



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MEMBRANAS DE
ALGINATO CON PRODUCTOS NATURALES CON POTENCIAL
USO EN CICATRIZACIÓN DE HERIDAS**

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICAS FARMACÉUTICAS BIÓLOGAS

P R E S E N T A N:

MÓNICA CITLALLI GUADARRAMA ACEVEDO

RAISA ALEJANDRA MENDOZA FLORES



ASESOR DE TESIS: DR. GERARDO LEYVA GÓMEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. MARÍA LUISA DEL PRADO AUDELO

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



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 ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

VOCAL: Profesor: VERONICA ZAMORA SALAZAR

SECRETARIO: Profesor: GERARDO LEYVA GOMEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: BERENICE OVALLE MAGALLANES

2do. SUPLENTE: Profesor: CARLOS JUAREZ OSORNIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Gerardo Leyva Gómez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. María Luisa Del Prado Audelo

SUSTENTANTES:

Mónica Citlalli Guadarrama Acevedo

Raisa Alejandra Mendoza Flores

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	14
II. INTRODUCCIÓN	16
III. ANTECEDENTES	19
1. Anatomía y fisiología de la piel.....	19
1.1 Epidermis.....	19
1.2 Dermis	21
1.3 Hipodermis	22
2. Heridas.....	23
3. Proceso de cicatrización de las heridas.....	23
3.1 Fase inflamatoria.....	23
3.1.1 Hemostasia.....	23
3.1.2 Inflamación.....	24
3.2 Fase proliferativa.....	25
3.2.1 Migración.....	25
3.2.2 Producción de la matriz extracelular.....	26
3.2.3 Angiogénesis	27
3.2.4 Epitelización.....	27
3.3 Fase de remodelación o de maduración	28
4. pH.....	29
5. Apósitos.....	30
5.1 Según su permeabilidad	30
5.2 Según su localización	30
5.3 Según su complejidad.....	30
5.3.1 Apósitos pasivos.....	31
5.3.2 Apósitos interactivos	31
5.3.3 Apósitos de plata	32
5.3.4 Implante de colágena-apósito	32
5.3.5 Apósitos bioactivos.....	33

6. Membrana.....	34
7. Polímeros	35
7.1 Alginato de sodio (AS).....	37
7.1.1 Características fisicoquímicas.....	39
7.2 Polivinilpirrolidona (PVP)	41
7.2.1 Reactividad.....	42
7.3 Alcohol polivinílico (PVA).....	43
7.3.1 Características fisicoquímicas.....	44
8. Plastificantes.....	45
8.1 Glicerina.....	47
8.1.1 Toxicidad.....	48
8.2 Propilenglicol.....	48
9. Productos naturales con potencial uso en la cicatrización de heridas.....	49
9.1 Palo mulato (PM).....	50
9.1.1 Actividad antibacteriana	50
9.1.2 Actividad antiinflamatoria.....	51
9.1.3 Actividad antioxidante y efecto analgésico.....	51
9.2 Curcumina	51
9.2.1 Propiedades físicas y químicas.....	52
9.2.2 Solubilidad y tautomería ceto-enólica	52
9.2.3 Efecto del pH.....	53
9.2.4 Aplicaciones terapéuticas.....	53
9.2.5 Actividad antioxidante.....	54
9.2.6 Actividad antiinflamatoria.....	54
9.2.7 Degradación.....	55
10. Nanopartículas.....	56
10.1 Nanopartículas con curcumina.....	58
10.1.1 Poloxámero 188.....	59

IV. OBJETIVOS	61
V. HIPÓTESIS	62
VI. METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL	62
11. Lista de equipos, materiales y reactivos empleados	62
11.1 Equipos.....	62
11.2 Materiales de laboratorio	63
11.3 Reactivos	63
12. Primera etapa.....	66
12.1 Preparación del gel de polímeros y de las membranas.....	66
12.2 Prueba de desintegración en H ₂ O y gelificación con iones de calcio.....	67
12.2.1 Preparación de la disolución de CaCO ₃ 0.014 M.....	67
12.3 Elaboración de las membranas con extracto acuoso de Palo Mulato.....	68
12.3.1 Preparación del extracto acuoso de Palo Mulato.....	68
12.3.2 Preparación de las membranas.....	68
12.4 Caracterización de las membranas.....	68
12.4.1 Determinación de pH.....	68
12.4.2 Prueba de hinchamiento	68
12.4.3 Ensayo mecánico.....	69
12.4.4 Evaluación sensorial.....	70
13. Segunda etapa.....	71
13.1 Preparación de nanopartículas de PCL con curcumina encapsulada (CNp)	71
13.2 Caracterización de CNp.....	73
13.2.1 Evaluación del tamaño de partícula y potencial zeta	73
13.2.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	73
13.2.3 Eficiencia de entrapamiento y porcentaje de carga	73
13.3 Elaboración de membranas de alginato con CNp (CNp-M4).....	74
13.3.1 Preparación de la dispersión de nanopartículas de PCL cargadas con curcumina al 0.01 % p/v.....	74
13.4 Caracterización fisicoquímica	74

