen, la separación de fases ocurre (Tucker & Stevens, 2012). Otra de las probables razones es el reacomodo de las moléculas de agua respecto a la parte hidrofóbica que conforma la molécula, ya que esta suele ser incompatible con la cadena hidrocarbonada y los grupos metilos, lo que conduce al colapso de las cadenas del polímero (glóbulo) (Werner, et al., 2017).

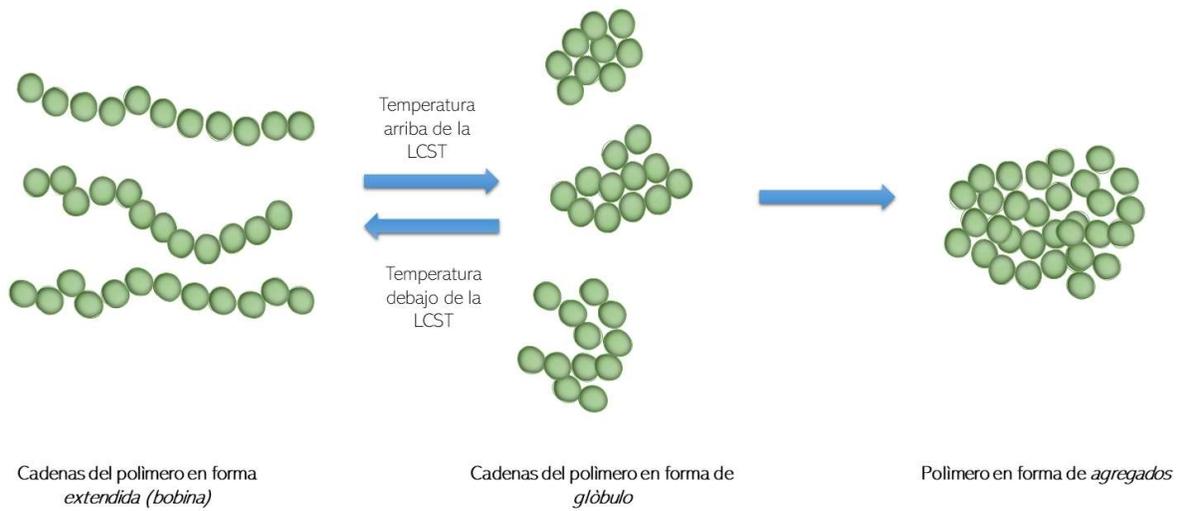


Figura 7. Se muestran las conformaciones de las cadenas poliméricas provocadas por los cambios en la temperatura.

Como se mencionó anteriormente, la respuesta a la temperatura de los polímeros se debe en gran parte a las interacciones químicas presentes en los sistemas. Llama particularmente la atención por esta propiedad los polímeros de acrilamida N-sustituídos como son la poli(vinil caprolactama) (PVCL), el poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato) (PDMAEMA) y la poli(N-isopropilacrilamida) (PNiPAAm). La ventaja que poseen este tipo de polímeros es que su respuesta a la temperatura puede ser modificada según se requiera si se incorporan comonómeros o cadenas laterales que posean valores hidrofílicos/hidrofóbicos distintos. La adición de grupos hidrófobos generalmente elevará el valor de la LCST. Algunas de las formas físicas en las que se presentan estos polímeros son: cadenas lineales libres, geles entrecruzados, injertado en superficies y en micro/nanopartículas. Las formas con cadenas lineales generalmente responden disolviendo/precipitando el polímero, mientras que los geles exhiben un comportamiento reversible respecto a su hinchamiento.

1.3 Los polímeros y algunas de sus aplicaciones en el área biológica

Dadas las necesidades actuales de distintos campos de la ciencia como la medicina y biología, se ha desarrollado una extensa cantidad de polímeros que poseen cualidades especiales; es de particular interés aquellos que al ser puestos en contacto con sistemas biológicos (células u organismos vivos) presenten una alta biocompatibilidad, baja o nula toxicidad, baja respuesta inmunológica, mínimos efectos secundarios, biodegradabilidad, y en ocasiones, efecto antiadherente. Las características deseadas aunado al proceso de síntesis del material dependerán por supuesto del uso final del mismo.

En las siguientes líneas se detallan los polímeros utilizados en este trabajo y algunas de sus características por las que fueron seleccionados para el alcance de los objetivos del proyecto.

1.3.1 PNiPAAm

La poli(N-isopropilacrilamida) (PNiPAAm) es un polímero anfifílico; su hidrofiliidad se explica gracias al grupo amida presente en su estructura, lo cual puede apreciarse en la Figura 8. Una vez que su monómero, la N-isopropilacrilamida (NiPAAm) polimeriza, la cadena hidrocarbonada de su estructura junto con el grupo isopropilo son los responsables de su carácter hidrófobo.

Al ser colocado en agua, la PNiPAAM presenta un comportamiento poco usual respecto a su solubilidad cuando varía la temperatura del medio; esto es, la PNiPAAM es soluble en agua por debajo de su LCST, la cual señala la temperatura máxima en la que el polímero se encontrará disuelto, una vez que este valor se rebasa, las cadenas de PNiPAAM colapsan y precipitan en la disolución, lo que también se conoce como solubilidad inversa respecto a la temperatura (Schild, 1992).

La PNiPAAM posee un punto de transición de fase alrededor de los 32 ° C en disolución acuosa. Se ha encontrado que esta temperatura puede depender del peso molecular o de la concentración en que se encuentre disuelto, además de si se encuentra como parte de un copolímero (Kolouchová, et al., 2021) (Plunkett, et al., 2006); por supuesto que, si la PNiPAAM es hinchada en otro disolvente este valor de transición será distinto. Por encima de este valor y gracias a la deshidratación del grupo amino, el polímero responde de forma tal que se muestra un cambio en su conformación de bobina a glóbulo, es decir, las cadenas pasan de estar extendidas a enrollarse minimizando su contacto con el agua. Este comportamiento se debe a un balance de fuerzas atractivas y repulsivas entre los grupos funcionales del polímero y el agua.

Específicamente para la PNiPAAM, estudios han demostrado que “cuando éste se encuentra en disolución y la temperatura se va acercando al valor de transición, los puentes de hidrógeno formados entre el N-H y C=O del grupo amino, así como los del agua que rodean a la cadena se rompen, colapsando la molécula del polímero y formando interacciones hidrofóbicas. Esto sigue sucediendo conforme la temperatura aumenta, dando lugar a mayores interacciones hidrofóbicas expulsando las moléculas del

disolvente (agua), causando la agregación de las cadenas del polímero y su separación del medio de disolución” (Teotia, et al., 2015).

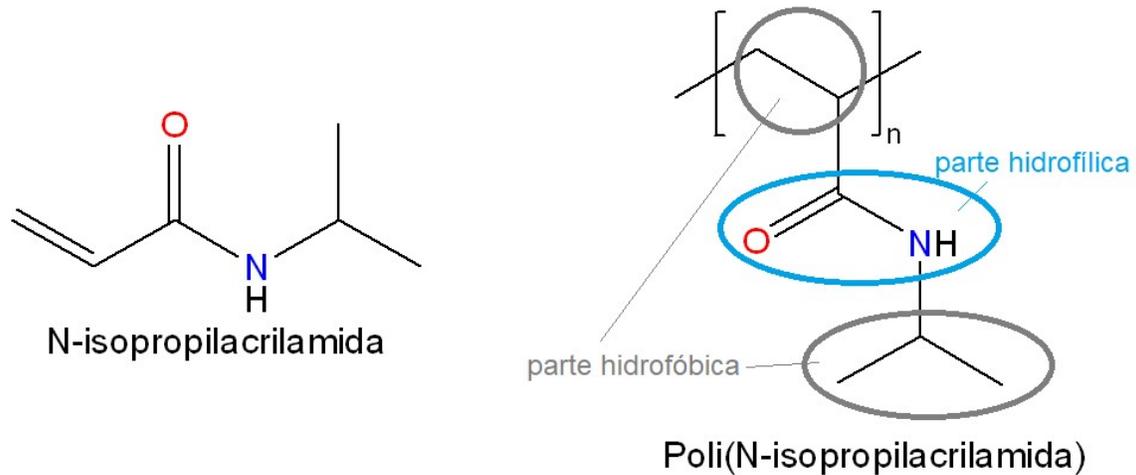


Figura B. Estructura química de A) monómero de NiPAAm y B) polímero de NiPAAm señalando las partes hidrofóbicas e hidrofílica de la molécula.

Dentro de sus aplicaciones, el polímero se ha utilizado en la ingeniería de hojas celulares, la cual consiste en sembrar y cosechar células en forma de superficies planas (hojas) para que estas puedan ser utilizadas posteriormente en la ingeniería de tejidos. A temperaturas debajo de su LCST, se ha conseguido que las células se adhieran y crezcan en este tipo de superficies. Una vez que la temperatura disminuye y la superficie adquiere mayor carácter hidrofílico, las células se desprenden del sustrato en forma de 'hoja', de ahí el nombre; esta técnica se ha utilizado para el cultivo de células de riñón, epiteliales y co-cultivos de células pulmonares (Teotia, et al., 2015). Otras aplicaciones interesantes son la separación cromatográfica basada en las interacciones hidrofóbicas de los componentes.

1.3.2 PEG

El polietilenglicol (PEG) es un polímero formado por la condensación del óxido de etileno y agua, con fórmula general $HO(CH_2CH_2O)_nH$. Debido a su estructura (véase Figura 9), el PEG es un polímero lineal con carácter anfifílico. El PEG llega a ser utilizado como sinónimo de poli(óxido de etileno) (PEO) ya que la composición y estructura se corresponden; sin embargo, se ha establecido denominar PEO las cadenas poliméricas con peso molecular mayor a 50000 Da (Hacker & Mikos, 2011). El PEG con $M_n \leq 1000$ suele ser un material líquido, viscoso a temperatura ambiente y conforme la cadena va creciendo, se obtienen ceras con punto de fusión cercanos a los $67^\circ C$; los pesos moleculares más grandes corresponden a polímeros solubles en agua con apariencia de sólidos blancos.

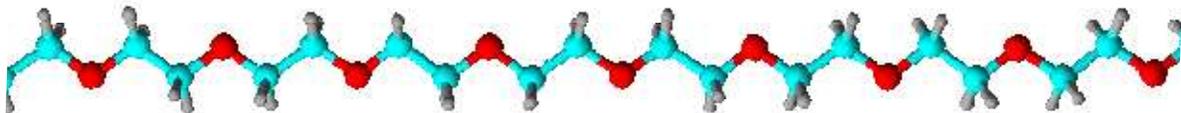
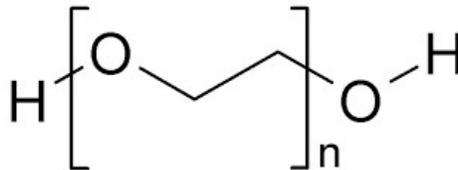


Figura 9. Estructura química del PEG.

Su uso como biomaterial se ha visto favorecido debido a que su estructura es susceptible de hidrólisis, presenta un alto carácter hidrofílico,

bioinerticidad y alta biocompatibilidad, por estas razones es frecuentemente utilizado en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia y de consumo ya que su uso ha sido clasificado como seguro por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés).

El PEG es soluble en disolventes como agua, alcohol, ésteres, cetonas, compuestos aromáticos e hidrocarburos clorados, mas no así en alcanos, parafinas, ceras y éteres.

Hasta la fecha no se han reportado efectos adversos a la salud humana exceptuando algunas situaciones donde se han administrados cantidades muy grandes a personas con hipersensibilidad o que padecían previamente de alguna enfermedad (Leung, 2014).

1.4 Hidrogeles

Los hidrogeles son macromoléculas con morfología de una red tridimensional, es decir, están compuestos de polímeros que se entrecruzaron por medio de interacciones físicas (fuerzas intermoleculares) (El-Sherbiny & Yacoub, 2013), es decir, que una misma cadena polimérica puede crear nuevas interacciones entre ella misma o con otras cadenas por medio de enlaces físicos, aunque también puede entrecruzarse creando nuevas interacciones químicas (enlaces químicos). La representación de las interacciones químicas o físicas entre cadenas se muestran en la Figura 10.

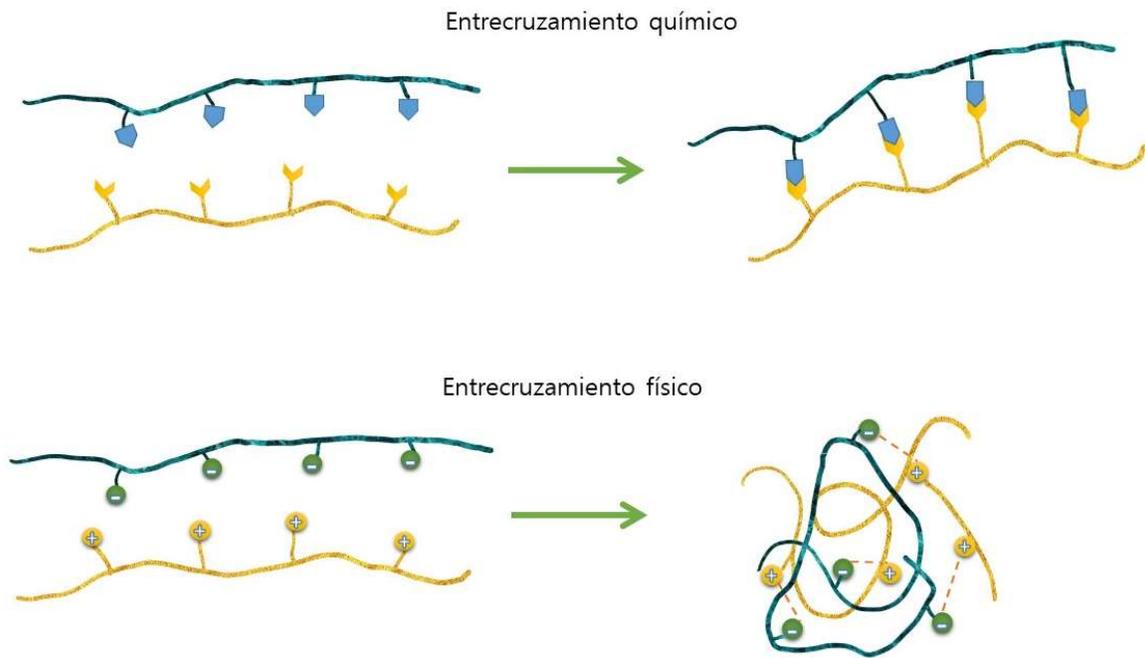


Figura 10. Tipos de entrecruzamiento por el que se obtiene un hidrogel.

Los polímeros constituyentes de los hidrogeles poseen carácter hidrofílico. Una vez formados, lo que se obtiene es un material con características macroscópicas de sólido porque posee una forma definida además de que no puede fluir; sin embargo, a escala molecular presentan rasgos propios de una disolución (Tanaka, et al., 2005) porque, aunque son imposibles de disolver, los hidrogeles difunden moléculas afines al agua, absorbiendo una gran cantidad de estos disolventes, dando como resultado el hinchamiento de su estructura. Es precisamente en estado 'hinchado' donde los hidrogeles poseen consistencia suave y elástica que se asemeja en gran medida a la de los tejidos vivos (Dragan, 2014) (Chai, et al., 2017). Estas características también han encontrado diversas aplicaciones en el área biomédica como son: el cultivo celular, la ingeniería de tejidos, la liberación de fármacos, pruebas de citotoxicidad, lentes de contacto, entre otros (Maltman & Pzryborski, 2010).

Las características más sobresalientes de los hidrogeles son su capacidad para retener agua, su permeabilidad y su porosidad. La presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, y amino explica su gran afinidad con el agua. En comparación con otros materiales absorbentes, existen hidrogeles que embeben agua desionizada de 1000 a 100000 veces su peso, estos hidrogeles se denominan *superabsorbente* o SAP (de inglés super absorbent polymer) (Cipriano, et al., 2014) (Zohuriaan-Mehr & Kabiri, 2017) (Sua, et al., 2022). Una de sus más interesantes aplicaciones se encuentra en la agricultura, ya que estos materiales pueden almacenar agua y transportarla a zonas áridas y con altas temperaturas. Zonas áridas se ven beneficiadas con el uso de los SAPs ya que ralentiza la evaporación del agua, manteniendo la humedad del suelo e incluso pudiendo liberar agentes fertilizantes (Ai, et al., 2021).

Otras propiedades que influyen en el comportamiento de los hidrogeles son el peso molecular promedio de las cadenas entre los puntos de entrecruzamiento, su densidad de entrecruzamiento y su tamaño de poro. Este último parámetro determina muchas veces el desempeño del material en el transporte activo de distintas sustancias de interés (metabolitos, nutrientes, medicamentos, etc.) (Malmonge, 2017).

Estas macromoléculas pueden estar compuestas de materiales estímulo-sensibles, por lo que pueden poseer la propiedad de responder con un cambio significativo en su volumen cuando una pequeña variación del pH, temperatura, fuerza iónica, campo eléctrico o luz se produce en el ambiente que los rodea.

1.4.1 Redes Interpenetrantes

Las redes interpenetrantes (IPN) son un tipo de hidrogeles particulares cuya estructura se distingue por estar constituida por dos (o más) arreglos poliméricos entramados (forman redes), las cuales están entrelazadas independientemente de tal manera que no están unidas covalentemente entre sí y, sin embargo, no pueden separarse la una de la otra, es decir, es el equivalente a tener un hidrogel embebido en (por lo menos) otro hidrogel.

La Figura 11 muestra distintos tipos de mezclas que pueden obtenerse al combinar 2 polímeros distintos.

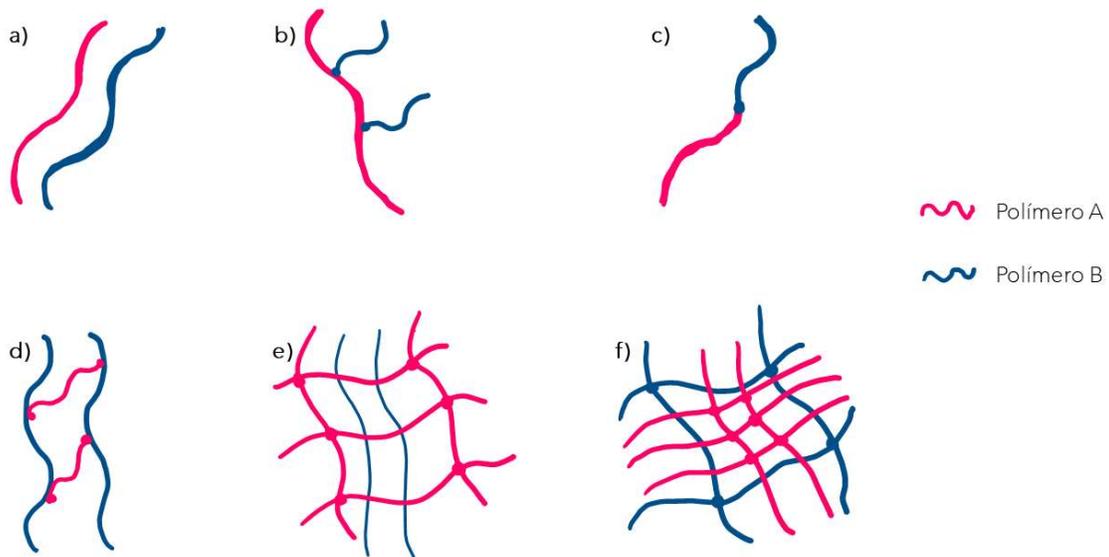


Figura 11. Mezclas de polímeros donde se observa: a) Mezcla sin enlaces; b) Polímeros de injerto; c) Polímeros de bloque; d) Polímero de injerto tipo AB donde se obtiene una sola red con dos polímeros; e) Red Semi-Interpenetrante y f) Red Interpenetrante.

Existen dos métodos de síntesis: a) método simultáneo, donde las redes que darán origen a la IPN se entrecruzan al mismo tiempo, pero de forma independiente (p. ej. siguiendo un mecanismo en cadena y uno por pasos); b) método secuencial, en donde se sintetiza la primera red polimérica, la cual es posteriormente hinchada en una disolución monomérica del segundo polímero que finalmente es entrecruzado. Es importante subrayar que las IPNs no pueden ser separadas por métodos físicos, sino solamente rompiendo los enlaces químicos de su estructura.

Una de las ventajas y diferencias propias de las IPNs respecto a los otros tipos de mezclas poliméricas es que, las características químicas y propiedades físicas de la IPN resultante son producto de la sinergia de ambos materiales, teniendo como resultado un mejor rendimiento que el de los polímeros originales (Roland, 2013). Un ejemplo es el que Xiang-Zhen y colaboradores mostraron al sintetizar una IPN con dos hidrogeles de PNiPAAm embebidos, esta segunda red mejoró notablemente las propiedades mecánicas del PNiPAAm sin comprometer la liberación controlada de albúmina sérica bovina (modelo de liberación de proteína) y la respuesta a la temperatura (Xiang-Zheng, et al., 2004). Otra mejora fue publicada por Wang en la adsorción de elementos metálicos al sintetizar una IPN de poli(polietilen glicol diacrilato) y poli(metacrilamida), ya que esta mostró ser un sistema de respuesta rápida, de gran capacidad y una opción renovable para en el proceso de remoción de iones metálicos (Wang, et al., 2011). (Goujon, et al., 2011).