13.4.1	Análisis termogravimétrico (TGA) de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4.....	75
13.4.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4	75
13.4.3	Estructura y morfología de M4, Pa-M4 y CNp-M4	75
13.5	Ensayo de liberación	76
13.5.1	Estudio de liberación <i>in vitro</i>	76
13.6	Ensayos de permeación.....	76
13.6.1	Estudio de permeación <i>ex vivo</i>	76
13.6.2	Estudio de permeación <i>in vivo</i>	79
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
14.	Primera etapa.....	83
14.1	Prueba de desintegración en H ₂ O y gelificación con iones de calcio.....	83
14.2	Caracterización de las membranas	85
14.2.1	Determinación de pH.....	85
14.2.2	Prueba de hinchamiento.....	85
14.2.3	Ensayo mecánico.....	89
14.2.4	Evaluación sensorial.....	92
15.	Segunda etapa.....	96
15.1	Caracterización de CNp.....	96
15.1.1	Evaluación del tamaño de partícula y potencial zeta	96
15.1.2	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	96
15.1.3	Eficiencia de entrapamiento y porcentaje de carga	97
15.2	Caracterización fisicoquímica	97
15.2.1	Análisis termogravimétrico (TGA) de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4	97
15.2.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4	99
15.2.3	Estructura y morfología de M4, Pa-M4, CNp-M4.....	101
15.3	Ensayos de liberación	104
15.3.1	Estudio de liberación <i>in vitro</i>	104
15.4	Ensayos de permeación.....	106
15.4.1	Estudio de permeación <i>ex vivo</i>	106

15.4.2 Estudio de permeación <i>in vivo</i>	111
VIII. CONCLUSIONES	114
IX. REFERENCIAS	116
X. ANEXOS	128
ANEXO I. Métodos de caracterización.....	128
Métodos de caracterización de nanopartículas	128
Evaluación del tamaño de partícula y potencial zeta.....	128
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	129
Métodos de caracterización de membranas	130
Microscopía óptica	130
Ensayos mecánicos.....	133
Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	133
Ensayos para cuantificar la permeación de fármaco en la piel	134
Tape stripping.....	134
Celdas de difusión.....	135
ANEXO II. Pruebas estadísticas en la caracterización de las membranas.....	138
ANEXO III. Cuestionario utilizado en la evaluación sensorial de las membranas.....	140
ANEXO IV. Validación de los métodos analíticos	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de pacientes con heridas agudas y crónicas, imagen modificada de [3]	17
Figura 2. Estimación de los costos directos mensuales por tipo de herida, con respecto al tipo de atención recibida. A. Atención ambulatoria, y B. Atención hospitalaria. Imagen modificada de [3]	17
Figura 3. Estructura anatómica de la piel. Modificada de [5,6].....	19
Figura 4. Histología de la piel y su división en las diferentes capas. Modificada de [8].	22
Figura 5. Proceso de cicatrización a) Fase inflamatoria, b) Fase proliferativa, c) Fase de remodelación. Modificado de [16].....	29
Figura 6. Estructura del alginato de sodio a) monosacáridos del AS, (1,4)- β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G), b) bloques G y M, unidos mediante enlaces O-glucosídicos.	38
Figura 7. Bloques G al formar la estructura de "caja de huevo" mediante interacciones iónicas con Ca^{2+}	39
Figura 8. Estructura química de la PVP.	41
Figura 9. Estructura química del PVA.....	43
Figura 10. Reacción para la síntesis del PVA.....	44
Figura 11. Estructura química de la glicerina	47
Figura 12. Estructura química del propilenglicol.	48
Figura 13. Palo mulato	50
Figura 14. Estructura química de la curcumina.	51
Figura 15. Tautomería ceto-enólica de la curcumina [64].....	53
Figura 16. Mecanismo de la actividad cicatrizante de la curcumina. Modificado de [64].	55
Figura 17. Representación esquemática de las estructuras de nanopartículas poliméricas: nanocápsulas y nanoesferas. Modificado de [69]	57
Figura 18. Esquema de la técnica de emulsificación-difusión. Modificado de [68].....	58
Figura 19. Diagrama de la metodología utilizada.....	65
Figura 20. Dimensiones de la membrana en forma de mancuerna.....	69
Figura 21. CNp-M4 aplicada sobre el antebrazo.	80

Figura 22. A. Aplicación de la dispersión de CNp sobre el antebrazo. B. Brazo de un voluntario después de la aplicación de dispersión de curcumina.	81
Figura 23. Antebrazo después de 6 horas de tratamiento con dispersión de CNp.	81
Figura 24. Cinta Scotch 3M® después de realizar <i>tape striping</i> sobre el sitio de tratamiento.	82
Figura 25. Porcentaje de hinchamiento de membranas en función del tiempo. A y B Formulaciones de membranas elaboradas con PVA y PVP, respectivamente (media \pm EE, n=3).	86
Figura 26. Efecto de los plastificantes, PM y CNp en el porcentaje de elongación de las membranas de alginato. * Indica diferencia significativa entre las muestras (valor de $p < 0.05$)	91
Figura 27. Efecto de los plastificantes y PM en la resistencia a la tracción de las membranas de alginato. * Indica diferencia significativa entre las muestras (valor de $p < 0.05$)	92
Figura 28. Evaluación sensorial de la textura de diferentes formulaciones de membranas.	94
Figura 29. Evaluación sensorial de la adhesión de diferentes formulaciones de membranas.	94
Figura 30. Topografía de CNp por AFM en 3D	97
Figura 31. Propiedades térmicas de M4, CNp-M4, CNp y curcumina, representadas como a, b, c y d respectivamente, analizadas mediante TGA.	98
Figura 32. Propiedades térmicas de M4, CNp-M4, CNp y curcumina, representadas como a, b, c y d respectivamente, analizadas mediante DSC.	100
Figura 33. Fotografías de microscopía óptica de membranas de alginato. A, B y C muestran una membrana de alginato sin principio activo (vehículo), cortes transversal, longitudinal y transversal respectivamente. D, E y F muestran una membrana de alginato con extracto de Palo mulato, cortes transversal, longitudinal y transversal respectivamente. G, H e I muestran una membrana de alginato con CNp, cortes transversal, longitudinal y transversal respectivamente.	102
Figura 34. Diámetro de poro y grosor de membranas de alginato con respecto a la formulación utilizada.	102

Figura 35. Membranas de alginato (M4) antes y durante el proceso de hinchamiento por la adición de PBS (A y B, respectivamente), membranas de alginato con Palo Mulato (Pa-M4) antes y durante el proceso de hinchamiento por la adición de PBS (C y D, respectivamente) y membranas de alginato con nanopartículas con curcumina (CNp-M4) antes y durante el proceso de hinchamiento (E y F, respectivamente). La escala de todas las imágenes se encuentra en centímetros. 103

Figura 36. Perfil de liberación de curcumina desde una dispersión del fármaco en agua, nanopartículas cargadas de curcumina (CNp) y una membrana de alginato con nanopartículas cargadas de curcumina (CNp-M4) en PBS pH 7.4 (0.1 M, Pluronic® F-127 2 % p/v) a 37 °C. Cada punto representa la media ± EE, n = 3..... 105

Figura 37. Permeación *ex vivo* de curcumina después de 30 h de tratamiento desde una dispersión de curcumina en agua, dispersión de CNp o membrana CNp-M4. Estrato córneo: partículas ligadas al estrato córneo obtenidas a partir de 15 tiras de cinta. Epidermis + dermis: superficie sobre la cual se dosificó el tratamiento durante 30 h. Sistémico: compartimento receptor. (Media ± EE, n = 4), ** indica $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, estadísticamente significativo. 108

Figura 38. Piel de cerdo después de 30 horas de tratamiento con dispersión de CNp. A. Parte superior de la piel de cerdo y B. Parte inferior de la piel de cerdo. 109

Figura 39. Concentración acumulada de curcumina en el estrato córneo de voluntarios sanos extraída de 15 cintas adhesivas aplicadas sobre el sitio de tratamiento después colocar membrana CNp-M4, una dispersión de CNp y una dispersión de curcumina al 0.01 % en agua por 6 h (media ± EE, n=4). . 112

Figura 40. Esquema de la liberación de nanopartículas de PCL cargadas con curcumina desde la membrana CNp-M4 hacia el estrato córneo y la liberación de curcumina mediante la erosión de las nanopartículas de PCL. 113

Figura 41. Ejemplo gráfico del perfil mecánico de un material. 132

Figura 42. Esquema de la estructura del texturómetro o equipo de pruebas mecánicas. Modificado de [122] 133

Figura 43. *Tape stripping*, se observa como los corneocitos son retirados con la tira adhesiva. Modificado de [125]. 135