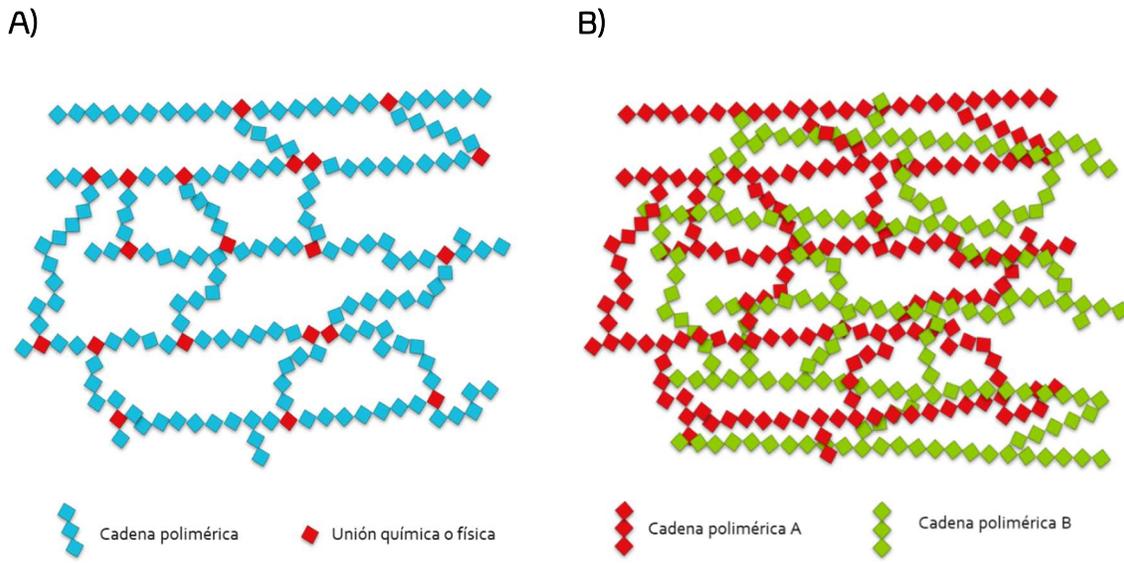


Figura 12. Representación de la estructura de: A) un hidrogel, donde puede observarse que las cadenas poliméricas están unidas formando una red; B) una red interpenetrante, las redes A y B comparten el mismo espacio, pero no tienen enlaces entre sí.

Otra característica propia de las IPN es que la longitud de las cadenas entre los puntos de reticulación o entrecruzamiento determinan el dominio de la IPN, esto es, si la longitud de la cadena entre cada punto de entrecruzamiento es pequeña, obtendremos pequeños dominios dentro de la red (para tener una idea general de la estructura de un hidrogel y de una red interpenetrante, puede verse la Figura 12). Ahora, la solubilidad del sistema puede ir aumentando, mientras la longitud de las cadenas sea más corta; sin embargo, en comparación con la mezcla polimérica la miscibilidad de la IPN es menor cuando en una red interpenetrante se tienen demasiados puntos de entrecruzamiento presentes (Sperling, 1994).

1.5 Heridas y cicatrización

Por definición, una herida es una interrupción en la continuidad de la piel como resultado de un daño físico, químico o térmico (Herman & Bordoni, 2022). Las heridas son clasificadas principalmente por su tiempo de cicatrización y la naturaleza de su origen: se dice que son agudas si fue causada de forma repentina, como resultado de un accidente o una cirugía, su tiempo para curar es de 8 a 12 semanas; en cambio, serán denominadas crónicas si su tiempo de cicatrización es mayor a 12 semanas debido a que la naturaleza de su causa puede ser una enfermedad subyacente como la diabetes, una deficiencia inmunitaria, una enfermedad arterial periférica, también pueden deberse a úlceras debido a que el paciente está inmovilizado, asimismo puede ser debido quemaduras graves. Algunos estudios incluso señalan que las heridas crónicas pueden deberse a envejecimiento celular producido por estrés.

El proceso de cicatrización de una herida dependerá por tanto de la salud de la persona que la haya sufrido y la gravedad de la lesión (Guo & DiPrieto, 2010) (Wallace, et al., 2022). Sin embargo, para asegurar una buena cicatrización, es preciso que se lleven a cabo los cuidados necesarios, lo que incluye acompañar al sitio dañado a lo largo de su proceso de recuperación para que vuelva a la normalidad lo más pronto posible. El proceso de cicatrización se divide en 4 etapas, las cuales son continuas y aunque suelen seguir el orden que se propone a continuación (Sorg, et al., 2017) (Phillips, 2000), a menudo suelen traslaparse:

- i) *Homeostasis*. Inmediatamente después de que la herida se ha formado, las plaquetas sanguíneas empiezan a aglomerarse en

la herida para intentar detener el sangrado, por lo que se produce un coágulo.

- ii) *Inflamación*. Esta fase se caracteriza por ser la causante de dolor e hinchazón en la zona, además que hay una mayor concentración de macrófagos y neutrófilos que se dedican a eliminar detritus celulares, partículas extrañas y algunos microorganismos. Aunado a esto, se liberan distintos factores de crecimiento que promueven la migración de fibroblastos. A su vez, también se forman nuevos vasos sanguíneos a través de vasos preexistentes (angiogénesis).
- iii) *Crecimiento del tejido*. Esta etapa también se conoce como proliferación ya que los fibroblastos abundan por toda el área generando tejido granular y depositando proteínas que conforman la matriz extracelular, en su mayoría, colágeno. Asimismo, se llevará a cabo la reepitelización del sitio, ya que nuevas células epiteliales migrarán al lugar de la herida sobre el tejido de granulación.
- iv) *Remodelación del tejido*. La fase de remodelación o maduración es aquella donde la cicatriz alcanza sus características mecánicas finales las cuales serán de alrededor del 80% de las originales. En un inicio, las fibras de colágeno que se produjeron se encuentran dispuestas al azar, por lo que el tejido no es muy resistente. Cuando las fibrillas se van ordenando y aumentan las uniones interfibrilares, la cicatriz se contrae a su máximo (cierra) y se alcanza el máximo de su resistencia.

Después de la limpieza del área, generalmente la piel es recubierta con un material que permita aislar la herida para una mejor recuperación, protegiendo al mismo tiempo al tejido de infecciones. Estos recubrimientos se denominan apósitos para heridas.

1.5.1 Apósitos para heridas.

Se denomina apósito a aquel material que es colocado directamente sobre una herida suministrando protección para el sitio y promoviendo una pronta recuperación (Britto, et al., 2022). Dependiendo de las características del tejido donde se encuentre la herida y de las necesidades específicas para la recuperación que requiera la lesión, es cómo se selecciona el tipo de apósito más adecuado; por ejemplo, deberá tomarse en cuenta si hay exudado, de qué clase, si la herida es crónica, quirúrgica, su profundidad, etc.

Tradicionalmente, las gasas, vendajes, fibras y parches de materiales como algodón, lino e incluso algunos poliésteres han asistido en el proceso de curación; sin embargo, si bien estos apósitos en primera instancia son útiles en la contención del flujo sanguíneo y como barreras físicas contra la entrada de microorganismos y bacterias en el área afectada, su uso presenta algunas desventajas ya que deben ser revisados y cambiados constantemente para evitar el reblandecimiento y descomposición de la piel (proceso de maceración), lo que a su vez reduce la rentabilidad de los productos; además, con el tiempo, estos apósitos tienden a adherirse a la piel cicatrizante, por lo que se vuelve molesto y doloroso para el usuario. Con el desarrollo de nuevos materiales, ha sido posible diseñar nuevas opciones que contribuyan a una más rápida y mejor recuperación. Por esta razón,

además de cubrir la herida, los apósitos de hoy en día deben cumplir con algunos requisitos, como son:

- ✧ Poseer biocompatibilidad
- ✧ Promover la hidratación celular a través de la creación o mantenimiento de un ambiente húmedo
- ✧ Contribuir a la asepsia de la herida previniendo infecciones bacterianas
- ✧ Capacidad de absorción para, en caso de ser necesario, recoger los posibles exudados
- ✧ Tener buenas propiedades mecánicas
- ✧ Permitir el intercambio de gases entre la herida y el ambiente
- ✧ Mantener la temperatura adecuada
- ✧ Proveer un microambiente apropiado para promover la adhesión, proliferación y diferenciación celular
- ✧ Toxicidad nula
- ✧ Control de olores

Actualmente, existe una amplia oferta de apósitos que ofrecen estas características, algunos incluso son ya comercializados y otros siguen en investigación. Entre los materiales que destacan por cumplir (la mayoría de) los requisitos antes mencionados y así mejorar el proceso de cicatrización, están los materiales basados en polímeros, ya sea sintéticos, naturales o mixtos. Las formas más comunes en las que se encuentran los apósitos

poliméricos son en películas, membranas y espumas semipermeables, hidrocoloides e hidrogeles. Debido a las propiedades particulares que poseen los hidrogeles (como son su estructura altamente porosa, su capacidad de retención de agua que les da una consistencia similar a los tejidos humanos, la respuesta estímulo-sensible a cambios en el medio, su capacidad antimicrobiana y la posibilidad de suministrar controlada y sostenidamente fármacos), estos han sido objeto de discusión.

Los polímeros naturales que más se han estudiado en este ámbito son el alginato de sodio, el colágeno y el quitosano. A pesar de los buenos resultados que se han obtenido, la discusión respecto a la reproducibilidad de los resultados sigue en pie, por ejemplo, debido a diferencias en el peso molecular del quitosano de un lote a otro, sus propiedades bioactivas se ven modificadas; en el caso del colágeno, se ha reportado riesgo de contaminación debido a patógenos propios de la fuente de la que fue obtenido. En este sentido, los polímeros sintéticos exhiben cierta ventaja dado que son diseñados específicamente para cubrir requerimientos específicos y no dependen de una fuente natural. Por tanto, se considera que mejores resultados pueden ser obtenidos al trazar una estrategia que combine el uso de polímeros sintéticos y naturales.

1.5.2 Hidrogeles como apósitos para heridas

Como se ha visto, existen muchas razones por las cuales los hidrogeles son utilizados hoy en día con mucha frecuencia en el área de ingeniería de tejidos (piel, tejido adiposo, músculo). A continuación, se mencionan las mejores razones para utilizar estos materiales como apósitos de heridas.

- ✧ El proceso de cicatrización se ve beneficiado por la semejanza que presentan los hidrogeles con la textura de los órganos y la cantidad de agua que poseen.
- ✧ Ayudan aliviando la herida al mantener el sitio con la temperatura adecuada (efecto calmante y refrescante).
- ✧ Son de fácil aplicación.
- ✧ Pueden ser retirados fácilmente y no se unen al tejido cicatrizante.
- ✧ Debido a su estructura altamente porosa, ofrecen la posibilidad de contener fármacos, factores de crecimiento y otros agentes que coadyuven a la regeneración y proliferación celular.
- ✧ Son capaces de disminuir el riesgo de sufrir una infección en el sitio de la herida ya que sus superficies pueden ser funcionalizadas de tal forma que presenten grupos químicos que repelan la adhesión de proteínas, microorganismos o células.

1.5.3 Infecciones debidas a heridas

La piel, el órgano más grande en extensión del cuerpo humano, cumple variadas e importantes funciones: protección contra la radiación UV, regulación de la temperatura corporal, producción de vitamina D, órgano sensor de temperatura y tacto, excreción de toxinas (Anon., s.f.), pero, sobre todo, es el órgano responsable de protegernos contra lesiones causadas por medios mecánicos, temperaturas extremas y sustancias peligrosas. Una vez que la piel ha sido herida, existen diversos factores que pueden afectar el proceso de curación. Las infecciones suelen ser un problema recurrente debido a que la herida se convierte en un sitio con características favorables

para promover una colonización. Para su reproducción, los microorganismos necesitan nutrientes los cuales tomarán del huésped; el ambiente proporcionado por la herida es húmedo, lo que favorece el crecimiento de los microbios; la temperatura y acidez del medio suelen también ser adecuados, por lo que una vez que estos proliferan, el sitio se denominará colonizado. Ahora bien, el proceso de cicatrización de forma saludable se puede ver entorpecido si la o las colonias dominantes que habitan la herida son patógenas (colonización crítica). Llegado a este punto, no hay marcha atrás, debe realizarse una intervención y dar tratamiento (suministro de medicamentos) ya que la infección puede empeorar al punto de volverse sistémica. Hoy en día esto es un asunto de particular preocupación debido a la observada resistencia bacteriana a los antibióticos por parte de organismos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides* spp., *Porphyromonas* spp., entre otras, que son microorganismos normalmente presentes en los nosocomios (Kramer & Maassen, 2009) (Bowler, et al., 1999) y que se clasifican como potencialmente patógenas.

Así, incluso cuando las heridas han sido tratadas con la profilaxis adecuada, es fundamental reducir los riesgos de infección. Una forma de lograrlo es minimizando el cambio de apósitos, aumentar la capacidad de retención del exudado y así disminuir la exposición a contaminantes. Otra forma, es eliminar activamente las bacterias a través del uso de recubrimientos antimicrobianos, aunque de nueva cuenta esto promueve la resistencia antibacteriana. Finalmente, una manera de combatir la presencia de microorganismos es mediante estrategias preventivas de adherencia de proteínas y formación de biopelículas, ya que estas son las precursoras del

anclaje de las bacterias en la superficie y las que dan lugar posteriormente a su proliferación.

1.6 Adherencia

La adhesión indeseada de macromoléculas, microorganismos, proteínas o células sobre superficies es un grave problema que acorta la vida útil y complica el funcionamiento de dispositivos en distintas y diversas áreas como son la medicina, la marina y la industria en general; por ejemplo, en el área médica el 'fouling' (término en inglés) se traduce en riesgos a la salud y aumento de la mortalidad ya que incrementa la probabilidad de complicaciones en pacientes debido al desarrollo de infecciones o el rechazo de dispositivos médicos; por otro lado, la industria marítima reporta grandes pérdidas económicas y daños ambientales irreparables debido a que la acumulación de plantas, algas y microorganismos en los cascos de los barcos producen una disminución en la velocidad, un incremento en el uso de combustible hasta del 40% (Anon., 2018) y la introducción de especies ajenas en nuevos hábitats, lo que puede conducir a un deterioro del ecosistema. En el ámbito industrial, los equipos también se ven seriamente afectados debido a que los grandes volúmenes de material incrustado representan reducciones en la eficiencia de los equipos, pérdidas de presión, disminución de la calidad de los productos, aumento en la cantidad de energía eléctrica utilizada, entre muchos otros inconvenientes.

Las Propiedades 'antifouling' están determinadas por:

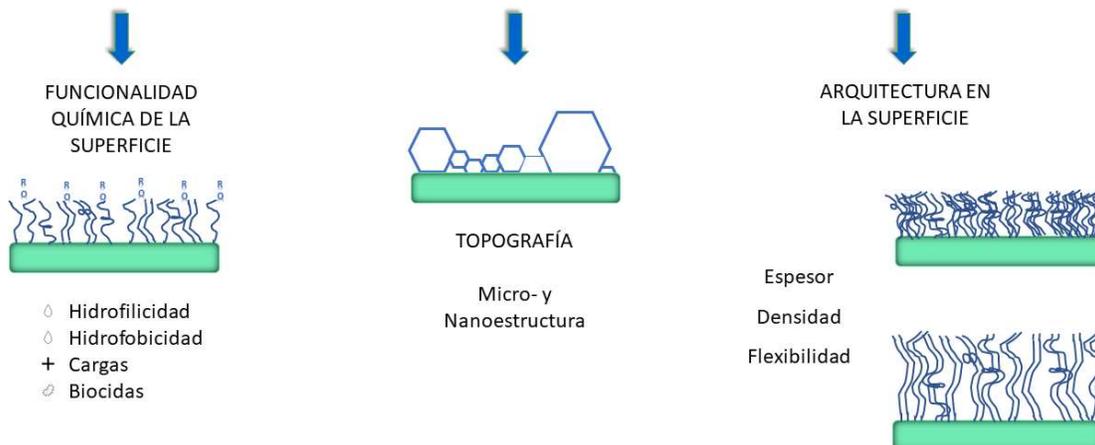


Figura 13. Factores que influyen en las propiedades antiadherentes de una superficie.

Un diseño exitoso de superficies antiadherentes depende de la manipulación de tres elementos principales: la química superficial del material y sus interacciones con el contaminante, la topografía superficial y la arquitectura que la superficie posea (Figura 13). Estos elementos determinan, por ejemplo, si las superficies podrán formar micro-dominios donde las partículas contaminantes no sean capaces de anclarse, donde debido a la presencia de ciertos grupos químicos el contacto entre la superficie y el material indeseado no se favorece, entre otros.

Como solución a este inconveniente, se ha planteado la obtención de superficies que posean propiedades antiadherentes ('antifouling' en inglés) a través de recubrimientos que impidan la acumulación de materia orgánica o inorgánica en las áreas expuestas a contaminantes o por medio de la

capacidad intrínseca del material para rechazar el material adherente. Para diseñar una mejor estrategia, es importante distinguir los tipos de contaminantes que pueden depositarse en la superficie:

- Orgánicos: principalmente moléculas orgánicas como polisacáridos, proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.
- Inorgánicos: sales y óxidos metálicos que suelen ser productos de procesos corrosivos.
- Particulados: por ejemplo, partículas coloidales.
- Biológicos: el término suele conocerse como “biofouling” y se refiere a la acumulación y asentamiento de material orgánico en forma de películas que dan lugar a la formación de recubrimiento de microorganismos, lo que puede conducir finalmente al crecimiento de macroorganismos.
- Mixtos: en una misma superficie pueden producirse varios tipos de contaminación.

Las estrategias que se han explorado para evitar que exista material en la superficie se han ilustrado en la Figura 14 y se han dividido esencialmente en tres:

- a) Desarrollo de superficies con antiadherencia
- b) Desarrollo de superficies con fácil desprendimiento o baja resistencia
- c) Desarrollo de superficies degradantes

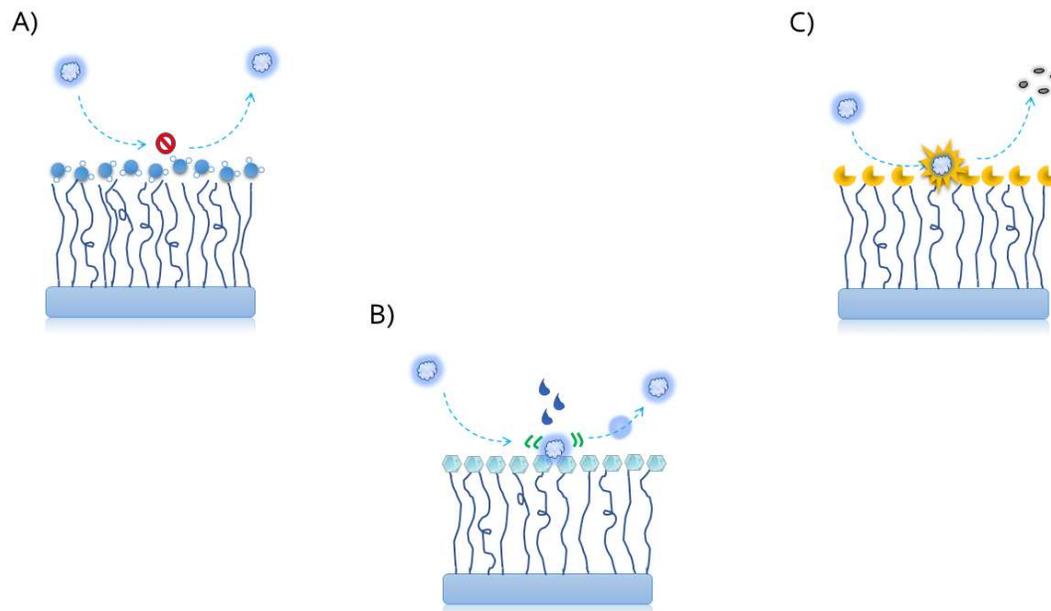


Figura 14. Superficies que muestran distintos tipos de antiadherencia. A) Superficies con antiadherencia por capa hidrofílica; B) Superficies antiadherentes con baja resistencia; C) Superficies antiadherentes por degradación de contaminantes.

Como se aprecia, el triunfo del material adherido depende de las interacciones físicas y químicas que suceden entre las moléculas de la superficie y las del contaminante.

El desarrollo de superficies con antiadherencia (Maan, et al., 2020) se distingue porque las superficies están diseñadas para contener grupos hidrofílicos, los cuales se cree, son responsables de la formación de una capa o película de moléculas de agua que actúa como barrera física para que los contaminantes y la superficie no puedan interactuar (Figura 14, inciso B). Generalmente, también están compuestas por grupos eléctricamente neutros.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Sustancias y disolventes

En el presente trabajo se utilizó PEG con dos distintos pesos moleculares promedio en número (M_n de 20000 y 6000). Este reactivo fue adquirido de Wako Pure Chemical Industries LTD (Japón), se pulverizó en un mortero para homogeneizar su tamaño y se dejó en un desecador a vacío durante 24 h previo a su utilización. La NiPAAm se adquirió de Sigma-Aldrich (EUA) y se purificó por recristalización como se describe posteriormente. El tetratetilenglicol dimetacrilato (4EGDMA), persulfato de amonio (PSA) y tetrametiletilendiamina (TEMED), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El 4EGDMA y el TEMED fueron pasados por una columna de alúmina previamente a su utilización. Todas las pruebas de hinchamiento fueron llevadas a cabo utilizando agua bidestilada.

2.1.1 Purificación del monómero de NiPAAm

Para remover las impurezas y el inhibidor presentes en la NiPAAm, se realizó una recristalización utilizando como disolventes una mezcla de hexano/tolueno en proporción 7:3. Los pasos se detallan a continuación:

1. Se calentó la mezcla de disolventes a 40 ° C. *Nota: Es importante que la temperatura no sobrepase este valor, ya que puede promoverse la reacción de autopolimerización.*

2. Se agregó NiPAAm a la mezcla hasta disolverse completamente.
3. Posteriormente, se filtró por gravedad para eliminar las impurezas sólidas.
4. Para inducir la recristalización, se disminuyó la temperatura de la disolución utilizando un baño de hielo hasta que los cristales de NiPAAm comenzaron a precipitar.
5. Luego, la mezcla se filtró a vacío y se dejó evaporar el exceso de disolvente. El procedimiento se repitió 2 veces más.
6. Después, el monómero se colocó en un desecador a vacío durante 48 horas y se pesó.
7. Finalmente, se colocó en un recipiente, se selló y se guardó a 4 ° C.