Figura 44. Representación esquemática de una celda de Franz. A) Compartimento donador, B) Compartimento receptor, C) Piel, D) Baño de agua, E) Acceso para muestreo. Imagen modificada de [127].	136
Figura 45. Espectro de a) curcumina, b) cinta con corneocitos y curcumina y c) cinta con corneocitos, en acetona.	142
Figura 46. Curva de calibración de curcumina, utilizando como disolvente acetato-metanol 9:1	142
Figura 47. Curva de calibración de curcumina, utilizando como medio PBS 1x.	144
Figura 48. Curva de calibración de curcumina en acetona.....	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los apósitos pasivos. Modificada de [18]	31
Tabla 2. Clasificación de los apósitos interactivos, modificada de [18]	32
Tabla 3. Clasificación de apósitos bioactivos, modificada de [18]	34
Tabla 4. Ejemplos de la clasificación de polímeros biodegradables utilizados en la ingeniería de tejidos.	37
Tabla 5. Propiedades físicas y químicas del AS.	39
Tabla 6. Propiedades físicas y químicas de PVP K30.	42
Tabla 7. Propiedades físicas y químicas del PVA.....	43
Tabla 8. Plastificantes usados en ingeniería de tejidos	46
Tabla 9. Propiedades físicas y químicas de la glicerina	47
Tabla 10. Propiedades físicas y químicas del propilenglicol	48
Tabla 11. Propiedades físicas y químicas de la curcumina	52
Tabla 12. Formulaciones utilizadas para la elaboración de membranas de alginato.....	66
Tabla 13. Observaciones de las 13 formulaciones de membranas de alginato. En donde a) Se deshace después de cierto tiempo, b) No se deshace, c) Se hincha, d) Estructura gelatinosa y e) Se deshace al tocarla. En la presencia de burbujas, + es poco y +++++ es gran cantidad de burbujas.	84
Tabla 14. Puntuación de los atributos de evaluación sensorial	93
Tabla 15. Eventos térmicos de curcumina, CNp y membranas de alginato mediante DSC.....	100
Tabla 16. Coeficientes de correlación al cuadrado (R^2) y coeficientes obtenidos después de la regresión lineal de los datos de liberación de CNp y de la membrana CNp-M4 utilizando cuatro modelos matemáticos.....	106
Tabla 17. Diferencia estadísticamente significativa de las membranas en la prueba de hinchamiento, realizado mediante un ANOVA a 95 % de confianza.	138
Tabla 18. Diferencia estadísticamente significativa de las membranas en el porcentaje de elongación, realizado mediante un ANOVA a 95 % de confianza.	138
Tabla 19. Diferencia estadísticamente significativa de las membranas en la resistencia a la tracción, realizado mediante un ANOVA a 95 % de confianza.	139

Tabla 20. Exactitud de la curva de calibración de curcumina, utilizando como disolvente acetato-metanol 9:1	143
Tabla 21. Parámetros evaluados en la validación del método analítico para la cuantificación de curcumina utilizando como disolvente acetato-metanol 9:1	143
Tabla 22. Exactitud de la curva de calibración de curcumina, utilizando como medio PBS 1x.	144
Tabla 23. Parámetros evaluados en la validación del método analítico para la cuantificación de curcumina, utilizando PBS 1x.	145
Tabla 24. Exactitud de la curva de calibración de curcumina, utilizando como disolvente acetona.....	146
Tabla 25. Parámetros evaluados en la validación del método analítico para la cuantificación de curcumina, utilizando como disolvente acetona.....	146

I. RESUMEN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, cuando presenta una pérdida de continuidad se le conoce como herida; inmediatamente después de la creación de ésta ocurre el proceso de cicatrización.

Actualmente, existen diferentes alternativas utilizadas para el tratamiento de heridas agudas y crónicas, como el uso de apósitos. Un apósito es un producto que cubre, protege y aísla la herida de factores externos. Algunas de las características que debe presentar un apósito ideal, son: promover la regeneración y el crecimiento de tejido nuevo, ser flexible, presentar porosidad que permita el intercambio gaseoso, proteger a la herida de agentes externos, ser translúcido, permitiendo observar el proceso de cicatrización y ser fácil de retirar para no interferir con el cierre de la herida.

El objetivo del presente trabajo es crear apósitos de bajo costo, que cumplan con las características antes mencionadas, a partir de membranas de alginato combinadas con productos naturales que promueven la cicatrización, en este caso, la corteza del Palo Mulato (*Bursera morelensis*) y la Curcumina (*Curcuma longa Linn*).

Para la fabricación de las membranas se utilizó el método de *Solvent casting*, que consiste en verter el gel en un recipiente para posteriormente secarlo en la estufa de laboratorio, dando como resultado la obtención de una membrana porosa. Inicialmente se realizaron trece formulaciones diferentes de membranas de alginato de sodio con diferentes polímeros sintéticos y plastificantes. Después de realizar una prueba de desintegración en agua y de gelificación con iones de calcio, se eligieron cuatro formulaciones, a las cuales se les incorporó extracto acuoso de Palo Mulato. Posteriormente se llevó a cabo la caracterización y evaluación sensorial de las membranas.

Con los resultados obtenidos se eligió la formulación que presentó las características óptimas. A esta formulación se le incorporaron nanopartículas de policaprolactona con curcumina encapsulada (CNp), sintetizadas mediante el método de la Dra. María Luisa del Prado Audelo (Vinculación con FES Cuautitlán). Con el objetivo de determinar la capacidad de permeación de las CNp a través del estrato córneo se llevaron a cabo pruebas *in vivo*, utilizándose la técnica de *Tape stripping*, (pegar y despegar tiras adhesivas consecutivamente de la piel) y *ex vivo* utilizando piel de cerdo mediante la técnica de celdas de Franz, en ambos ensayos se cuantificó la curcumina absorbida mediante espectrofotometría UV.

Los resultados obtenidos demuestran que la membrana elegida es flexible, se adhiere fácilmente a la piel, presenta poros en su estructura, tiene alta capacidad de absorción y libera nanopartículas con curcumina. Debido a esto, las membranas presentan una potencial aplicación como apósitos cutáneos para favorecer la cicatrización de heridas.

II. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, en adultos cubre un área de alrededor de 2 m². Es responsable de funciones vitales como: protección física, química y biológica; contribuye a la regulación de la temperatura corporal y síntesis de vitamina D [1]. Cuando la piel presenta una pérdida de continuidad o mucosa producida por algún agente físico o químico se le conoce como herida [2] e inmediatamente después de la creación de ésta ocurre el proceso de cicatrización, a veces es largo, costoso y dinámico sobre el que influyen muchos factores.

Las heridas agudas y crónicas son un problema de salud pública que impacta en la calidad de vida de los pacientes que las presentan, lo que da lugar a que el Sistema Nacional de Salud se vea afectado económicamente. Los gastos de la atención de las heridas implican una importante inversión económica relacionada con la formación y contratación de recursos humanos especializados en el cuidado de heridas, la adquisición de insumos de alta tecnología, el incremento en los días de estancia hospitalaria de los pacientes (con lo que aumenta la probabilidad de desarrollar lesiones por presión), el número de reingresos, así como el aumento de las tasas de infección [3].

En un estudio realizado en el 2016 en México, conformado por 36,022 pacientes con heridas agudas y crónicas atendidas en unidades médicas de la Secretaria de Salud, se obtuvo que las heridas traumáticas son las que representan mayor incidencia (Figura 1) [3].

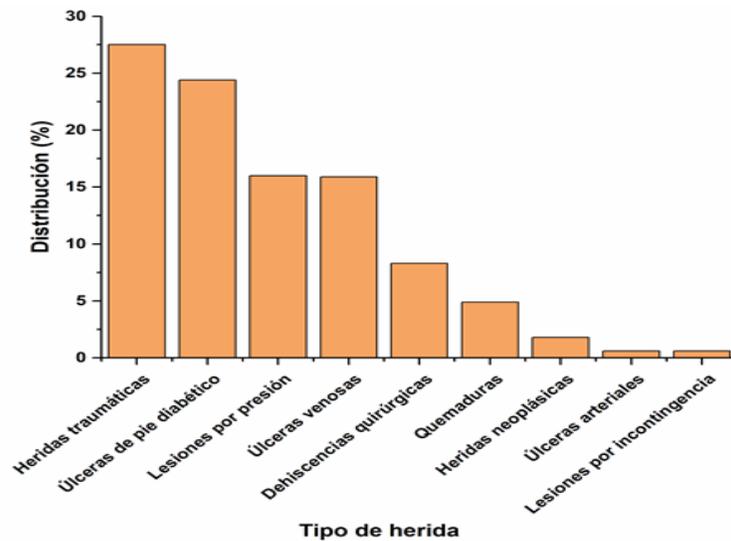


Figura 1. Distribución de pacientes con heridas agudas y crónicas, imagen modificada de [3]

Por otro lado, el costo de la atención hospitalaria de las heridas incrementa notablemente comparado con la atención ambulatoria, pues en esta última, las heridas traumáticas son las más costosas al superar los 16 millones de pesos al mes. Mientras que, en la atención hospitalaria las lesiones por presión superan los 700 millones de pesos, siendo las más costosas (Figura 2).

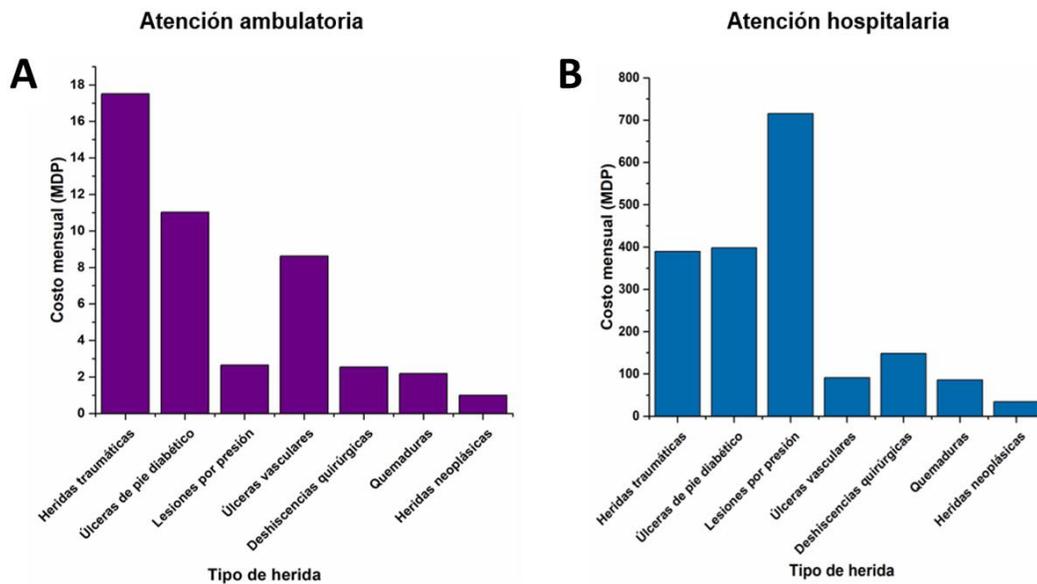


Figura 2. Estimación de los costos directos mensuales por tipo de herida, con respecto al tipo de atención recibida. A. Atención ambulatoria, y B. Atención hospitalaria. Imagen modificada de [3]