2.2 Instrumentación y equipo

2.2.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

La caracterización por IR se llevó a cabo en un equipo Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer CETUS Instruments, Norwalk, CT, EUA) por medio de la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) y equipado con punta de diamante. Los datos se expresan en número de onda (cm^{-1}) para las señales con máximo de absorción.

2.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para determinar la LCST, los experimentos se llevaron a cabo en un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC 2010 (TA Instruments, New Castle,

DE, EUA), bajo atmósfera de nitrógeno con flujo de 60 mL/min, con una rampa de calentamiento de 1 °/min, en un intervalo de estudio de 20 a 40 °C con una muestra de IPN previamente hinchada en agua.

2.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para analizar el tamaño de poro y la estructura aparente de los mismos, se realizaron microscopías electrónicas en un equipo JSM-7600F (Jeol Ltd., Akishima, Tokio, Japón). El voltaje de aceleración utilizado fue 10 kV.

El equipo se encuentra en Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica dentro del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

2.2.4 Fuente de irradiación

La irradiación se llevó a cabo con una fuente de rayos gamma provenientes de lápices de ^{60}Co en un Gamma Beam 651 PT (Albarrán, et al., 2017) de tipo de alberca profunda (Nordion, Canadá) que se encuentra en la Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias Nucleares.

2.2.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido de ^{13}C se llevó a cabo en un equipo Bruker Avance III HD 400 MHz Spectrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemania) con sonda PH 400SB BL4 N-P/H VTN 4 mm. El equipo se encuentra en el Laboratorio de RMN del Instituto de Investigaciones en Materiales.

2.2.6 Espectrofotometría UV-Vis

Las pruebas de adhesión de proteínas se llevaron a cabo a través de la detección directa mediante absorbancia en la región UV-Vis. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis modelo Specord 200 Plus (Analytikjena, Jena, Alemania). Se utilizaron celdas de cuarzo de la marca Perkin-Elmer. Se realizó una curva de calibración de la ovalbúmina utilizando una longitud de onda de $\lambda = 280$ nm para su cuantificación (Anexo I).

2.2.7 Pruebas de microindentación y relajación

Estas pruebas se llevaron a cabo en un microindentador FT-MTA03 (FemtoTools AG, Zúrich, Suiza). Los datos de la curva de fuerza contra desplazamiento se obtuvieron con una punta esférica FT-S200 de diámetro de 50 μm con un intervalo de medición de $\pm 200 \mu\text{N}$ y una resolución máxima de 0.0005 μm (a una tasa de muestreo baja de 10 Hz). Las velocidades de indentación utilizadas para esta prueba se encuentran en el intervalo de 0-100 $\mu\text{m/s}$, con una frecuencia de muestreo de 50-100 Hz y un tamaño de paso (*step size*) de 0.2 μm .

Por otro lado, los ensayos de relajación se realizaron utilizando el mismo equipo; para este caso la punta fue programada para detenerse y mantenerse estática en su curso vertical a una profundidad fija de indentación durante el análisis de medición de fuerza. La prueba consiste en una indentación de fase con velocidad predeterminada (entre 10/200 $\mu\text{m/s}$) hasta una posición en donde el sensor detecta el valor de la fuerza predeterminado por el usuario (2-50 μN).

Este equipo se encuentra en el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

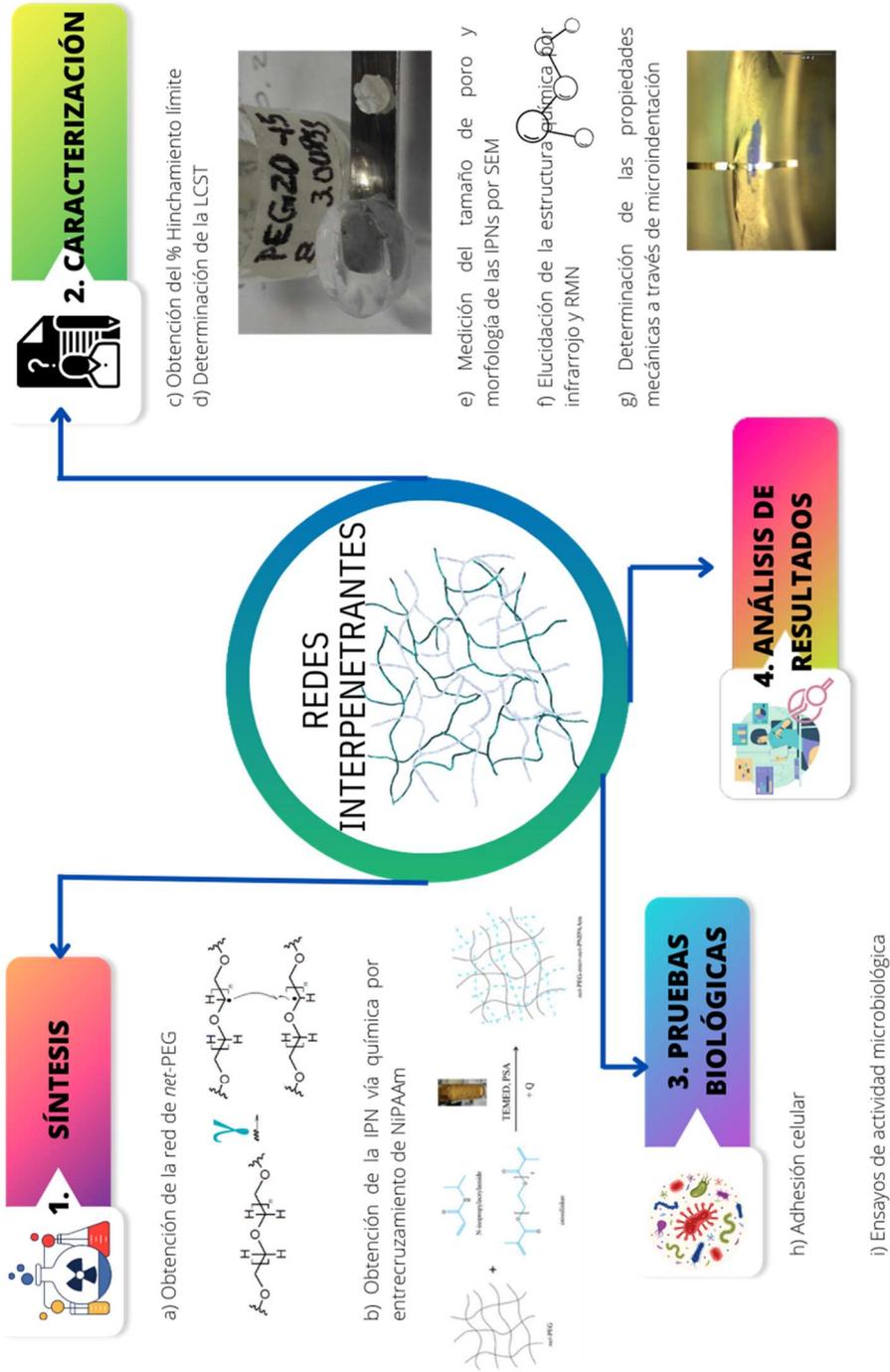
2.2.8 Ensayo de viabilidad celular

Estas pruebas se llevaron a cabo mediante el método colorimétrico de la reacción de reducción metabólica del MTT, lo cual se cuantificó a través de absorbancia UV. Se utilizó un fotómetro para microplacas Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). La longitud de onda de trabajo fue de $\lambda = 450 \text{ nm}$.

2.3 Metodología experimental

La metodología experimental se divide en las etapas principales las cuales se describen a continuación:

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



2.4 Síntesis de la red interpenetrante

2.4.1 Preparación del hidrogel *net*-PEG por radiación

El primer paso para la obtención de la red interpenetrante es la formación del hidrogel de PEG utilizando la radiación gamma (método directo) para promover el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas y obtener así el *net*-PEG. A continuación, se describe el método experimental que se siguió.

1. Se prepararon disoluciones acuosas con una concentración de 50 g/L de PEG utilizando dos diferentes pesos moleculares en número (M_n 6000 y 20000) (Figura 15).



Figura 15. Reactivos utilizados en la experimentación.

2. En un tubo de vidrio, se colocó una alícuota de 10 mL de la disolución de PEG (ya sea de M_n : 6000 y 20000) a la cual se le burbujeó argón durante 20 minutos para desplazar el oxígeno presente (Figura 16).

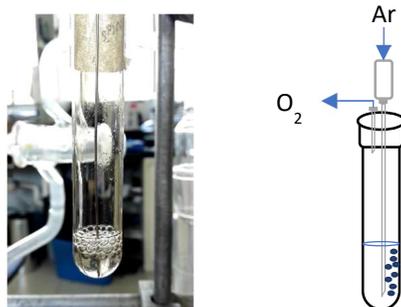


Figura 16. Eliminación de oxígeno de la disolución de PEG.

3. La disolución fue transferida a un arreglo de placas de vidrio con dimensiones de 9.5 x 3 cm, las cuales fueron previamente tratadas con diclorodimetilsilano para obtener superficies hidrofóbicas, las cuales fueron separadas por un marco de silicón de 1.2 mm de espesor (Figura 17).

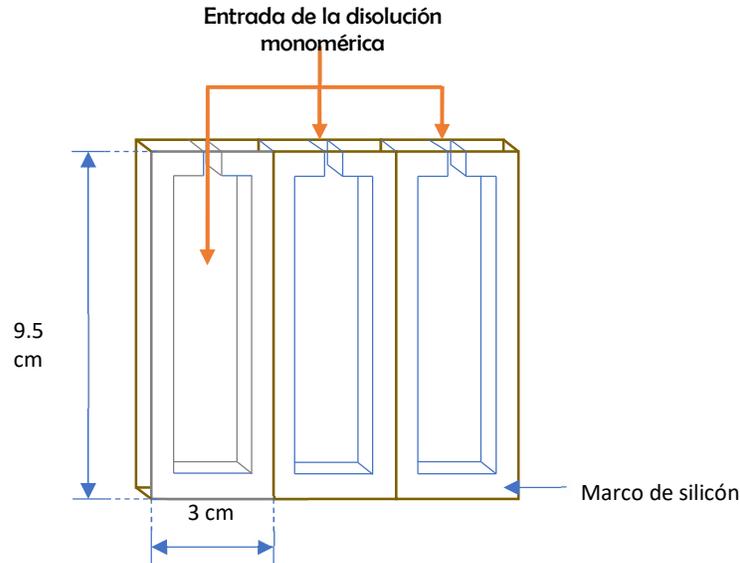


Figura 17. Preparación de las placas de PEG para su irradiación.

4. Para asegurar que no existiera ninguna fuga de la disolución polimérica, las placas y el marco de silicón fueron sellados con papel Parafilm por las orillas.
5. Posteriormente, se colocaron 3 pinzas (3/4") que aseguraron que las placas permanecieran unidas.
6. Una vez que el arreglo de placas estuvo listo, la disolución de PEG se transfirió con ayuda de una jeringa (aprox. 2 mL). La entrada se selló nuevamente con papel Parafilm y finalmente con otra pinza (Figura 18).

Observación: Para el caso donde el experimento se llevó a cabo a baja temperatura (-4°C), se preparó un baño de hielo con sal y las placas se colocaron al interior de un vaso Dewar, cuidando que el arreglo quedara completamente cubierto de hielo, luego el arreglo se tapó. Se tuvo la precaución de cambiar el hielo cada 2.5 h aproximadamente, para que la temperatura se mantuviera constante.



Figura 18. Arreglo de placas listo y colocado en el soporte para ser irradiado.

7. Con el arreglo experimental listo, se llevó a irradiar a la fuente de ^{60}Co con una intensidad de 9.2 kGy/h según la dosis requerida (5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 y 120 kGy).
8. Una vez irradiado, el sistema se desmontó y las películas obtenidas se sometieron a lavados con agua destilada, cambiando el disolvente cada 12 h.
9. Cuando las burbujas presentes en las películas de hidrogel fueron eliminadas, éstos se secaron en una campana de extracción para evaporar el excedente de agua y se colocaron en un desecador a presión reducida hasta obtener un valor de peso constante.

2.4.2 Síntesis de la red interpenetrante (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-PNiPAAm) por método químico

Una vez que el hidrogel de PEG ha sido sintetizado, es preciso realizar el paso de interpenetración con NiPAAm, para lo cual se adaptaron las condiciones de Ruiz (Ruiz, 2007) publicadas en su trabajo de tesis doctoral. El procedimiento se detalla a continuación.

1. Se prepararon disoluciones acuosas de NiPAAm con distintas concentraciones (0.3 M, 0.6 M y 1 M).
2. A esta disolución se le agregó el entrecruzante (4EGDMA) al 3% w/w, así como el iniciador (PSA) al 1.5% w/w respecto a la NiPAAm.
3. Se tomó una muestra de *net*-PEG (0.0100 g) y se hinchó en 1 mL de la disolución preparada anteriormente por lo menos durante el tiempo de hinchamiento límite.
4. Después de este tiempo, se adicionó TEMED al 1.5% w/w respecto a la NiPAAm y se colocó en atmósfera inerte de Ar por 10 min.
5. Las muestras se colocaron en un baño de aceite para iniciar la reacción a 70 ° C durante 1 h o 5 h, según fuera el caso.
6. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se retiraron de calentamiento y se retiró el excedente de mezcla de reacción.
7. Las muestras se extrajeron con agua destilada mediante difusión del disolvente, cambiando el medio cada 12 h.
8. La película se extendió en una superficie de vidrio silanizado y se dejó evaporar el agua en exceso; posteriormente, se colocó en un desecador hasta la obtención de peso constante.

9. Para obtener la cantidad de *net*-PNiPAAm presente, la muestra seca se pesó y se realizó una diferencia de peso, respecto a la muestra inicial como se muestra en la siguiente expresión:

$$PNiPAAm_{interpenetrada} = W_{IPN\ seco} - W_{net-PEG\ seco}$$

2.5 Caracterización

Los procedimientos que a continuación se describen, fueron útiles para obtener los parámetros específicos de nuestro material.

2.5.1 Determinación del porcentaje de hinchamiento límite en agua destilada a temperatura ambiente

Para conocer el tiempo de hinchamiento máximo de los sistemas, tanto para los hidrogeles de PEG (*net*-PEG) como para las IPN sintetizadas, primero se tomó una muestra seca de masa conocida (W_0).

La muestra se sumergió en un volumen de agua bidestilada. Después de transcurrido un tiempo determinado, se extrajo del medio, y se retiró el excedente de agua por medio de papel absorbente. La muestra se pesó en una balanza analítica (W_i), e inmediatamente después, se volvió a colocar en el medio para que siguiera absorbiendo agua. El procedimiento se repitió y concluyó cuando se hubo alcanzado peso constante. El porcentaje de hinchamiento se determinó por medio de la siguiente expresión:

$$\%Hinchamiento = \frac{W_i - W_0}{W_0} * 100$$

Este estudio se realizó por triplicado (al menos) a temperatura ambiente (20 °C).

2.5.2 Determinación del valor de temperatura crítica por medio de hinchamiento límite

Para determinar el valor de la temperatura crítica, se realizó un procedimiento similar al descrito en la sección anterior, cambiando la temperatura del medio. Esto se realizó como se describe a continuación:

Una muestra de masa conocida se colocó en un frasco con agua bidestilada y se colocó en un baño de temperatura al valor de interés (25, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 40 °C).

Después de haber estado en el baño maría durante al menos el tiempo de hinchamiento límite, la muestra se retiró del mismo, se removi6 el excedente de agua y se registr6 su peso. Con la misma expresi6n del % Hinchamiento, se obtuvo el comportamiento de la red interpenetrante respecto a la temperatura; si las IPNs presentan un valor de temperatura crítica, el comportamiento dar6 lugar a una gr6fica sigmoideal, donde el punto de inflexi6n corresponde al valor buscado.

2.5.3 Determinación de la temperatura crítica por medio de DSC

Para corroborar los resultados obtenidos de la temperatura crítica mediante las pruebas de hinchamiento, se realizaron pruebas de calorimetría diferencial de barrido. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- Una muestra seca (de masa conocida) se sometió al proceso de hinchamiento límite en agua descrito anteriormente.
- La muestra hinchada se encapsuló en una charola hermética junto con una gota de agua para su análisis.

2.6 Elucidación de estructura por RMN de ^{13}C en estado sólido (CPTOSSS)

La espectroscopía de RMN en estado sólido se realizó rellenando rotores de óxido de zirconio (diámetro de 4 mm) con las muestras de interés. La velocidad de rotación de las muestras fue de 5 kHz, los desplazamientos químicos fueron medidos tomando como referencia externa un estándar de tetrametilsilano (TMS). Para la adquisición de los espectros se empleó la secuencia CPTOSS con el fin de evitar el traslape de señales satélite propias de la técnica en estado sólido.

2.7 Caracterización mecánica de las películas a través ensayos de relajación e indentación

Los hidrogeles de *net*-PEG y las redes interpenetrantes fueron previamente hinchadas en agua destilada por al menos el tiempo límite de hinchamiento. Después fueron colocadas sobre un portaobjetos donde se confinó la muestra delimitando su área con un plumón hidrofóbico. Debido a que las muestras necesitaban una forma regular, se utilizó una hoja de bisturí para disminuir las irregularidades y obtener una superficie lo más plana posible, lo que se ve en la Figura 19.

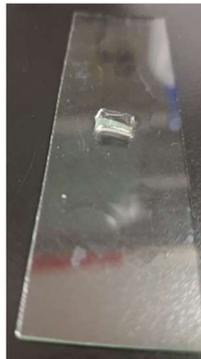


Figura 19. Corte de una red interpenetrante para su medición en el equipo de microindentación.

Los datos se analizaron según la metodología utilizada por Pérez en su tesis doctoral (Pérez-Calixto, et al., 2021).

2.8 Obtención de micrografías por SEM

Para visualizar la microestructura de las redes interpenetrantes, se tomaron imágenes por SEM. Las muestras se prepararon tomando 0.25 mg del

material y se sumergieron en agua bidestilada hasta llegar a su %Hinchamiento límite. Después, las muestras se congelaron utilizando nitrógeno líquido (-196 °C) y se liofilizaron durante 24 h. Una vez deshidratadas, las muestras se mantuvieron a vacío hasta el análisis.

Para la toma de las micrografías, las muestras se fijaron en un porta muestras con cinta de carbón de doble adhesivo en la parte superior y con la ayuda de unas pinzas se montaron sobre la cinta. Finalmente, las muestras se recubrieron con oro y se colocaron en el equipo a vacío.

2.9 Ensayo celular

Tanto para las pruebas de citotoxicidad como para las de adhesión celular, se utilizó la línea celular de fibroblastos murinos BALB/3T3 (ATCC CCL-163).

2.9.1 Ensayo de citotoxicidad

2.9.1.1 Preparación del ensayo

Se colocaron 20 mg de *net*-PEG y de IPN (con relación PEG:PNiPAAm 1:1, 1:0.85 y 1:0.25) bajo luz UV para esterilizar. Posteriormente, se trasladaron a un tubo Eppendorf de 2 mL con 1.5 mL de medio de Eagle modificado (DMEM). Los tubos se pusieron en oscilación a 250 rpm a temperatura de 37 °C, durante 4 días.

Además, en una placa de 96 pozos se colocaron 1×10^4 células en cada uno y 100 μ L de DMEM. Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C con 5% de CO₂.

2.9.1.2 Ejecución del ensayo

Se tomaron 50 μL del medio de liberación de la muestra proveniente del tubo Eppendorf y se colocaron en los pozos con células, los cuales se incubaron a 37 °C con 5% de CO_2 . Después de 24 h, se adicionó una mezcla de reactivo MTT (5 mg/mL según especificaciones del fabricante) y medio DMEM y se incubó por 4 horas más (37 °C, 5% de CO_2). A continuación, se agregaron 100 μL de disolución para que los cristales de formazán se disolvieran y se incubó toda una noche a 37 °C, con 5% de CO_2 . Los resultados de la absorbancia fueron comparados con los controles (células sin muestra).

2.9.2 Pruebas de adhesión celular

2.9.2.1 Preparación de los hidrogeles e IPNs

Las muestras de *net*-PEG y (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-NiPAAm) se cortaron en cuadrados de 1 x 1 cm y se depositaron en una placa de cultivo de 12 pozos. Para la esterilización de las muestras se añadió una disolución de etanol al 70% (200 μL) a cada pozo 3 veces. Inmediatamente después se realizaron tres ciclos de lavado con 150 μL de una disolución amortiguadora de fosfatos (PBS) + 1% de penicilina/estreptomicina.

2.9.2.2 Cultivo celular

Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado (DMEM) bajo en glucosa (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%, en una incubadora con humedad controlada a 37 °C y 5% de CO_2 . El medio se cambió cada dos días y las células se dividieron cuando se alcanzó el 70% de confluencia.

2.9.2.3 Viabilidad celular (prueba de adhesión)

Para el experimento de adhesión celular, se agregó medio DMEM a una placa de cultivo de 12 pozos que contenían las muestras previamente esterilizadas. Como control positivo se usó un cubreobjeto de vidrio. Se sembraron 2.5×10^4 células/pozo y se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 . Todos los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado. Después de 24 horas de cultivo se obtuvieron imágenes de contraste de interferencia diferencial en un microscopio invertido Ti-S Nikon microscope (Plan Fluor 10X Objective).

2.10 Adsorción de ovoalbúmina

Para determinar si las proteínas se adhieren a la superficie de las IPN utilizadas en el trabajo, se realizaron pruebas de adsorción de ovoalbúmina por medio de espectrofotometría UV. Se tomaron muestras de 20 mg de las IPN con relación del contenido de PEG:PNiPAAm 1:1, es decir, con cantidades de ambos polímeros iguales. Se colocaron 5 mL de una disolución de la proteína de concentración conocida y se colocaron las muestras de las redes interpenetrantes. Se monitoreó el cambio de absorbancia (en el sobrenadante de la disolución) respecto al tiempo y se calculó el cambio en la concentración de la disolución de proteína al compararlo con la disolución inicial (blanco) utilizando una longitud de onda de $\lambda = 280 \text{ nm}$ (Anexo I).