Actualmente, existen diferentes tipos de apósitos que se utilizan en el tratamiento de heridas agudas y crónicas para favorecer la cicatrización; sin embargo, la mayoría son importados y de costo elevado. Las membranas de alginato son un tipo de apósito bioactivo que interactúan con la herida teniendo como finalidad proteger, mantener la humedad fisiológica y absorber el exudado. Sin embargo, un apósito ideal además de tener las características antes mencionadas, debe ser flexible para poder ser colocado en cualquier parte del cuerpo, transparente para observar el proceso de cicatrización sin necesidad de retirarlo de la herida, debe permitir el intercambio gaseoso, tener actividad antibacteriana, promover la regeneración de tejido, además de poder removerse fácilmente de la herida.

Debido a las razones antes mencionadas, surge la necesidad de desarrollar nuevos materiales que tengan las características de un apósito ideal y sean de bajo costo.

III. ANTECEDENTES

1. Anatomía y fisiología de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, en adultos cubre un área de alrededor de 2 m² y pesa cerca del 15 % del peso total del cuerpo. Es responsable de funciones vitales como: protección física, química y biológica; contribuye a la regulación de la temperatura corporal y síntesis de vitamina D [1]. Histológicamente, la piel está compuesta por tres capas: Epidermis con un espesor de 0.4 mm a 1.6 mm, dermis de 0.6 mm a 3 mm e hipodermis cuyo espesor varía según su localización y es de 0.6 mm a 30 mm (Figura 3).

1.1 Epidermis

Está constituida de epitelio escamoso estratificado y queratinizado, cerca del 90 % de las células epidérmicas son queratinocitos, los cuales producen queratina y están distribuidos en cuatro o cinco capas, llamadas estratos (Figura 3): basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo [4]. Así mismo, la queratina es una proteína fibrosa y dura que protege la piel y el tejido subyacente del calor, microorganismos y sustancias químicas externas.

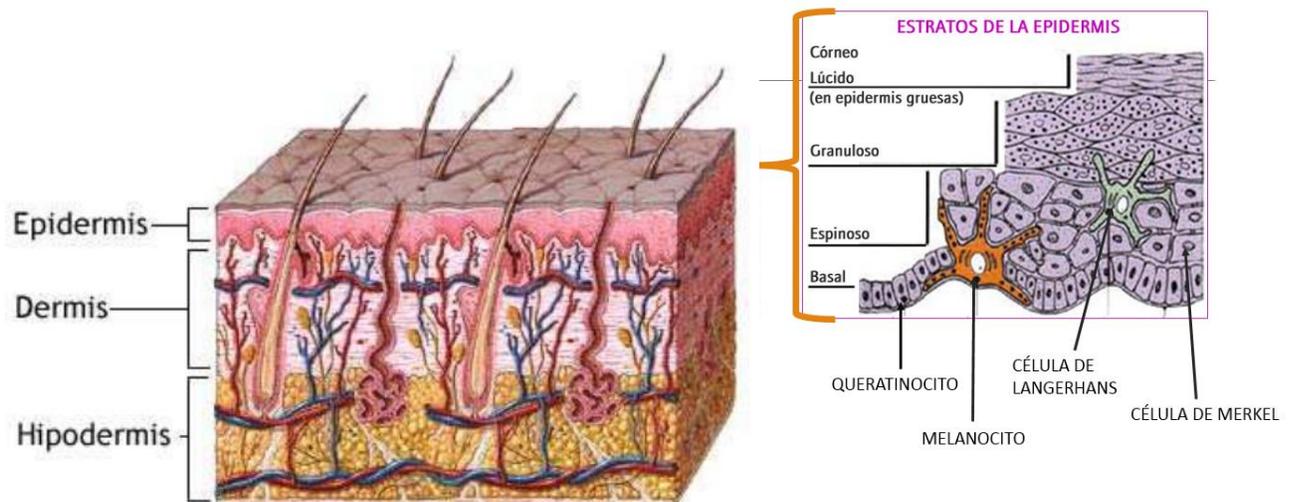


Figura 3. Estructura anatómica de la piel. Modificada de [5,6]

El estrato basal es la capa más profunda de la epidermis, está compuesto de una fila de queratinocitos con forma de cubo o cilindro, poseen un gran núcleo oval, donde destaca una gran cantidad de cromatina. Están unidos por desmosomas, que también se observan en las células de las capas superiores, donde se insertan los filamentos de queratina; mientras que en su base, que reposa sobre la membrana basal, sólo se observan hemidesmosomas, que sirven de unión dermoepidérmica [7].

Algunas células del estrato basal son células madre, que continuamente se dividen por mitosis para producir nuevos queratinocitos, aumentando por la noche [7]. En esta capa también se encuentran los melanocitos, los cuales producen melanina y son el 8 % de las células de la epidermis. La melanina es un pigmento amarillo-rojo (feomelanina) o negro-café (eumelanina) que contribuye al color de la piel y absorbe la luz ultravioleta (UV) [4], es transferida a través de las proyecciones dendríticas de los melanocitos vecinos al citoplasma de los queratinocitos basales.