2.11 Ensayos microbiológicos

Con el fin de probar la adhesión de bacterias a la superficie de las IPN sintetizadas, se realizaron pruebas para evaluar el comportamiento de los materiales sintetizados frente a 3 de los agentes infecciosos más comunes: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermis* y *Escherichia coli* (ATCC 11229).

Tanto para las bacterias gram-positivas (*S. aureus* y *S. epidermis*) como para la gram-negativa (*E. coli*), las muestras (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-PNiPAAm) (20 mg) fueron colocadas en tubos de vidrio a los cuales se les agregó una disolución de caldo agar Müller-Hinton a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 CFU/mL). Los tubos fueron incubados durante 24 horas a una temperatura de 37 ° C. Pasado este tiempo, se tomó una muestra de sobrenadante y se obtuvo la lectura de la absorbancia a una longitud de onda $\lambda = 600$ nm. El valor de las absorbancias fue comparado con el obtenido de los controles (caldo agar Müller-Hinton sin muestra), los cuales utilizaron la misma metodología previamente descrita. Para calcular el porcentaje de inhibición se realizó la diferencia entre el valor de la absorbancia de los controles y las muestras problemas. El control positivo se tomó como una referencia del 100% de crecimiento de la bacteria.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Síntesis de la red interpenetrante (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-PNiPAAm)

3.1.1 Formación del hidrogel de PEG (*net*-PEG) por radiación ionizante

El primer paso para la obtención de la red interpenetrante fue la reacción entre las cadenas de PEG para obtener un hidrogel del mismo polímero en forma de película. El procedimiento se divide en dos pasos: el primero fue la obtención de la red de PEG y el segundo, el entrecruzamiento que se llevó a cabo entre los radicales formados gracias a la radiación ionizante.

3.1.1.1 Formación de los radicales en la estructura principal del PEG

Cuando el PEG es expuesto a radiación ionizante, se conoce, por estudios de EPR anteriormente realizados (Dorati, et al., 2008), que sus productos de radiólisis en estado sólido a 77 K forman primariamente radicales de tipo $-OCH_2^*$ y $-CH^*-O-$ al romper los enlaces C-C y C-H, respectivamente. Por otro lado, también se ha observado (mediante XPS) que puede tener lugar la formación de radicales aldehído e hidroxilo cuando los enlaces C-O-C se someten a radiación ionizante (por ejemplo, radiación gamma o haz de electrones) (Bhatnagar, et al., 2016). Sin embargo, se considerará que el radical que da lugar a la formación de la red de PEG es el radical $-CH^*-O-$, ya que este es el que favorecerá el entrecruzamiento de las cadenas del

polímero en lugar de la escisión de este. Cabe aclarar que no por eso se deja de reconocer la existencia de las demás especies.

A continuación, se propone de forma simplificada el mecanismo de síntesis del hidrogel de PEG.

Como primer paso se tiene la formación de un radical en un carbono de la cadena principal, por abstracción de un hidrógeno. Al paso del tiempo, conforme se va irradiando el polímero, a lo largo de las cadenas se van generando más de los radicales descritos en la Figura 20 y aumentando la probabilidad de que estos reaccionen entre sí.



Figura 20. Formación de radicales primarios en la cadena de PEG sobre un carbono.

Finalmente, se obtiene la reticulación del PEG generando una estructura tridimensional con cadenas entrecruzadas, como se puede apreciar en la Figura 21.

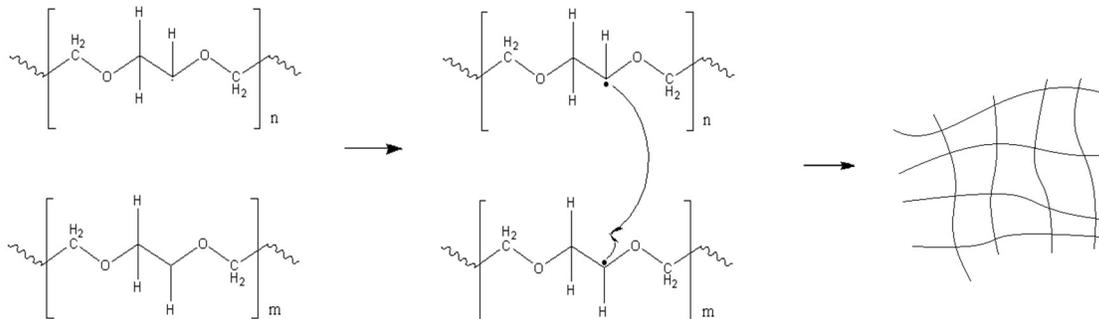


Figura 21. Combinación de los radicales formados en la cadena de PEG para dar lugar a la reticulación del polímero.

3.1.2 Polimerización y entrecruzamiento de la PNiPAAm por vía química

El segundo paso para la obtención de la red interpenetrante es la reacción de la NiPAAm de manera que se genere otra red embebida dentro de la *net*-PEG, sin que esto implique la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de diferente naturaleza. Debido a la alta reactividad de la NiPAAm, tanto en medio acuoso como en estado sólido, se decidió realizar la reacción de entrecruzamiento de este polímero vía radicales libres en un sistema redox acuoso.

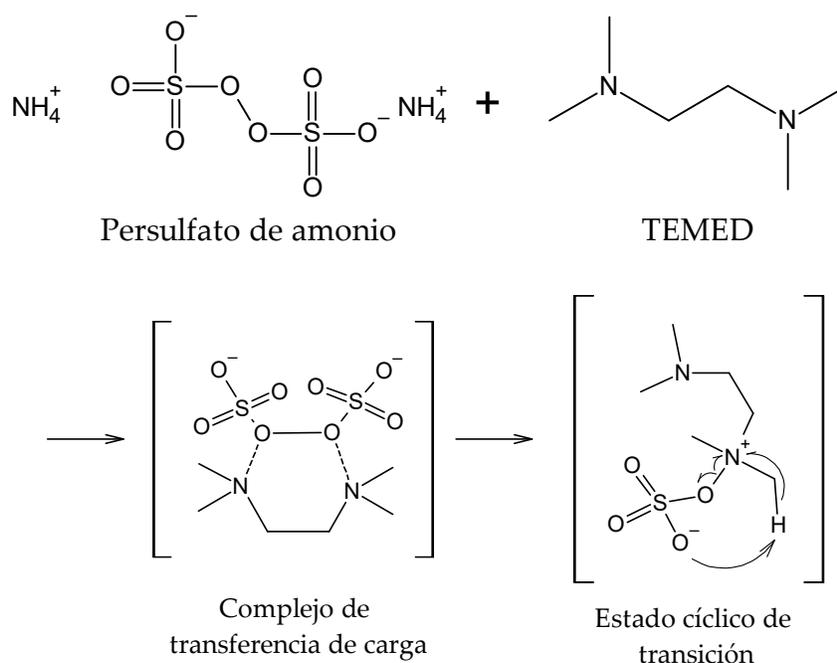


Figura 22. Formación del Complejo de Transferencia de Carga entre el TEMED y PSA en la reacción de entrecruzamiento de la NiPAAm.

Con base en lo señalado por Feng, et al., el mecanismo propuesto inicia cuando el PSA y el TEMED forman un complejo de transferencia de carga (CTC), seguido por un Estado de Transición Cíclico (ETC) (Figura 22).

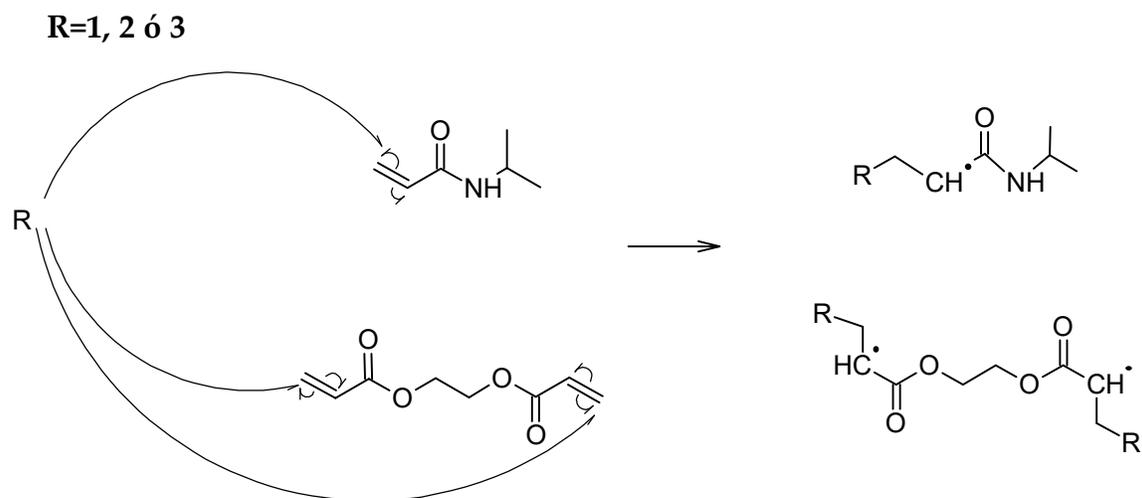


Figura 24. Iniciación de la reacción de interpenetración de la NiPAAm.

La etapa de propagación comienza cuando con la adición sucesiva del radical generado en el monómero de NiPAAm y la formación del correspondiente radical polimérico, como puede apreciar en la Figura 25.

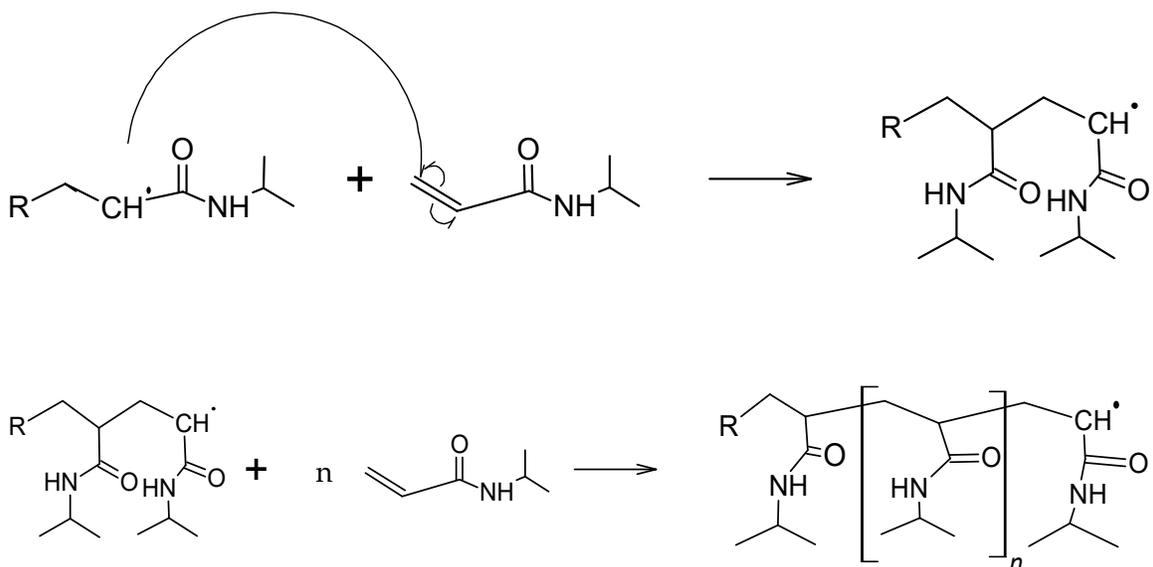


Figura 25. Fase de propagación de la reacción de polimerización de la NiPAAm.

Para la etapa de terminación de la reacción, pudiera ocurrir que esta se realice por el encuentro de dos radicales (combinación) o por la abstracción de un hidrógeno al encontrarse dos radicales, ocurriendo así una desproporción. Para la reacción de combinación y debido a las especies existentes, esta pudiera llevarse a cabo entre los radicales de PNiPAAm solamente (Figura 27).

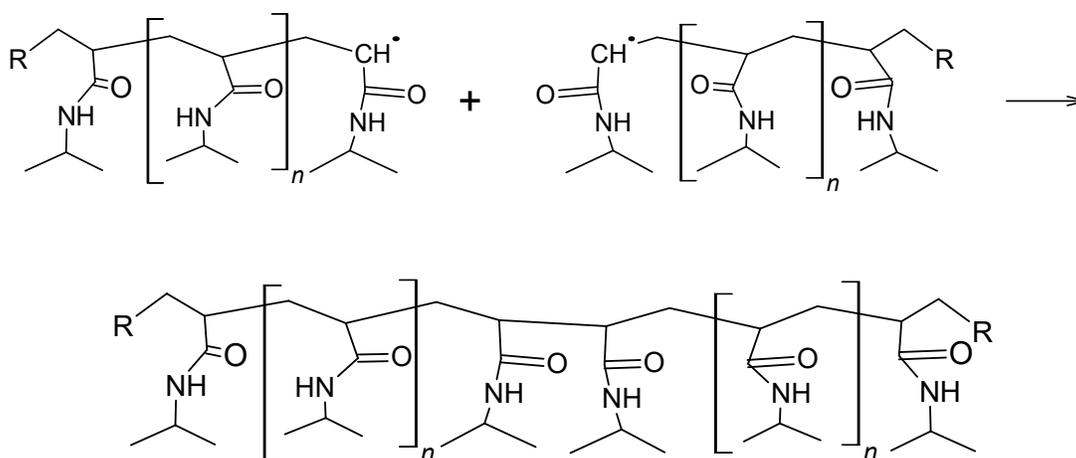


Figura 27. Terminación de la polimerización de la NiPAAm por medio de combinación.

El paso de desproporción se visualiza en la Figura 28, donde se nota que un macrorradical de PNiPAAm pierde un hidrógeno y se une a otro macrorradical. De esta forma, la reacción se detiene formando dos cadenas, una con un enlace insaturado por haber perdido un H y otra cadena con un enlace saturado en el lugar donde se encontraba el centro reactivo.

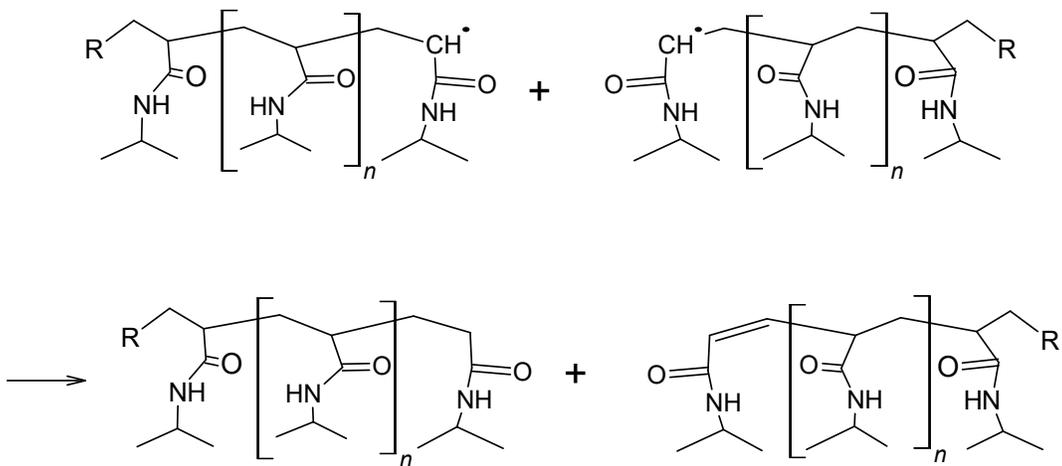


Figura 28. Formación de cadenas poliméricas de NiPAAm por medio de desproporción.

En la Figura 29 se puede visualizar la formación de la estructura química del hidrogel de PNiPAAm con las cadenas ya entrecruzadas con 4EGDMA. Los macrorradicales formados reaccionaron en este caso por combinación, aunque también podrían hacerlo por desproporción, como se vio anteriormente.

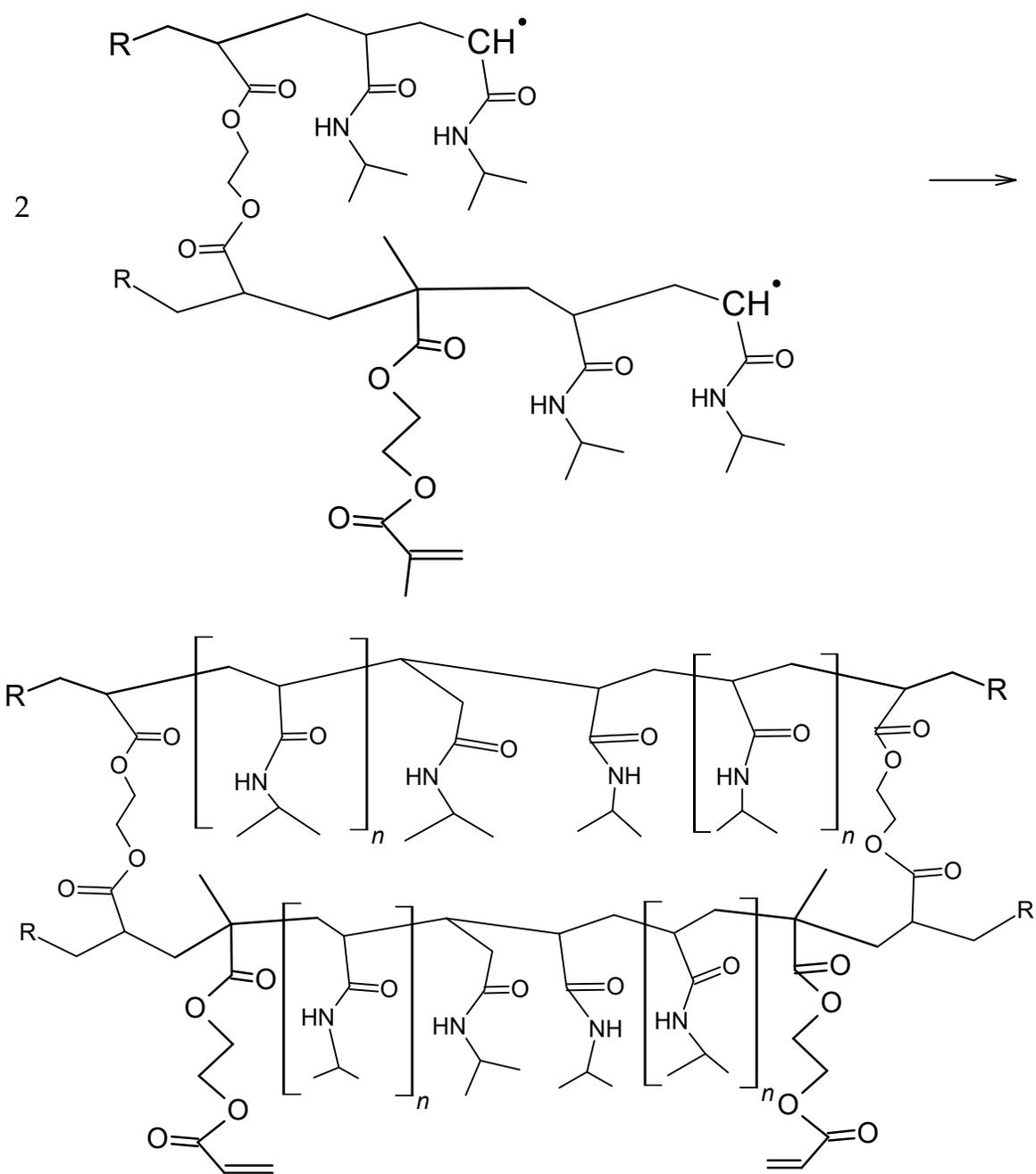


Figura 29. Obtención del hidrogel de PNIPAAm por medio de la reacción de los macrorradicales formados.

3.2 Estudio de formación del porcentaje de gel en PEG

Se evaluó la cantidad de formación de gel de PEG al irradiarlo en disolución en un intervalo de 10-120 kGy, variando la temperatura y tiempo de reacción, así como el peso molecular del polímero. La concentración de las disoluciones fue constante de 50 g/L, utilizando como disolvente agua. Los resultados se muestran en la Figura 30.

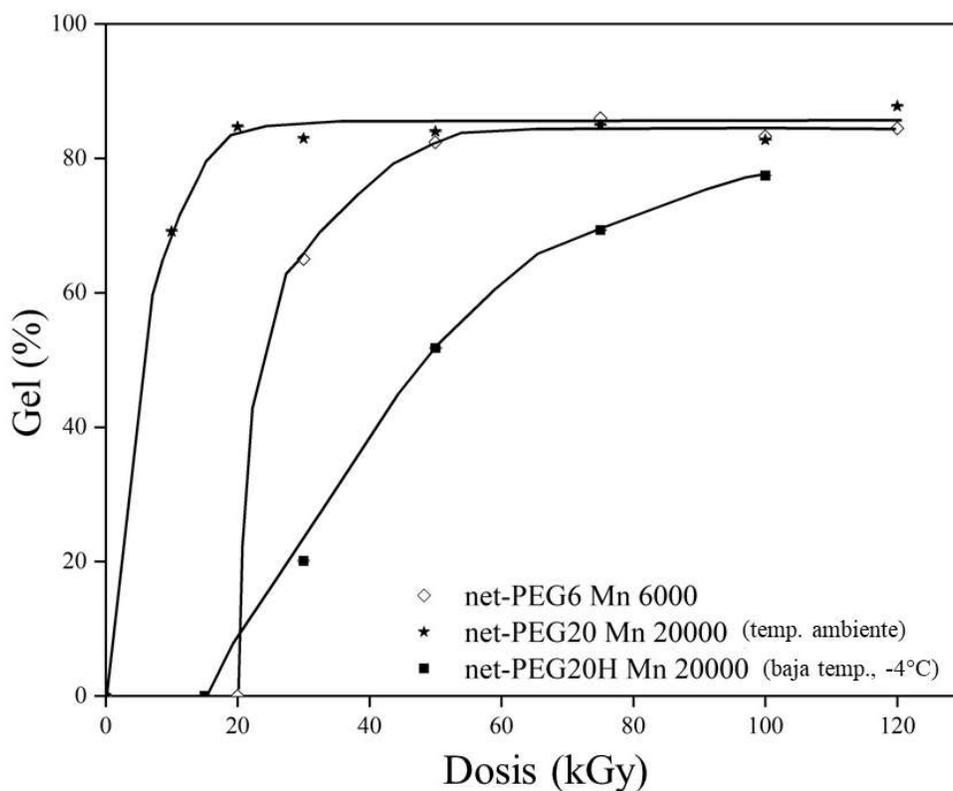


Figura 30. Porcentaje de gel de PEG en función de la dosis a diferentes pesos moleculares y temperaturas.

Observando la figura anterior, puede apreciarse que:

- a) Cuando el PEG con 6000 Mn es expuesto a radiación, la disolución empieza a dar lugar a la formación de gel a dosis menores en comparación con el PEG con 20000 Mn (experimentos realizados a temperatura ambiente). Esto se puede deber a que, a menor longitud de cadena, la probabilidad de encuentro entre radicales formados a lo largo de la misma disminuye.
- b) Al disminuir la temperatura, el efecto de la dosis en la formación de gel disminuye, lo cual se observa comparando los resultados del PEG con Mn de 20k a temperatura ambiente contra $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La explicación al respecto es que, al existir menor movilidad de las cadenas por efecto de la temperatura en la disolución, la probabilidad de que los radicales formados reaccionen entre sí, disminuye, provocando que la dosis de iniciación de gel sea mucho mayor, y el porcentaje de gel obtenido sea menor.
- c) Además, puede observarse que los experimentos que se llevaron a cabo a temperatura ambiente alcanzan una meseta en un valor de % Gel alrededor del 80% y que este porcentaje se mantiene constante a pesar de aumentar la dosis; sin embargo, es bien conocido y publicado que, al aumentar la dosis absorbida, los materiales entrecruzados aumentan los puntos de reticulación que unen las cadenas, lo cual provoca una mayor densidad de entrecruzamiento entre las cadenas del hidrogel. Esto se traduce en estructuras con mayor cantidad de poros, pero de menor tamaño. De la misma manera, las propiedades mecánicas y de hinchamiento se ven afectadas por la densidad de entrecruzamiento presente en los materiales.

3.3 Estudio y determinación del hinchamiento de los hidrogeles sintetizados

Las pruebas de hinchamiento no solamente demuestran la afinidad de los materiales sintetizados por disolventes con una polaridad específica, sino que, además, muestran de manera indirecta de cómo cambia la estructura de las cadenas, el tamaño del poro que se obtuvo y la manera en que se difunde el disolvente a través de la estructura. Aunado a esto, el contenido de agua en el estado hinchado está asociado con la composición química y la densidad de entrecruzamiento de la red, lo que se ve reflejado en el comportamiento mecánico del hidrogel. Se sabe que el disolvente actúa como agente plastificante, disminuyendo la temperatura de transición vítrea y el módulo de elasticidad del material (Malmonge, 2017). Por estas razones, las pruebas de hinchamiento suelen aportar información (indirecta) de las propiedades mecánicas del hidrogel. Además, el tiempo de hinchamiento límite es un parámetro necesario para poder determinar la temperatura mínima de transición de disolución.

En las siguientes gráficas, se muestran los resultados de los experimentos de hinchamiento para los hidrogeles de PEG obtenidos con distintos pesos moleculares y a diferentes temperaturas, así como para las IPNs sintetizadas.

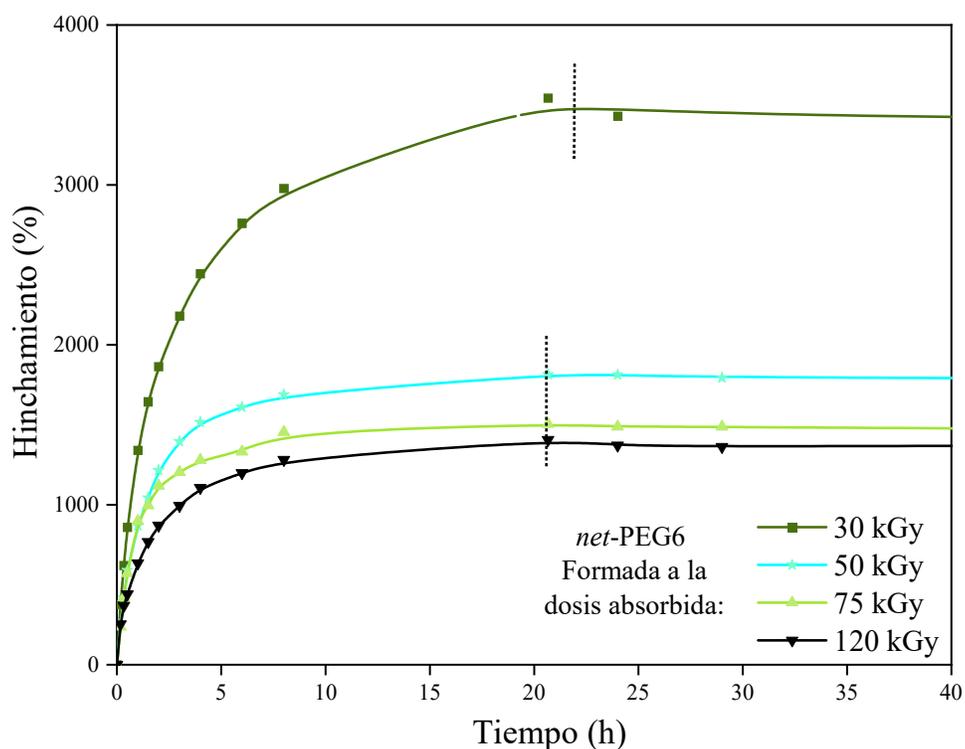


Figura 31. Porcentaje de hinchamiento en función del tiempo en hidrogel de PEG con Mn:6000 sintetizados a diferentes dosis de radiación absorbida.

La Figura 31 muestra que para los hidrogel de PEG6 (*net*-PEG), se alcanzó un tiempo de hinchamiento límite prácticamente igual para todas las muestras (podemos garantizar alrededor de las 15-20 h, se alcanzó el valor límite, lo que se observa como una meseta en la gráfica). La diferencia en el porcentaje de absorción de agua radica en el grado de entrecruzamiento de las muestras; es decir, a mayor dosis de síntesis del gel se tiene una red más entrecruzada, donde probablemente los poros sean más pequeños y por lo tanto se pueda absorber una menor cantidad de disolvente debido a la difusión del agua entre los mismos.

La siguiente gráfica (Figura 32) muestra el mismo experimento ahora realizado en los hidrogel de PEG con Mn de 20000. Como puede

apreciarse, el tiempo de hinchamiento límite es menor y varía entre 7 u 8 h, correspondiendo los tiempos más cortos para muestras que fueron sintetizadas a dosis mayores (más entrecruzadas). También es visible que, al partir de un polímero con cadena más larga, la cantidad de disolvente que absorben es menor en comparación con los de cadena más pequeña, esto podría explicarse debido al hecho que, al contar con una cadena más larga, en los hidrogeles de *net*-PEG se produce una mayor cantidad de radicales y la probabilidad de entrecruzamiento aumenta, por lo que contribuye también a la obtención de un material con mayores puntos de entrecruzamiento.

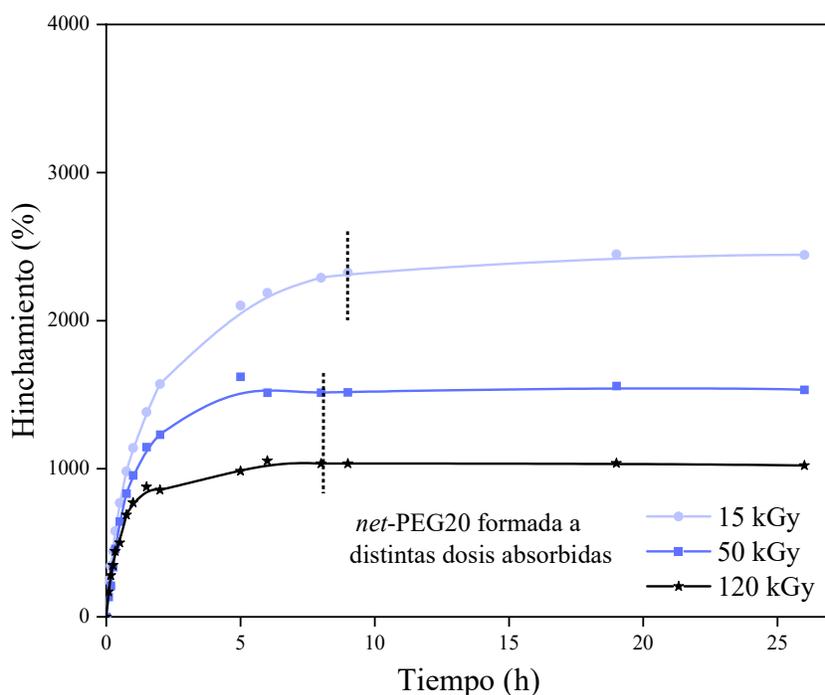


Figura 32. Hinchamiento límite de los hidrogeles de *net*-PEG20 sintetizados a temperatura ambiente.

Por otro lado, en la Figura 33 puede observarse el efecto que tiene la temperatura sobre el hinchamiento límite en agua de los hidrogeles. En este

experimento se mantuvo constante el peso molecular ($M_n=20,000$) pero a baja temperatura ($-4\text{ }^\circ\text{C}$), pudiéndose observar que los valores de hinchamiento límite y el porcentaje de absorción son distintos de los hidrogeles sintetizados a temperatura ambiente. Las diferencias resaltan al compararse con los valores de % Gel obtenido que se muestran en la Figura 30, ya que, para los hidrogeles sintetizados a temperatura ambiente, los % Gel alcanzados con distintas dosis de radiación parecían influir de manera inversa a la cantidad de agua absorbida, es decir, a menor dosis absorbida, el %hinchamiento era mayor; en contraste, el experimento llevado a baja temperatura muestra que incluso con dosis de absorción muy distintos se obtienen porcentajes de hinchamiento muy similares, esto indica que las condiciones de síntesis influyen directamente en el tamaño de poro y su grado de entrecruzamiento.

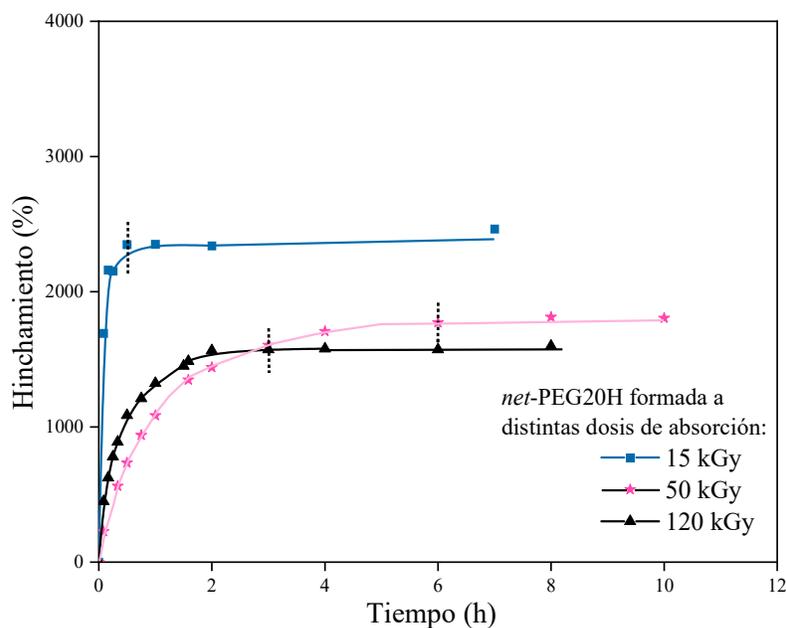


Figura 33. Hinchamiento límite de *net*-PEG ($M_n: 20000$) sintetizadas a $-4\text{ }^\circ\text{C}$ y con diferentes dosis de radiación absorbida.

Cabe señalar que, sin importar el peso molecular inicial de los hidrogeles o la temperatura de síntesis, los materiales obtenidos mantuvieron un carácter altamente hidrofílico, además que, por los porcentajes de absorción de agua mostrados, se pueden caracterizar como materiales super absorbentes debido a que pueden retener una cantidad de agua notable que va de 1000 a 3500 %, comprobando que esta variable puede ser modificada y controlada a través de factores como la variación del Mn, la dosis absorbida y la temperatura de síntesis.

En cuanto a los porcentajes de hinchamiento en agua obtenido para las redes interpenetrantes (Figura 34), puede observarse que el tiempo de hinchamiento límite se mantuvo en el mismo intervalo para cualquier muestra (~2 h), sin embargo, se observó un menor porcentaje de disolvente absorbido, debido a que la red de PNiPAAm (*net*-PNiPAAm) que se forma, ocupa los espacios dentro de la red de PEG, por lo que de nueva cuenta, la difusión del disolvente es menor, ya que los poros existentes y los nuevos que se forman, disminuyen el espacio disponible que ocupa el disolvente.

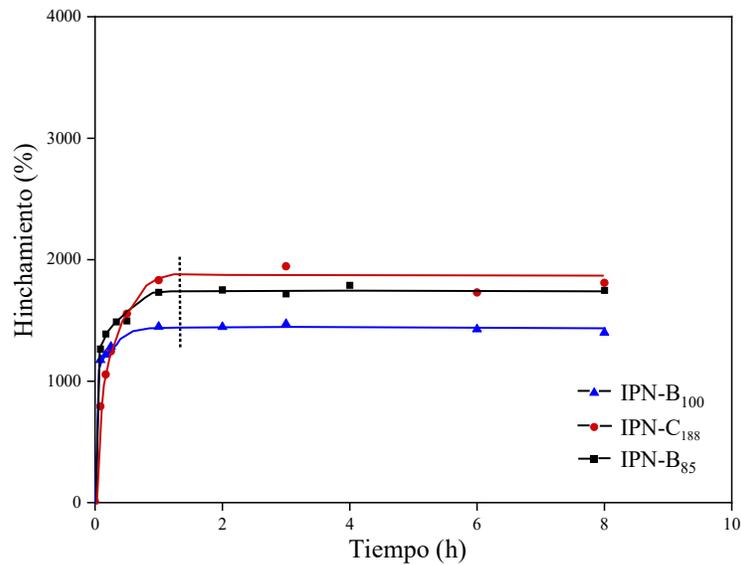


Figura 34. Determinación del hinchamiento límite de las redes interpenetradas con diferentes porcentajes de NiPAAm.

3.4 Determinación del valor de Temperatura Crítica

La termosensibilidad de la PNiPAAm ha sido ampliamente estudiada. Se sabe que este polímero tiene la propiedad que sus cadenas colapsen o se contraigan cuando se encuentran en un medio donde la temperatura está alrededor de los 30 °C, dependiendo la longitud de las cadenas, los comonómeros con los que se encuentre y el método de síntesis. En este trabajo, esta propiedad tiene relevancia ya que, como se señaló anteriormente, el colapso y expansión de las cadenas en el material, podría contribuir al incremento o disminución en la adherencia de microorganismos o proteínas.

3.4.1 Determinación de la LCST por medio de hinchamiento

El valor de la LCST en las IPNs sintetizadas se obtuvo mediante pruebas de hinchamiento y estudios de calorimetría. Para las pruebas de hinchamiento, los sistemas se sumergieron en agua por al menos el tiempo de hinchamiento límite a diferentes temperaturas y se determinó el porcentaje de hinchamiento de forma gravimétrica. De esta forma se realizó la curva que se muestra en la Figura 35, en donde el punto de inflexión de las curvas corresponde al valor de la LCST de los sistemas y se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. LCST de los diferentes sistemas, determinado mediante el % de absorción de agua, a diferentes temperaturas.

IPN	Relación PEG:PNiPAAm	LCST (° C)
B ₈₅	1:0.85	30
B ₁₀₀	1:1	34
C ₁₈₈	1:1.9	34

Según los datos mostrados en la Tabla 1 y en la Figura 35, puede observarse que los materiales conservan la propiedad de temperatura crítica y que sus valores de LCST están dentro de los que han sido publicados por numerosas investigaciones para el NiPAAm ((Chen, et al., 2022), (Ortega, et al., 2008), (Yang, et al., 2007), (de Moura, et al., 2006)), y que estos se encuentran cercanos a la temperatura promedio del cuerpo humano (36 ° C). El valor de la LCST que poseen las IPNs sintetizadas varía de acuerdo con la cantidad de

net-NiPAAm presente, esto está en coincidencia con lo publicado en la literatura; esto es, aunque el valor reportado para la PNiPAAm suele ser ~32 °C, el valor puede disminuir dependiendo si las interacciones hidrofóbicas se ven favorecidas, o por el contrario, si las interacciones hidrofílicas son las predominantes, el valor de la temperatura crítica suele ser mayor (Taylor, et al., 2017). Aunado a esto, también se sabe existe una dependencia de la termosensibilidad con respecto al peso molecular de las cadenas poliméricas (Tucker & Stevens, 2012) (Plunkett, et al., 2006) (Nayak, 2015), su tacticidad (De Santis, et al., 2017) y la concentración.

La importancia de determinar la sensibilidad a la temperatura de estos sistemas radica en que, si estos se utilizarían como apósitos primarios, podrían exhibir una respuesta proinflamatoria como otros trabajos que se han publicado en donde ratones con heridas (que simulaban úlceras diabéticas) respondieron positivamente cuando estas fueron tratadas con hidrogeles de NiPAAm (Chen, et al., 2015).

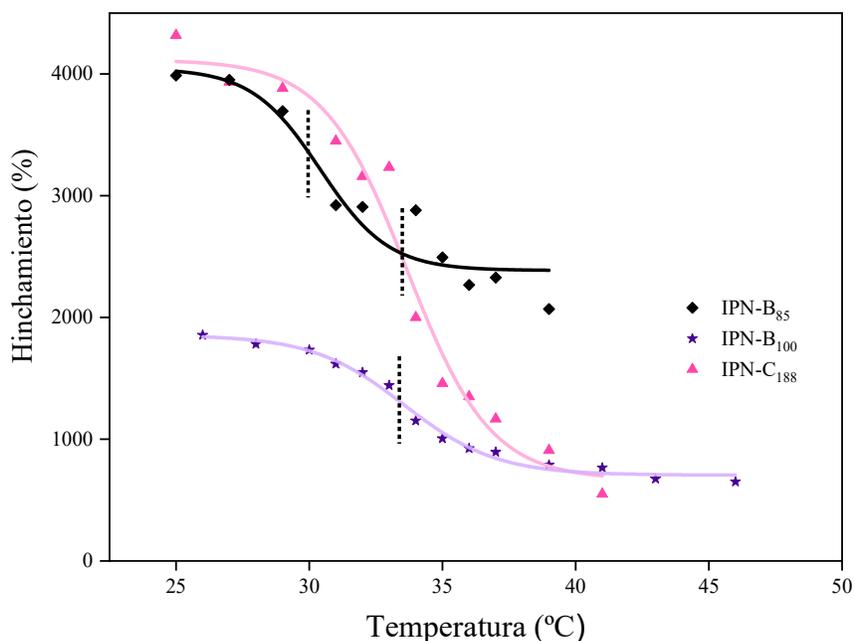


Figura 35. Determinación de la temperatura crítica mediante hinchamiento.

3.4.2 Determinación de la temperatura crítica por DSC

Complementario a los resultados de determinación de la LCST por estudios de hinchamiento, se realizó la determinación de esta propiedad por medio del análisis de DSC. Gracias a los termogramas mostrados en la Figura 36, puede comprobarse que las IPNs poseen valores de LCST muy similares a los obtenidos por el estudio anterior y que también se encuentran cercanas a la temperatura fisiológica del cuerpo humano (37 °C).

Nótese que a mayor presencia de PNiPAAm en la IPN obtenida, el valor de la temperatura crítica es desplazado a un valor mayor, para la IPN con una relación PEG:PNiPAAm 1:1.2, el valor de la LCST fue de 34.5 °C mientras que la IPN con relación PEG:PNiPAAm 1:0.8 la temperatura crítica fue 31.3 °C.

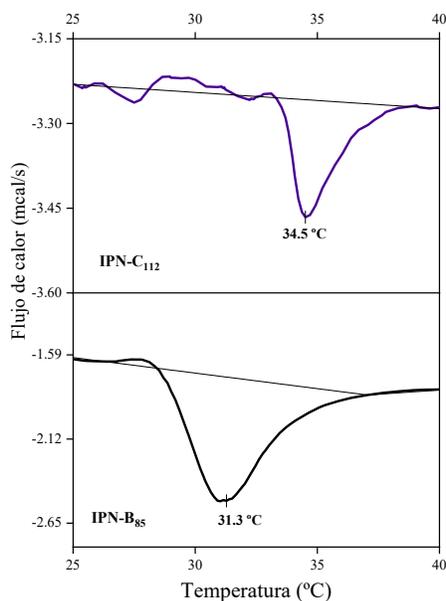


Figura 36. Determinación de la temperatura crítica por medio de DSC.

3.5 Elucidación de la estructura química de la IPN

3.5.1 Identificación de grupos funcionales por medio de espectroscopía de infrarrojo

La Figura 37 muestra los espectros infrarrojos del hidrogel de PEG (*net*-PEG) y la PNiPAAm, que son los elementos constituyentes de la IPN (mostrada al centro).