Las células formadas en el estrato basal ascienden lentamente a la superficie modificando su morfología, paulatinamente pierden su núcleo y muestran numerosos gránulos de queratohialina, se aplanan hasta constituir un "mosaico". Este proceso se conoce como queratinización y tiene una duración de cuatro semanas; después de esto, ocurre la apoptosis y estas células son remplazadas en el estrato basal [4].

El estrato espinoso se encuentra en la parte superficial del estrato basal, consta de 8 a 10 capas de queratinocitos de forma irregular y diferentes tamaños. En esta capa también se encuentran las células de Langerhans, las cuales surgen de la médula ósea roja y migran a la epidermis; participan en la respuesta inmune al reconocer y procesar antígenos solubles que se encuentran en el tejido epidérmico [4].

La siguiente capa se conoce como estrato granuloso, está compuesto de 3 a 5 capas de queratinocitos aplanados. El núcleo y organelo de estas células se empiezan a degenerar en esta capa. Los queratinocitos contienen gránulos de queratohialina de forma irregular y tamaño variable [8].

El estrato lúcido sólo está presente en la piel más gruesa del cuerpo humano, como las huellas dactilares, palmas de las manos y las plantas de los pies. Consiste en tres a cinco capas de queratinocitos muertos y planos que contienen gran cantidad de queratina.

La capa más superficial es el estrato córneo (EC), está compuesto de 25 a 30 capas de queratinocitos muertos y aplanados [4].

1.2 Dermis

Es tejido conectivo denso que provee sostén mecánico, resistencia, elasticidad y espesor a la piel [8]. Está compuesta principalmente por matriz extracelular que contiene una elevada proporción de fibras no muy compactadas, de colágena (>75 %) y elastina, que proveen fuerza de tensión a la piel [9].

Las células del tejido conectivo son escasas y comprenden los fibroblastos, macrófagos, mastocitos o células cebadas, linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y monocitos. Los fibroblastos móviles se diferencian en fibrocitos, que se enlazan mediante elongación y forman un entramado tridimensional. Los fibroblastos sintetizan y liberan los precursores de colágena, elastina y proteoglicanos para construir la matriz extracelular [9].

Histológicamente, la dermis se divide en dos capas: dermis papilar y dermis reticular (Figura 4). La dermis papilar consiste de tejido conjuntivo laxo ubicado debajo de la epidermis [8], presenta proyecciones hacia el interior de la epidermis conocida como papilas dérmicas. En las papilas dérmicas se encuentran las asas capilares que proporcionan los nutrientes a la epidermis

avasascular. Está constituida por una red irregular de haces de fibras filiformes de alrededor de 75 a 85 % de colágena tipo I y aproximadamente 15 % de colágena tipo III [8]. También contiene numerosas terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos [9].

La dermis reticular es más gruesa que la papilar, y recibe ese nombre por el entramado o retícula de las fibras de colágena que forman gruesos haces entrelazados con haces de fibras elásticas. Esta estructura es la que proporciona elasticidad y capacidad de adaptación a movimientos y cambios de volumen [9].

1.3 Hipodermis

Debajo de la dermis reticular hay una capa de tejido adiposo, llamado panículo adiposo o hipodermis, cumple con funciones importantes como almacenar energía, es aislante térmico y protector mecánico frente a golpes [9]. Está constituido por células grasas o adipocitos, que están encargadas de fabricar y almacenar grasas; se disponen en lóbulos separados por tejido conectivo llamados septos o tabiques interlobulillares [10].

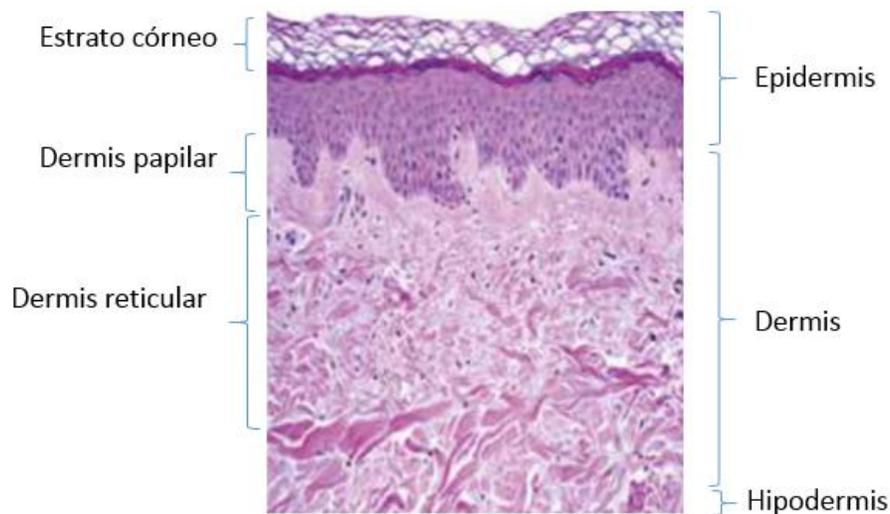


Figura 4. Histología de la piel y su división en las diferentes capas. Modificada de [8].