En la película de *net*-PEG obtenida en el primer paso, resaltan tres bandas características del polímero: una señal ancha en 3342 cm^{-1} , correspondiente a la presencia del grupo -OH; otra banda en 2879 cm^{-1} , que se identifica como propia de $-\text{CH}_2-$; y una última en 1096 cm^{-1} , perteneciente a la vibración de estiramiento entre el C-O. La aparición de nuevas bandas en las redes interpenetradas, ayudan a la confirmación de que la NiPAAm está presente. En las IPNs puede notarse la aparición de las señales en 3296 cm^{-1} , debido a la presencia del enlace N-H; en 1642 cm^{-1} , prueba de la presencia del enlace C=O perteneciente al grupo carbonilo de la amida (amida I), y finalmente la señal en 1535 cm^{-1} , que señala el enlace N-H de la amida I. El análisis anterior fue llevado a cabo con distintas muestras, obteniendo resultados con espectros reproducibles que muestran las mismas señales, confirmando que, al realizar la reacción de interpenetración de la NiPAAm, este formó una nueva red embebida en la estructura de la red de PEG primaria.

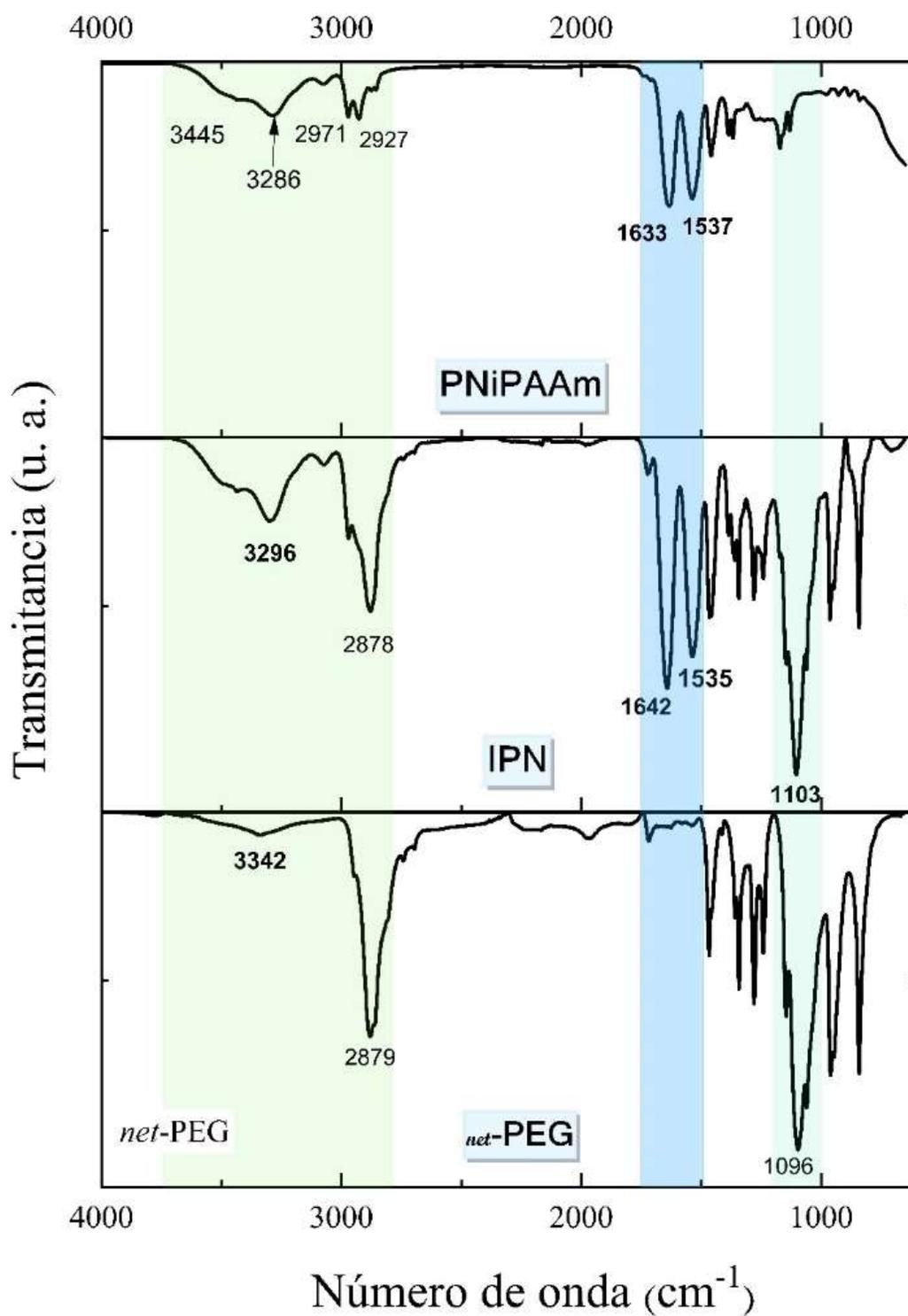


Figura 37. Espectro infrarrojo de la red interpenetrante, PNiPAAm y net-PEG.

3.5.2 Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C en estado sólido

Los espectros de ^{13}C por RMN de las muestras de *net*-PEG (Mn: 20000) e IPN con distintos porcentajes de PNiPAAm interpenetrada se muestran en la Figura 38. Las señales identificadas en los espectros de RMN en estado sólido poseen menor resolución debido a las interacciones anisotrópicas de las moléculas y al poco movimiento que éstas tienen en dicho estado (El Hariri El Nokab & van der Wel, 2020). Sin embargo, debido a que el material es insoluble, una de las mejores alternativas que se encontraron para la elucidación y discusión de la estructura obtenida fue esta técnica.

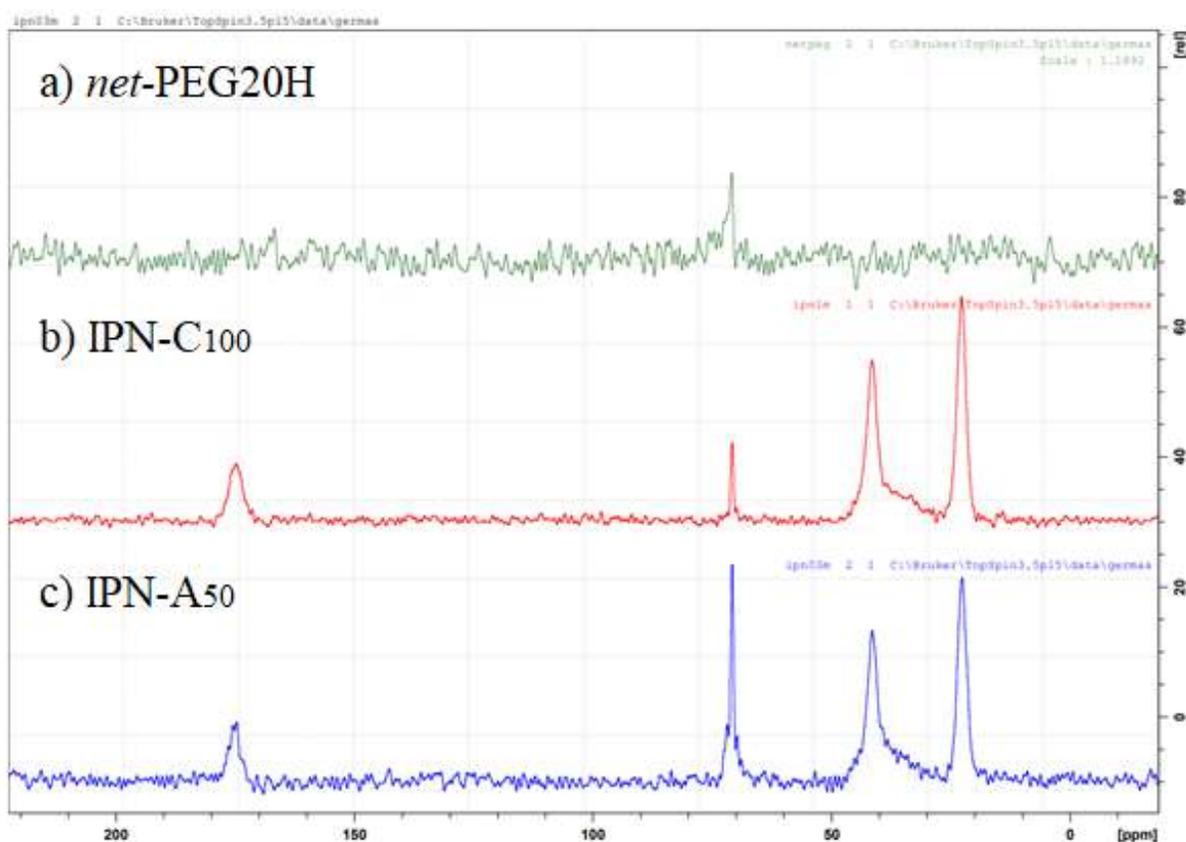
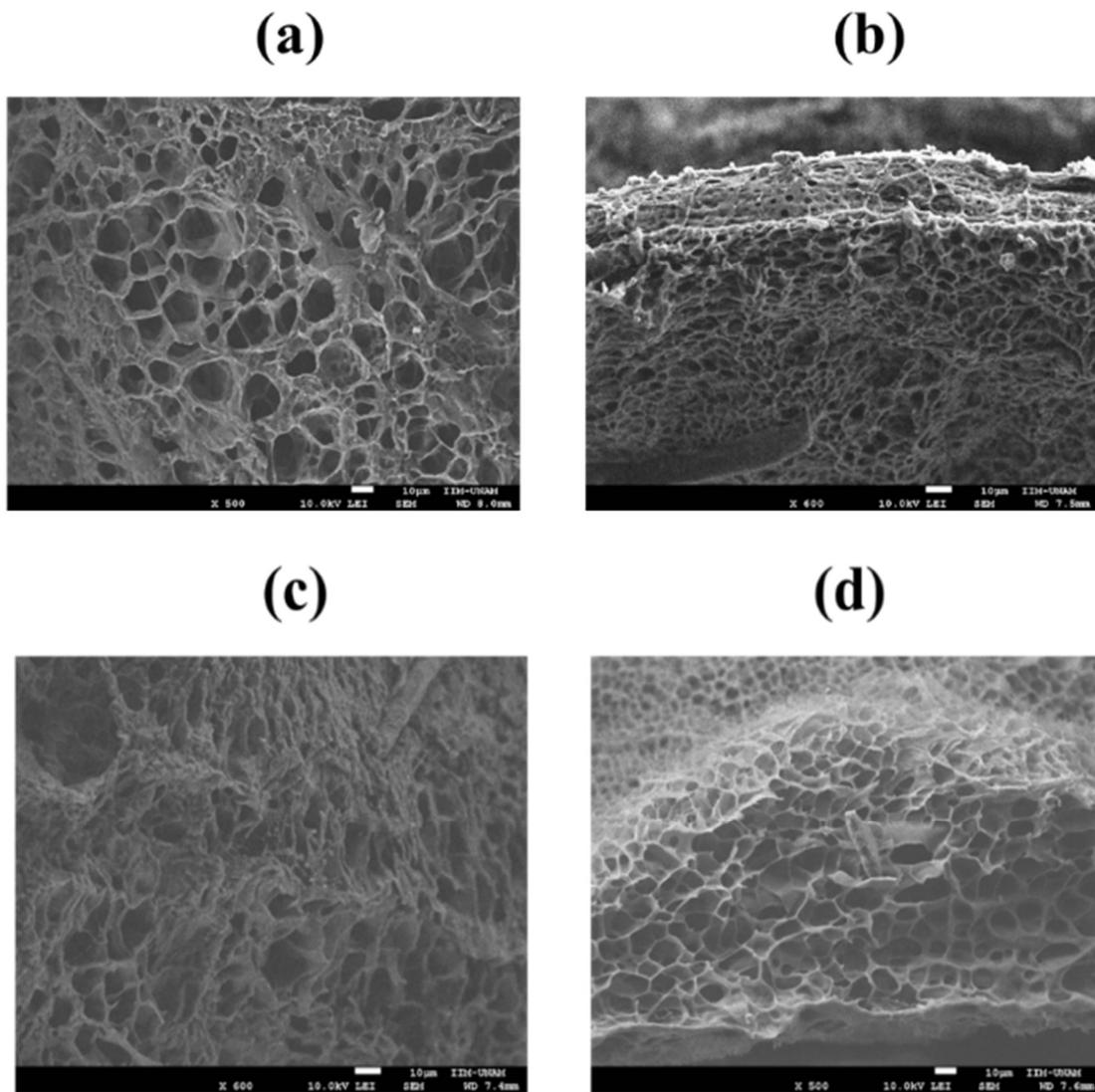


Figura 38. Espectros de RMN (^{13}C) de sólidos obtenidos para a) *net*-PEG; b) y c) IPNs formadas con distinto porcentaje de PNiPAAm (100 y 50% respectivamente).

En la Figura 38 el espectro marcado como a) corresponde a la red de PEG muestra una señal asociada al carbono del metileno (-CH₂-), la cual se encuentra con un desplazamiento químico de $\delta = 71$ ppm. Debido a la técnica y a la cantidad con la que se llevó a cabo el experimento, distinguir las partes del entrecruzamiento no es posible. En las IPNs es posible observar que esta señal aumenta debido a la incorporación de la PNiPAAm. También es posible visualizar el desplazamiento del carbono carbonílico de la PNiPAAm a $\delta = 175$ ppm. Puede además observarse que las señales de los carbonos -CH- -CH₂- de la cadena principal de la PNiPAAm y de los metilos del isopropilo se hallan aglomeradas y tienen desplazamiento químico en $\delta = 22.5$ ppm. (Gao, et al., 2013).

3.6 Visualización de la morfología y tamaño de poro por SEM

La morfología y el tamaño de poro pudieron ser visualizados gracias a los estudios de SEM, donde las muestras se estudiaron después de haber sido previamente hinchadas en agua hasta alcanzar su %Hinchamiento máximo y posteriormente liofilizadas para que sus poros permanecieran abiertos al momento de la micrografía. Las imágenes mostradas en la Figura 39, se tomaron para los hidrogeles de *net*-PEG y para IPNs con distintos porcentajes de PNiPAAm en la red.



*Figura 39. Morfología del **net**-PEG20H y las redes interpenetrantes con PNiPAAm a distinta concentración y tiempo de reacción. (a) **net**-PEGH con aumento de 500X; (b) IPN-A₁₃ con aumento de 600X; (c) IPN-B₈₅ con aumento de 500X; (d) IPN-C₁₈₈ con 188 % de concentración de **net**-PNiPAAm respecto al PEG y aumento de 600X.*

En la imagen mostrada en la Figura 39 (a) puede observarse que la forma de los poros es uniforme, y que esta propiedad va cambiando una vez que la red fue interpenetrada con la PNiPAAm, dependiendo de la concentración y el tiempo de reacción.

Respecto al tamaño de los poros, de acuerdo con las mediciones realizadas, se obtuvieron los valores que se muestran en la Tabla 2.

*Tabla 2. Tamaño de poro y desviación estándar la red *net*-PEG con Mn=20000 sintetizado a baja temperatura y de las diferentes IPNs.*

Etiqueta	Relación PEG : PNiPAAm	Tamaño de poro promedio (μm)	Desviación estándar (μm)
<i>net</i> -PEG20H	1 : 0.00	5.59	2.27
IPN-A ₁₃	1 : 0.13	2.44	0.86
IPN-B ₈₅	1 : 0.85	4.10	1.59
IPN-C ₁₈₈	1 : 2.00	4.91	1.69

Se confirma que conforme la red interpenetrante se fue formando, el tamaño de poro va cambiando, reduciéndose en general, ya que en los espacios que quedaban libres, se difundió la disolución de NiPAAm que posteriormente polimerizó, reduciendo el volumen libre, no obstante, conforme aumenta la concentración y el porcentaje de entrecruzamiento, el tamaño de poro vuelve a crecer. Es importante resaltar que a la par que aumenta el tamaño de poro promedio, también lo hace la desviación estándar, lo que podría significar en realidad, la homogeneidad respecto al tamaño medido se va perdiendo y por eso los valores de la IPN-B₈₅ (relación PEG:PNiPAAm 1:0.85) y la IPN-C₁₈₈ (relación PEG:PNiPAAm 1:2) pueden

resultar mayores que los de la IPN-A₁₃ (relación PEG:PNiPAAm 1:0.15) que tuvo menor desviación estándar y mejor uniformidad.

Cabe hacer mención que contar con IPNs (hidrogeles) con diámetro de poro con orden de magnitud en μm constituye una ventaja debido a que estos materiales facilitan el transporte de nutrientes, metabolitos, fármacos, desarrollo de tejidos (Means & Grunlan, 2019) y ayudan a que las células mantengan sus características propias debido al espacio donde se desarrollan (Ma, et al., 2022).

3.7 Resultados de las pruebas celulares

3.7.1 Viabilidad celular (in vitro)

Debido a que las IPNs sintetizadas tienen como propósito una posible aplicación en el área biomédica como apósitos de herida o como material en la ingeniería de tejidos, es importante establecer cuál es el comportamiento que tendrá una vez que es puesto en contacto con células.

Los resultados del ensayo realizado se muestran en la Figura 40. En la gráfica puede observarse que la viabilidad celular a las 24 h y es posible notar que, tanto para los hidrogeles de PEG como para las redes interpenetrantes, se obtienen valores por arriba de lo establecido por la norma ISO 10993-514, ya que ésta establece que los materiales deben tener valores de viabilidad celular por arriba del 70%, por lo que, con base en los resultados obtenidos los materiales sintetizados se clasifican como citocompatibles.

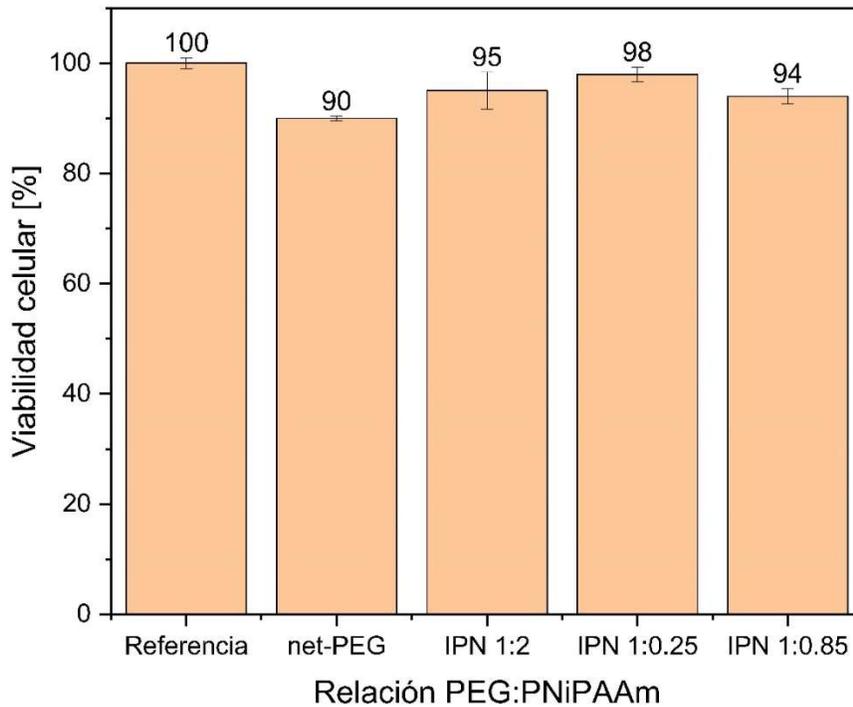


Figura 40. Viabilidad celular de las redes interpenetrantes de PEG y PNiPAAm.

3.7.2 Adhesión celular

Debido a que los resultados de viabilidad celular fueron satisfactorios, se prosiguió con pruebas de adhesión celular para poder sugerir una aplicación final para el material. Con los fibroblastos de ratón se pudo verificar si la adherencia de células animales se llevaba a cabo, ya que estas células son ampliamente conocidas por soltar matriz extracelular y sustancias precursoras del colágeno, lo que da sostén a los tejidos conectivos; en el caso de sufrir una herida, los fibroblastos suelen migrar y segregar estas proteínas, lo que ayuda en el proceso de recuperación y curación del tejido afectado (Dick, et al., 2022).

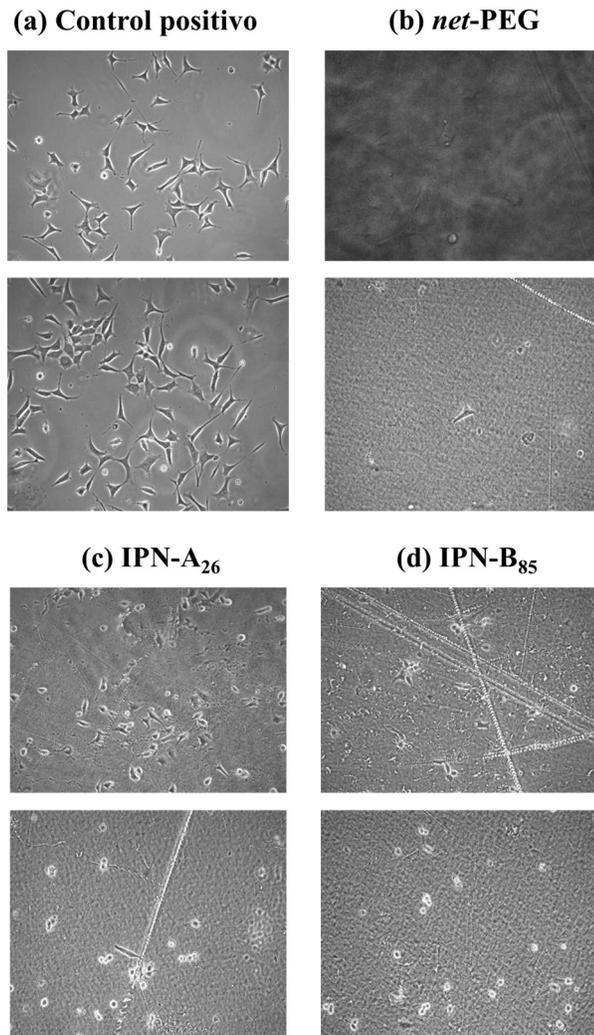


Figura 41. Adherencia de las células Balb/3T3 en (a) control positivo, (b) *net*-PEG20H, (c) IPN con relación PEG:PNiPAAm (1:0.25) y (d) IPN-B₈₅ con relación PEG:PNiPAAm (1:0.85)

En la Figura 41 (a), se tiene el control positivo de las células de fibroblastos sobre cajas Petri de vidrio donde es posible observar una completa adherencia tanto a las 24 como a las 48 h después del sembrado de las células. Esta misma prueba sobre la red *net*-PEG mostró que la superficie se puede considerar efectivamente no adherente a células de fibroblastos BALB/3T3 ya que no se aprecia ninguna célula con su forma característica de

estrella sobre la superficie, sin importar el tiempo que hubo pasado. Además, después de la colocación de las células, ninguna se adhirió a este material, como podría esperarse al ser un polímero altamente hidrofílico.

Para el caso de la IPN mostrada en (c), puede notarse que la adherencia de las células mejora a las 24 h, esto debido probablemente a que la presencia del segundo polímero (PNiPAAm) ayuda a que las células puedan anclarse sobre el material. Sin embargo, después de 48 h, los fibroblastos no se adhieren ya que no pueden anclarse a la superficie y lo que se observa sobre las películas son solamente residuos, por lo que podría considerarse que no hay proliferación de células a ese tiempo. Análogamente, la IPN con mayor cantidad de PNiPAAm mostrada en (d), reveló que desde las 24 h hay una minúscula adherencia de las células al material, convirtiéndose en prácticamente nula al pasar 48 h, ya que no se nota la presencia de fibroblastos que se encuentren anclados a la superficie.

3.8 Adsorción de ovoalbúmina sobre (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-PNiPAAm)

La prueba se realizó para IPN con proporción 1:1 de PEG respecto a la PNiPAAm en el sistema. En la Figura 42 puede observarse que la concentración de ovalbúmina permanece prácticamente constante a lo largo del tiempo, por lo que, de acuerdo con los datos expresados en la gráfica se tiene un material no adherente a este tipo de proteína, lo cual es un buen indicador en caso de que quisiera ser utilizado en aplicaciones del tipo 'wound healing'.

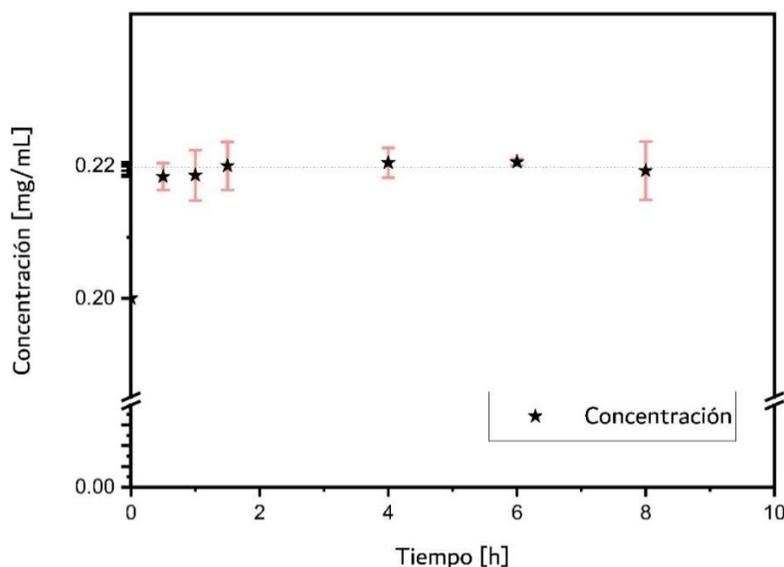


Figura 42. Prueba de adsorción de ovalbúmina con respecto al tiempo en IPNs con relación PEG:PNiPAAm 1:1.

3.9 Pruebas microbiológicas

A la vista de los resultados anteriormente expuestos, una de las potenciales aplicaciones del material sintetizado es el ser utilizado como apósito primario para heridas. Debido a que los apósitos primarios están en contacto directo con las heridas y que estas son zonas expuestas a contaminación e infecciones, es deseable que el material pueda proporcionar protección no solo para que haya una recuperación más rápida de los tejidos, sino para que las zonas expuestas no sean propensas a infectarse y con esto, aumentar las complicaciones físicas, económicas y anímicas de los pacientes. Por lo anteriormente expuesto, se decidió llevar a cabo pruebas microbiológicas donde pueda determinarse si el material es capaz de resistir la adhesión microbiana, como teóricamente se esperaba

para un material altamente hidrofílico como se mostró para las IPN sintetizadas en las pruebas de hinchamiento.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes figuras respecto a la inhibición del crecimiento de *S. aureus* (Figura 43), *S. epidermis* (Figura 44) y *E. coli* (Figura 45).

En el caso del comportamiento de las IPNs frente a *S. aureus* puede notarse que solo hay inhibición del crecimiento antibacteriano de forma significativa en el caso de tener una proporción de PEG:PNiPAAm de 1:2, ya que a las 48 h el estudio demostró que esta red en particular presentaba un % inhibición cercano al 90%. Por otro lado, puede verse que, aunque el hidrogel de *net*-PEG inhibe el crecimiento de *S. aureus*, la presencia de PNiPAAm en una cantidad mucho mayor que la del PEG en el sistema mejora los resultados de antiadherencia bacteriana.

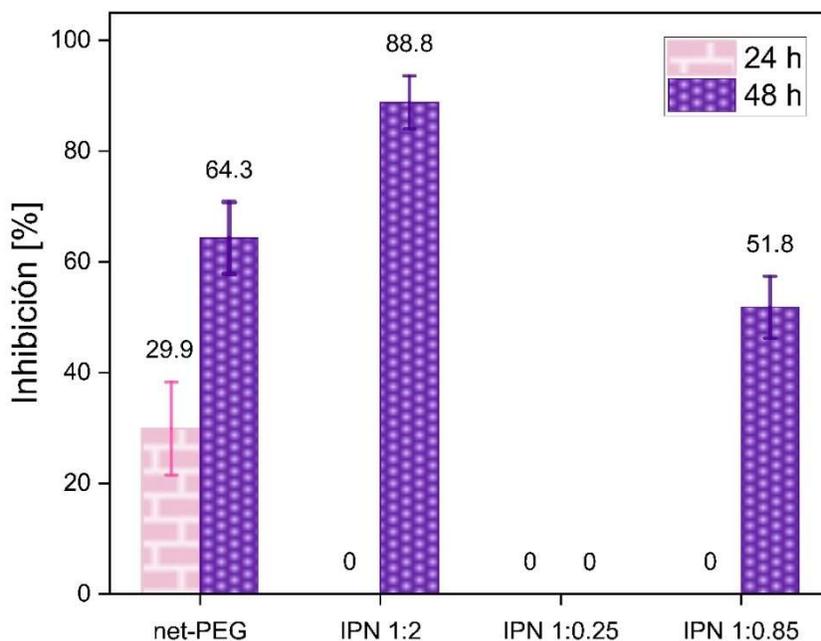


Figura 43. Porcentaje de inhibición de *S. aureus* en IPNs con distintos porcentajes de PNiPAAm interpenetrada después de 24 h y 48 h.

Con respecto a las pruebas realizadas en presencia de *S. epidermis* se encuentran resultados bastante favorables. El del hidrogel de PEG presenta muy poca inhibición a las 24 h, pero mejora al pasar a 80% a las 48 h; por su parte, todas las redes interpenetradas de (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-PNiPAAm) aumentan su porcentaje de inhibición durante las primeras 24 h. Una vez que transcurren 48 h, las IPNs con la presencia de PNiPAAm más alto y bajo presentan los mayores valores de inhibición de la bacteria, esto puede deberse al acomodo de las cadenas que forman las redes, ya que cabe recordar que estos materiales son efectivos porque no permiten el anclaje de las bacterias, por lo tanto, se intuye que no habrá formación de biofilm y, por consiguiente, no habrá proliferación, reduciendo el riesgo de infección.

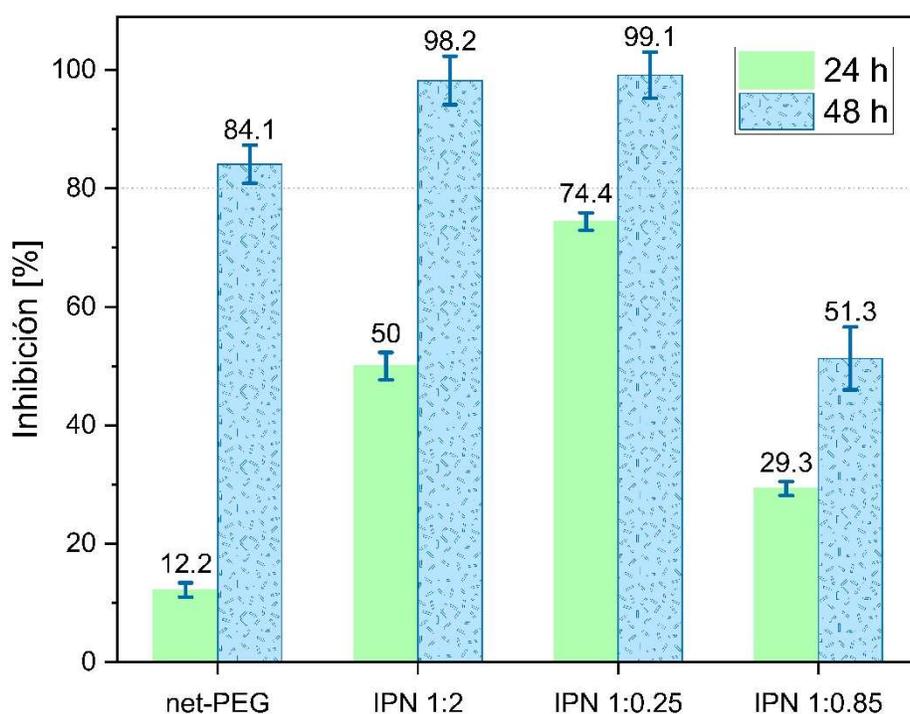


Figura 44. Porcentaje de inhibición de la bacteria *S. Epidermis* que presentan las IPNs con distinto porcentaje de PNiPAAm presente.

Los resultados obtenidos respecto a la inhibición de *S. epidermis* son altamente alentadores y congruentes con la potencial aplicación de las redes interpenetrantes como materiales útiles en apósitos de heridas.

Asimismo, se evaluó la respuesta que presentaron las IPNs al estar en contacto con una bacteria gram-negativa como lo es la *E. coli*. La gráfica que se presenta en la Figura 45 y muestra que no hay efecto sobre la inhibición bacteriana durante las primeras 24 h. Sin embargo, a las 48 h, hay un % inhibición de ~95% por parte de las redes con una relación PEG:PNiPAAm de 1:0.25 y 1:0.85.

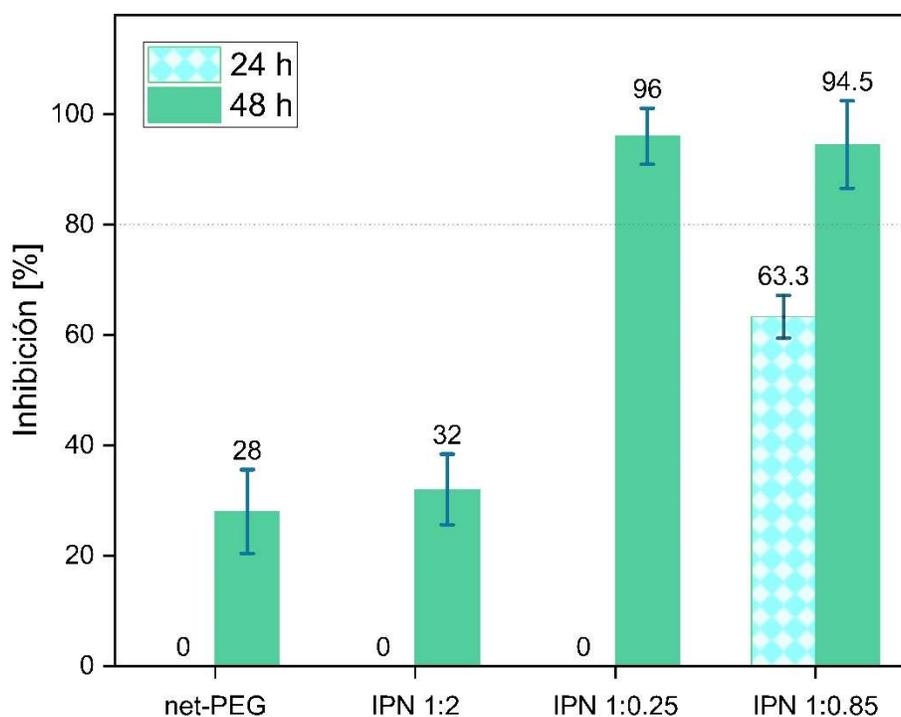


Figura 45. Porcentaje de inhibición de *E. coli* en IPNs con distintos porcentajes de PNiPAAm interpenetrada después de 24 h.

Es importante recordar que el principal objetivo del trabajo es lograr materiales que exhiban propiedades antiadherentes. Los resultados obtenidos de las pruebas microbiológicas sugieren que el uso de las redes interpenetrantes sintetizadas en este trabajo podría ser útil para inhibir el crecimiento bacteriano durante las primeras 24 y 48 h, tiempo crítico para la formación de biopelículas después de un procedimiento médico o en el caso haberse generado una herida.

3.10 Caracterización mecánica

Los materiales biocompatibles son popularmente definidos como aquellos que cumplen una aplicación específica sin causar ningún daño al portador o huésped (Chen, et al., 2008). Uno de los principales usos de los hidrogeles en el ámbito biomédico, como se ha mencionado anteriormente, es como apósitos de heridas, debido a que proveen un ambiente húmedo que ayuda a la rápida recuperación de los tejidos, pueden ser adaptados a distintas formas, pueden constituirse como portadores de fármacos para liberación local y poseen una rigidez comparable a la de los tejidos vivos. Se ha demostrado que la rigidez de los materiales apósitos tiene un efecto directo sobre el proceso de curación, por lo cual, en este trabajo se obtuvieron las mediciones con valores locales de rigidez.

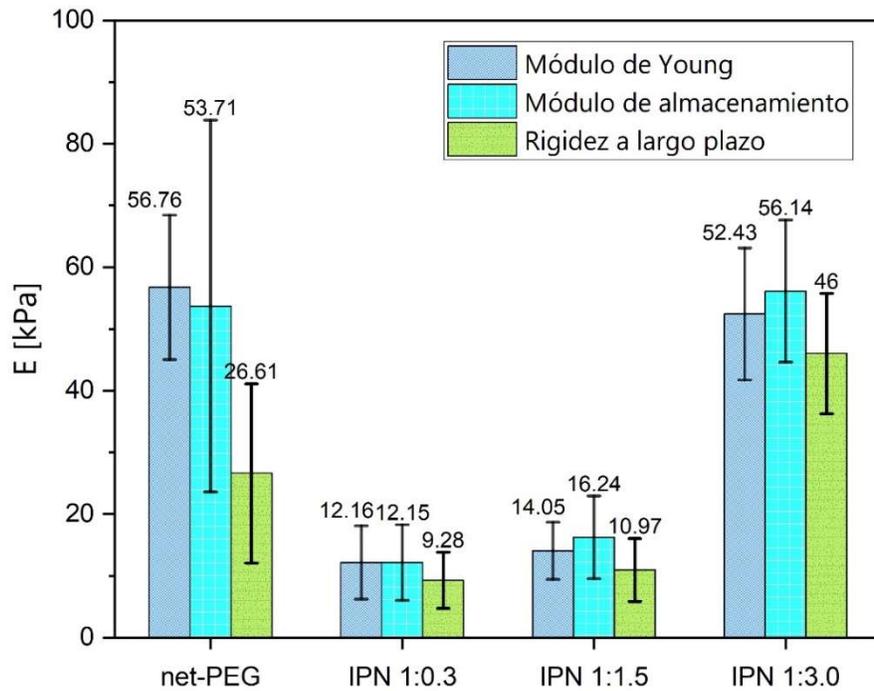


Figura 46. Valores de rigidez de la red de PEG y las IPNs variando la cantidad de PNiPAAm presente.

Como puede observarse en la Figura 46 y en la Tabla 3, se registraron los datos del módulo de Young (E), el módulo de almacenamiento (E') y del valor de rigidez a largo plazo (E_{∞}). El valor de E corresponde solamente a la parte “elástica ideal” de los hidrogeles; sin embargo, considerando que estos materiales tienen un comportamiento más bien viscoelástico, se incluyen los valores de E' y E_{∞} que indican su comportamiento mecánico a través del tiempo.

Tabla 3. Valores de rigidez obtenidos por microindentación y ensayos de relajación.

	Relación PEG:PNiPAAm	E (kPa)	E' (25 Hz) (kPa)	E _∞ (kPa)
<i>net</i> -PEG	1:0	56.76±11.77	53.71±30.10	26.61±14.5 7
<i>(net</i> -PEG)- <i>inter</i> <i>(net</i> -PNiPAAm)	1:0.3	12.16±5.95	12.15±6.13	9.28±4.55
	1:1.5	14.05±4.64	16.24±6.70	10.97±5.09
	1:3	52.43±10.72	56.14±11.50	46.00±9.75

Los resultados obtenidos indican que la rigidez va disminuyendo en los hidrogeles conforme la PNiPAAm se hace presente en la IPN, puede notarse que una vez entrecruzada la PNiPAAm, la rigidez disminuye, pero este valor empieza a crecer con una mayor presencia de este segundo polímero. Esto puede deberse a que el valor resultante de este experimento es un valor local, por lo que con una menor cantidad de PNiPAAm, la densidad de entrecruzamiento en la superficie es menor y, por lo tanto, la rigidez se reduce.

Además, estos resultados están acorde a la literatura donde se señala que el uso de una segunda red polimérica cambia las propiedades mecánicas del material (Dragan, 2014), además de que el valor de la rigidez podría ser manipulado a través de la presencia de PNiPAAm en la IPN final.

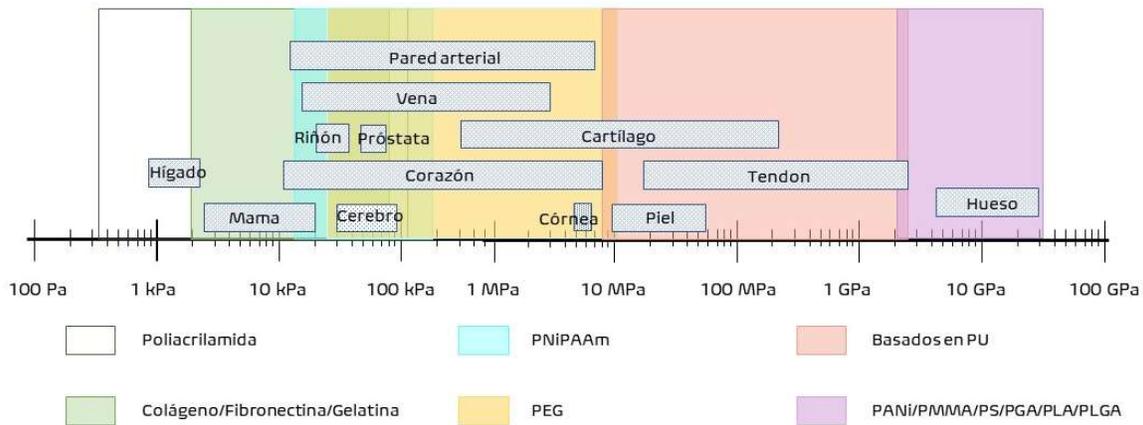


Figura 47. Propiedades mecánicas de algunos polímeros en comparación con algunos tejidos. Adaptado de (Abalymov, et al., 2020).

Aunque existen una gran cantidad de datos reportados respecto al valor de las propiedades mecánicas de la piel, estos varían mucho entre sí, ya que son dependientes de la técnica, las herramientas (Ahearne, et al., 2008) y la profundidad a la que se lleva a cabo la medición. Por otro lado, hay que considerar que los tejidos humanos no tienen un valor constante de rigidez, sino un gradiente de rigidez. Esto sucede p. ej. en los discos intervertebrales, vasos sanguíneos y las capas de la piel (Vedadghavami, et al., 2017). Los valores reportados en la Figura 47Tabla 3 indican conjuntamente, que estas IPNs podrían ofrecer un ambiente similar en rigidez a los tejidos epiteliales puesto que los valores de su módulo de Young se encuentran en el intervalo de 10-60 kPa. Si estos valores se comparan con los valores reportados por (Feng, et al., 2022) para el módulo de Young de la epidermis junto con el estrato córneo (~4 MPa medidos a 4-10 kHz), dermis e hipodermis (40 kPa y 15 kPa respectivamente, a 0.2-1 kHz) o con los datos que reporta (Abalymov, et al., 2020), las IPNs sintetizadas pueden efectivamente tener potenciales aplicaciones como apósitos primarios, como se propone en este trabajo, o en otras aplicaciones para la industria y desarrollo de la ingeniería de tejidos (Fan, et al., 2021).

4. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar la red interpenetrante de PEG y PNiPAAm a través de una metodología que combina la radiación ionizante y un método químico convencional. Debido a esta mezcla, se logró reducir la cantidad de agentes químicos utilizados y se empleó un disolvente amigable con el ambiente, como lo es el agua.

Se obtuvo un material que presenta propiedades antiadherentes según las pruebas con ovoalbúmina (proteína), fibroblastos de ratón BALB/3T3.

La red de (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-PNiPAAm) conserva las propiedades estímulo-sensibles respecto a la temperatura, lo cual se demostró a través de estudios de hinchamiento variando la temperatura y mediante el estudio de DSC, esto podría ser útil para reducir respuestas proinflamatorias en el caso de su uso como apósito primario.

Como pudo verse tanto en las micrografías tomadas mediante SEM, e indirectamente en los estudios de hinchamiento, las IPN obtenidas son materiales altamente porosos, lo que, aunado a la hidrofiliidad propia del PEG y la PNiPAAm, explica su comportamiento como materiales super

absorbentes. Sin embargo, si se desea determinar el tamaño de poro con mayor precisión, debe emplearse otra técnica.

Debido a la estructura altamente porosa de las redes interpenetrantes, con macroporos que facilitan el transporte de nutrientes o fármacos, este material podría ser utilizado como un apósito activo que contenga algún agente cicatrizante o fármaco que aceleren y mejoren el proceso de cicatrización, lo cual se plantea como una perspectiva futura de investigación.

Con base en los resultados de citotoxicidad mostrados por las IPNs, puede concluirse que los materiales sintetizados son citocompatibles.

Los resultados obtenidos de las muestras microbiológicas sugieren que, si las IPNs sintetizadas se utilizan en apósitos primarios para heridas epiteliales, se podrían evitar o disminuir el número de infecciones causadas por *S. Epidermis*, ya que estos materiales inhiben a la bacteria en >90%, sin importar la cantidad de PNiPAAm presente. Este resultado es particularmente importante debido a que esta bacteria ha desarrollado una alta resistencia a antibióticos (causante del MERSA).

Las pruebas mecánicas presentadas indican que las redes de (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-PNiPAAm) varían en cuanto a su módulo de Young conforme se aumenta la presencia de PNiPAAm. Sin embargo, los valores obtenidos sugieren que

la rigidez local de las redes está en el orden de los kPa, lo que podría ayudar en el caso en que estas se utilizaran en aplicaciones biomédicas como los apósitos de heridas o en general, en aplicaciones dirigidas a la ingeniería de tejidos, ya que presenta propiedades mecánicas con valores similares a los tejidos humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ELECTRÓNICAS

Ábalos, C., 2005. Adhesión bacteriana a biomateriales. *Avances en odontoestomatología*, 21(1), pp. 347-353.

Abalymov, A., Parakhonskiy, B. & Skirtach, A. G., 2020. Polymer- and Hybrid-Based Biomaterials for Interstitial, Connective, Vascular, Nerve, Visceral and Musculoskeletal Tissue Engineering. *Polymers*, 12(3), p. 620.

Abé, H.; Hayashi, K.; Sato, M. (Eds), 1996. *Data Book on Mechanical Properties of Living Cells, Tissues and Organs*. s.l.:Springer.

Ahearne, M., Yang, Y. & Liu, K.-K., 2008. Mechanical Characterization of Hydrogels for Tissue Engineering Applications. En: *Topics in Tissue Engineering*. s.l.:s.n., pp. 4(12), 1-16.

Ai, F. y otros, 2021. Research into the super-absorbent polymers on agricultural water. *Agricultural Water Management*, 245(106513).

Albarrán, G., Mendoza, E. & Cruz-Zaragoza, E., 2017. Dosimetría Química de irradiadores gamma de ^{60}Co y ^{137}Cs de uso semi-industrial e investigación. *Nova Scientia*, 9(19), pp. 113-133.

amsbio, 2018. *AMS Biotechnology (Europe) Limited | Life Science*. [En línea] Available at: http://www.amsbio.com/datasheets/Alvetex_datasheet.pdf

Anon., 2018. *Safety4Sea*. [En línea] Available at: <https://safety4sea.com/cm-understanding-marine-biofouling-how-anti-fouling-systems-prevent-growth/> (Último acceso: 17 Junio 2021).

Anseth, K. S., Bowman, C. N. & Brannon-Peppas, L., 1996. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, 17(17), pp. 1647-1657.

Ashfaq, A. y otros, 2020. Polymerization Reactions and Modifications of Polymers by Ionizing Radiation. *Polymers*, pp. 12, 2877.

Bhatnagar, D. y otros, 2016. Effects of Terminal Sterilization on PEG-Based Bioresorbable Polymers Used in Biomedical Applications. *Macromolecules Materials and Engineering*, 301(10), pp. 1211-1224.

Britto, E. J., Nezwek, T. A. & Robins, M., 2022. *Wound Dressings*. Enero: StatPearls (Internet). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Britto, E., Nezwek, T., Popowicz, P. & Robins, M., 2022. *Wound dressings*. [En línea] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470199/> [Último acceso: 2021].

Chai, Q., Jiao, Y. & Yu, X., 2017. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*, 3(6).

Chen, G. y otros, 2022. Calcium alginate/PNIPAAm hydrogel with body temperature response and great compatibility: Application as wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volumen 216, pp. 686-697.

Chen, H. y otros, 2008. Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions. *Progress in Polymer Science*, 33(11), pp. 1059-1087.

Chen, S. y otros, 2016. Study of stiffness effects of poly(amidoamine)- poly(n-isopropyl acrylamide) hydrogel on wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volumen 140, pp. 574-582.

Chen, S. y otros, 2016. Study of stiffness effects of poly(amidoamine)-poly(n-isopropyl acrylamide) hydrogel on wound healing. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 140(2016), pp. 574-582.

Chen, S. y otros, 2015. Mesenchymal stem cell-laden antiinflammatory hydrogel enhances diabetic wound healing. *Scientific Reports*, 5(18104).

Cipriano, B. y otros, 2014. Superabsorbent Hydrogels That Are Robust and Highly Stretchable. *Macromolecules*, 47(13), pp. 4445-4452.

Clínica Universidad de Navarra, s.f. *Diccionario Médico*. [En línea] Available at: <https://www.cun.es/diccionario-medico> [Último acceso: 6 04 2022].

Cruz-Gómez, A., Pérez-Calixto, M., Velazco-Medel, M. A. & Burillo, G., 2022. Antifouling IPNs made of poly(ethylene glycol)/poly(N-isopropyl acrylamide) using gamma radiation. *MRS Communications*, pp. 12, 272-278.

Damodaran, V. B. & Murthy, N. S., 2016. Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials. *Biomaterials Research*, 20(18).

de Moura, M. R. y otros, 2006. Thermo-sensitive IPN hydrogels composed of PNIPAAm gels supported on alginate-Ca²⁺ with LCST tailored close to human body temperature. *Polymer Testing*, Volumen 25, pp. 961-969.

De Santis, S., La Mesa, C. & Masci, G., 2017. On the upper critical solution temperature of PNIPAAm in an ionic liquid: Effect of molecular weight, tacticity and water. *Polymer*, Volumen 120, pp. 52-58.

Dick, M. K., Miao, J. H. & Limaiem, F., 2022. *Histology, Fibroblast*. [Updated 2022 May 8]. In: *StatPearls (Internet)*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.. [En línea] Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541065/#_NBK541065_pubdet

Dorati, R. y otros, 2008. γ -irradiation of PEGd,IPLA and PEG-PLGA Multiblock Copolymers: II. Effect of Oxygen and EPR Investigation. *AAPS PharmSciTech*, 9(4), pp. 1110-1118.

Dragan, E. S., 2014. Advances in interpenetrating polymer network hydrogels and their applications. *Pure and Applied Chemistry*, 86(11), pp. 1707-1721.

Dragan, E. S., 2014. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chemical Engineering Journal*, Volumen 243, pp. 572-590.

El Hariri El Nokab, M. & van der Wel, P. C. A., 2020. Use of solid-state NMR spectroscopy for investigating polysaccharide-based hydrogels: A review. *Carbohydrate Polymers*, 240(116276).

El-Sherbiny, I. M. & Yacoub, M. H., 2013. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and Challenges. *Global Cardiology Science and Practice*, pp. 38, 317-342.

Fan, F., Saha, S. & Hanjaya-Putra, D., 2021. Biomimetic Hydrogels to Promote Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(718377).

Feng, X. D., Guo, X. Q. & Qiu, K. Y., 1988. Study of the initiation mechanism of the vinyl polymerization with the system persulfate/N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine. *Die Makromolekulare Chemie*, 189(1), pp. 77-83.

Feng, X. y otros, 2022. In vivo stiffness measurement of epidermis, dermis, and hypodermis using broadband Rayleigh-wave optical coherence elastography. *Acta Biomaterialia*, Volumen 146, pp. 295-305.

Freshney, R. I., 2010. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6a. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell.

Gao, X. y otros, 2013. pH- and thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid derivative) copolymers and hydrogels with LCST dependent on pH and alkyl side groups. *Journal of Materials Chemistry B*, Volumen 1, pp. 5578-5587.

Ghobashy, M. M., 2018. Ionizing Radiation-Induced Polymerization. En: *Ionizing Radiation Effects and Applications*. s.l.:Intech Open, pp. 113-133.

Ghomi, E. R. y otros, 2019. Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(47738).

Goujon, L. J. y otros, 2011. Flexible Solid Polymer Electrolytes Based on Nitrile Butadiene Rubber/Poly(ethylene oxide) Interpenetrating Polymer Networks Containing Either LiTFSI or EMITFSI. *Macromolecules*, 44(24), pp. 9683-9691.

Graham, H. K., McConnell, J., Limbert, G. & Sheratt, M. J., 2019. How stiff is skin?. *Experimental Dermatology*, 28(Suppl. 1), pp. 4-9.

- Guo, S. & DiPrieto, L. A., 2010. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), pp. 219-229.
- Hacker, M. C. & Mikos, A. G., 2011. Synthetic Polymers. En: (Editores). *Principles of Regenerative Medicine*. 2 ed. s.l.:Elsevier, pp. 587-622.
- Herman, T. F. & Bordonni, B., 2022. *National Library of Medicine*. [En línea] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554456/> (Último acceso: julio 2022).
- Kolouchová, K. et al., 2021. Thermoresponsive properties of polyacrylamides in physiological solutions. *Polymer Chemistry*, Issue 12, pp. 5077-5084.
- Leung, H. W., 2014. Polyethylene Glycol. En: *Encyclopedia of Toxicology*. s.l.:Elsevier, pp. 1043-1044.
- Li, X. y otros, 2018. Functional Hydrogels With Tunable Structures and Properties for Tissue Engineering Applications. *Frontiers in Chemistry*, 6(499).
- Luo, T., Zhu, L., Wang, Y. & Liao, J., 2022. A Review on the Design of Hydrogels With Different Stiffness and Their Effects on Tissue Repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volumen 10.
- Maan, A. M. C., Hofman, A. H., de Vos, W. M. & Kamperman, M., 2020. Recent Developments and Practical Feasibility of Polymer-Based Antifouling Coatings. *Advanced Functional Materials*, 30(2000936).
- Malmonge, S. M., 2017. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. En: *Biocompatible Hydrogels*. s.l.:s.n.
- Maltman, D. J. & Pzryborski, S. A., 2010. Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. *Biochemical Society Transactions*, pp. 38, 1072-1075.
- Ma, Y. y otros, 2022. Recent Advances in Macroporous Hydrogels for Cell Behavior and Tissue Engineering. *Gels*, 8(10), p. 606.
- McNeil, S., 2008. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*, 11(5), pp. 26-35.
- Means, A. K. & Grunlan, M. A., 2019. Modern Strategies To Achieve Tissue-Mimetic, Mechanically Robust Hydrogels. *ACS Macro Letters*, 8(6), pp. 705-713.
- Merten, O.-W., 2014. Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philosophical Transactions Royal Society B*, pp. 370, 1-22.
- Mestieri, L. B. y otros, 2020. Cytocompatibility and cell proliferation evaluation of calcium phosphate-based root canal sealers. *Restorative Dentistry and Endodontics*, 45(1).
- Nayak, P. K., 2015. Thermo-Responsive Poly(N-Isopropylacrylamide) and its Critical Solution. *Tesis de maestría*.

- O'Brien, F. J., 2011. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, pp. 14(3), 88-95.
- Ortega, A., Burillo, G. & Bucio, E., 2008. New interpenetrating polymer networks of N-isopropylacrylamide/ N-acryloxysuccinimide: Synthesis and characterization. *Polymer Bulletin*, Volumen 60, pp. 515-524.
- Pérez-Calixto, D. y otros, 2021. Determination by Relaxation Tests of the Mechanical Properties of Soft Polyacrylamide Gels Made for Mechanobiology Studies. *Polymers*, 13(629).
- Phillips, S. J., 2000. Physiology of wound healing and surgical wound care. *American Society for Artificial Internal Organs Journal*, 46(6).
- Plunkett, K. N., Zhu, X., Moore, J. S. & Leckband, D. E., 2006. PNIPAM chain collapse depends on the molecular weight and grafting density. *Langmuir*, 22(9), pp. 4259-4266.
- Queen, D., Orsted, H., Sanada, H. & Sussman, G., 2004. A dressing history. *International Wound Journal*, 1(1), pp. 59-77.
- Roland, C. M., 2013. Interpenetrating Polymer Networks (IPN): Structure and Mechanical Behavior. En: *Encyclopedia of Polymers Nanomaterials*. Berlin: Springer-Verlag.
- Rosiak, J., Olejniczak, J. & Charlesby, A., 1988. Determination of the radiation yield of hydrogels crosslinking. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 32(5), pp. 691-694.
- Ruiz, J.-C., 2007. Formación de redes interpenetrantes del copolímero de injerto PP-g-PAAc con PNIPAAm, y estudio de su respuesta a temperatura y pH. *Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Ruiz, J.-C., Burillo, G. & Bucio, E., 2007. Interpenetrating Thermo and pH Stimuli-Responsive Polymer Networks of PAAc/PNIPAAm Grafted onto PP. *Macromolecular Materials and Engineering*, Volumen 292, pp. 1176-1188.
- Schild, H. G., 1992. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science*, 17(2), pp. 163-249.
- Sorg, H. y otros, 2017. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, 58((1-2)), pp. 81-94.
- Sperling, L. H., 1994. Interpenetrating Polymer Networks. En: D. Klemperer, L. H. Sperling & L. A. Utracki, edits. *Interpenetrating Polymer Networks: An Overview*. s.l.:American Chemical Society, pp. 3-38.
- Sua, X., Changa, R., Zhang, J. & Ma, Q., 2022. Preparation and performance study of AEEA/SA porous salt-resistant superabsorbent polymer. *Materials Today Communications*, 33(104805).
- Tanaka, Y., Gong, J. P. & Osada, Y., 2005. Novel hydrogels with excellent mechanical performance. *Progress in Polymer Science*, 30(1), pp. 1-9.

- Taylor, M. J., Tomlins, P. & Sahota, T. S., 2017. Thermoresponsive Gels. *Gels*, 3(4).
- Teotia, A. K., Sami, H. & Kumar, A., 2015. 1 - Thermo-responsive polymers: structure and design of smart materials. En: Z. Zhang, ed. *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications*. s.l.:Woodhead Publishing, pp. 3-43.
- Tucker, A. K. & Stevens, M. J., 2012. Study of the Polymer Length Dependence of the Single Chain Transition Temperature in Syndiotactic Poly(N-isopropylacrylamide) Oligomers in Water. *Macromolecules*, 45(16), pp. 6697-6703.
- Usanmaz, A., Özdemir, T. & Polat, Ö., 2009. Solid State Polymerization of N-vinylcaprolactam via Gamma Irradiation and Characterization. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, pp. 46(6), 597-606.
- Vedadghavami, A. y otros, 2017. Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, Volumen 62, pp. 42-63.
- Vela-Anaya, G., Stegensek-Mejía, E. & Leija-Hernández, C., 2018. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 26(2), pp. 105-114.
- Wallace, H. A., Basehore, B. M. & Zito, P. M., 2022. *Wound Healing Phases*. [En línea] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/> (Último acceso: 2020).
- Wang, D. y otros, 2016. Stimuli-Responsive Polymers: Design, Synthesis, Characterization, and Applications. *International Journal of Polymer Science*, p. Article ID 6480259.
- Wang, J., Liu, F. & Wei, J., 2011. Enhanced adsorption properties of interpenetrating polymer network hydrogels for heavy metal ion removal. *Polymer Bulletin*, Volumen 67, pp. 1709-1720.
- Werner, P., Münzberg, M., Hass, R. & Reich, O. R., 2017. Process analytical approaches for the coil-to-globule transition of poly(N-isopropylacrylamide) in a concentrated aqueous suspension. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(3), pp. 807-819.
- Xiang-Zheng, Z., Da-Qing, W. & Chih-Chang, C., 2004. Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN-PNIPAAm hydrogels. *Biomaterials*, pp. 25, 3793-805.
- Yang, Z., Zhang, W., Zou, J. & Wenfang, S., 2007. Synthesis and thermally responsive characteristics of dendritic poly(ether-amide) grafting with PNIPAAm and PEG. *Polymer*, 48(4), pp. 931-938.
- Zhang, Q., Weber, C., Schubert, U. S. & Hoogenboom, R., 2017. Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperature: from fundamental aspects and measuring techniques to recommended turbidimetry conditions. *Materials Horizons*, Issue 4, pp. 109-116.

Zohuriaan-Mehr, M. & Kabiri, K., 2017. Superabsorbent Polymer Materials: A Review. *Iranian Polymer Journal*, 17(6), pp. 451-477.

ANEXO I

Medición de adsorción de ovoalbúmina sobre (*net*-PEG)-*inter*-(*net*-PNiPAAm)

Para realizar la cuantificación de proteínas adheridas sobre las IPNs, se siguió el siguiente procedimiento.

a) Curva de calibración

1. Se prepararon 25 mL de una disolución (madre) de ovoalbúmina de 8 mg/mL de concentración con agua Milli-Q.
2. Se realizaron 6 diluciones de la disolución preparada en el punto anterior. Para la primera dilución se tomaron 5 mL de la disolución madre y se aforó a 25 mL con agua Milli-Q. La concentración de la dilución 1 fue de 1.6 mg/mL .
3. Para las siguientes diluciones se tomaron 3.75 mL, 2.81 mL, 1.88 mL, 0.94 mL y 0.63 mL de la dilución 1 y se aforó a 5 mL con agua Milli-Q.
4. Se colocó agua Milli-Q en la rejilla de referencia del equipo UV-Vis.
5. Se tomaron alícuotas de las diluciones y se midieron los valores de absorbancia con una longitud de onda $\lambda = 280 \text{ nm}$.
6. Se graficaron los datos de la concentración respecto a la absorbancia de las diluciones, esto se muestra en la 
7. Los datos se muestran en la Tabla 4.

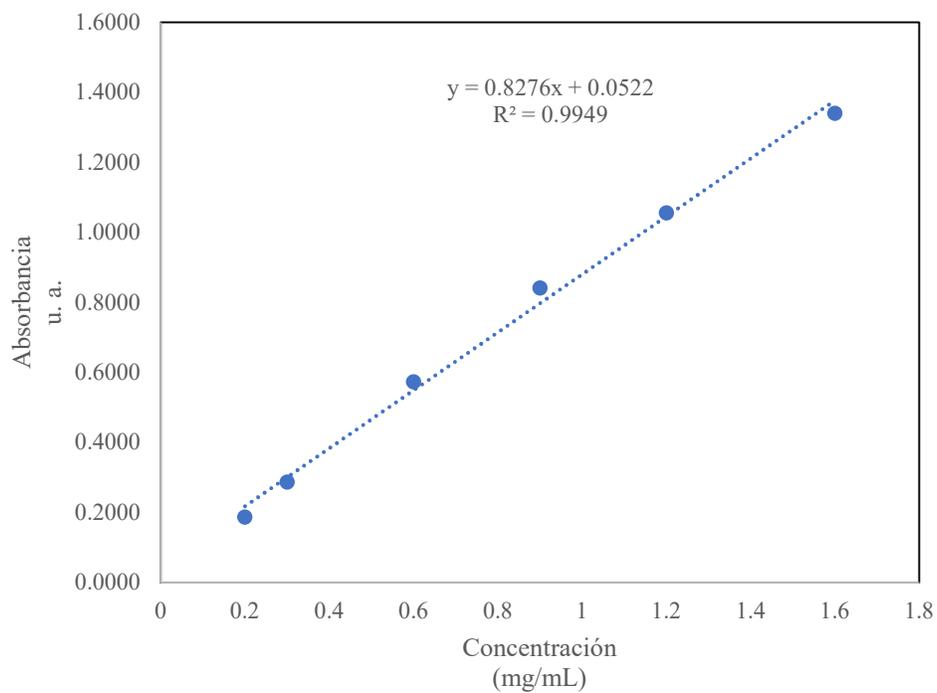


Figura 48. Curva de calibración de ovalbúmina para su cuantificación por medio de espectroscopía UV-Vis.

Tabla 4. Tabla de datos de la curva de calibración de ovoalbúmina.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Media	Desviación Estándar	Xi [%]	Factor de respuesta Yi/Xi	Media	Desviación Estándar	CVFR
Xi	Yi							
1.6	1.3354	1.3404	0.0076	0.5703	0.8346	0.8378	0.0048	0.5703
1.6	1.3492				0.8433			
1.6	1.3366				0.8354			
1.2	1.0545	1.0562	0.0025	0.2335	0.8788	0.8801	0.0021	0.2335
1.2	1.059				0.8825			
1.2	1.055				0.8792			
0.9	0.8414	0.8415	0.0011	0.1314	0.9349	0.9350	0.0012	0.1314
0.9	0.8427				0.9363			
0.9	0.8405				0.9339			
0.6	0.58	0.5739	0.0060	1.0383	0.9667	0.9564	0.0099	1.0383
0.6	0.5681				0.9468			
0.6	0.5735				0.9558			
0.3	0.2876	0.2871	0.0006	0.1919	0.9587	0.9569	0.0018	0.1919
0.3	0.2865				0.9550			
0.3	0.2871				0.9570			
0.2	0.1877	0.1871	0.0006	0.2943	0.9385	0.9357	0.0028	0.2943
0.2	0.1866				0.9330			
0.2	0.1871				0.9355			