Cuando la piel sufre una disrupción en su estructura y en los tejidos subyacentes, se le conoce como herida [2].

2. Heridas

Las heridas están relacionadas con diversas etiologías, como traumatismos, cirugías, úlceras de pie diabético, úlceras por presión, etc [2].

Las heridas se pueden clasificar en: agudas y crónicas. Las heridas agudas se caracterizan por tener un proceso de cicatrización sin interrupciones; mientras que las heridas crónicas se quedan estancadas en alguna etapa de la cicatrización por más de 21 días y, como resultado, no ocurre la reepitelización, lo que afecta la integridad anatómica y funcional de la piel [11].

3. Proceso de cicatrización de las heridas

Inmediatamente después de una herida ocurre el proceso de cicatrización, el cual consta de tres fases (Figura 5):

3.1 Fase inflamatoria

3.1.1 Hemostasia

Su principal función es evitar la exanguinación; para ello, el primer fenómeno que ocurre es la vasoconstricción. Al estar expuesta la matriz subendotelial, las plaquetas se pegan a esta, mediante un proceso denominado adhesión plaquetaria; para la cual, las plaquetas tienen receptores de superficie como: glicoproteínas Ib, V y IX. Además, la colágena de la membrana basal endotelial, fibronectina I y lamininas; también están implicadas en el fenómeno de adhesión plaquetaria. Posteriormente, ocurre la agregación plaquetaria, en donde las plaquetas modifican su morfología, formando prolongaciones de su citoplasma y liberan gránulos que favorecen la unión de

las membranas plaquetarias entre sí, además liberan mediadores químicos como: adenosín difosfato (ADP), catecolaminas, iones de calcio [12]. Después, se induce una cascada de señalización para realizar la conversión de fibrinógeno en fibrina, la cual se entrecruza con las plaquetas acumuladas en la herida, formando un tapón plaquetario.

3.1.2 Inflamación

Tras la hemostasia, sigue la inflamación, cuyo objetivo es eliminar los microorganismos que pudieron haber ingresado al organismo. En la clínica se manifiesta con eritema, hinchazón y dolor; consecuencia de la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad de los capilares que disminuyeron su diámetro para evitar la pérdida de sangre. Las células endoteliales liberan interleucina-1-alfa (IL-1 α); las células de Langerhans en la epidermis liberan mediadores de la inflamación; y las células mastoides liberan histamina y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [13]. Estos mediadores incrementan el flujo de la sangre al sitio de la herida e inducen la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales y la liberación de quimiocinas de varias células inmunes.

Los neutrófilos son las primeras células inflamatorias que llegan al lugar de la herida mediante diapédesis; son atraídos por diversos factores de crecimiento y citocinas como: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina 8 (IL-8), oncogén relacionado con el crecimiento (GRO)- α /CXCL1, quimiocina, factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), péptidos producidos por bacterias y los productos de las plaquetas [12]. Una vez que llegan a la herida, los neutrófilos liberan enzimas proteolíticas (elastasa y colagenasa) y especies reactivas de oxígeno (ROS); también producen citocinas proinflamatorias que participan en la atracción y producción de los fibroblastos [14]. Sin embargo, el tiempo de vida media de los neutrófilos es

de 1 día; por lo que los monocitos llegan a la herida, en donde se activan y se transforman en macrófagos [12].

Los macrófagos eliminan detritus, partículas extrañas y bacterias, alcanzando el pico máximo de población de las 48 a 72 h. Además, liberan citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α), factores de crecimiento que influyen en el proceso de epitelización [TGF- α , factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1)]; y estimulan la angiogénesis a través de FGF-2, factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A) y TGF- β [12].

3.2 Fase proliferativa

Esta fase empieza aproximadamente a partir del tercer día después de la lesión y termina dos semanas después [15]. Da lugar a la formación de un tejido de granulación y el restablecimiento de la epidermis. En la producción del tejido de granulación intervienen la migración y la proliferación de fibroblastos hacia la herida, la producción de una matriz extracelular y la angiogénesis; que en conjunto reestablecen la dermis. Así mismo, el tejido de granulación contiene macrófagos que, como se mencionó, ayudan al proceso de cicatrización [12].

3.2.1 Migración

La migración y proliferación de fibroblastos a la herida es estimulada por diferentes citocinas y factores de crecimiento producidos en la fase inflamatoria [PDGF, factor de crecimiento nervioso (NGF), TGF- β , CTGF, proteína rica en cisteína 61 (Cyr61) y fibronectina]. Los fibroblastos que migran a la herida derivan de células diferenciadas que se encuentran cerca de la lesión, y de células mesenquimales indiferenciadas que son estimuladas por diferentes productos liberados por macrófagos, para convertirse en

fibroblastos. Este proceso ocurre de forma ordenada y dirigida; para ello, los fibroblastos son dirigidos por integrinas que se expresan en su superficie celular, las cuales interaccionan con diversos componentes de la matriz (fibrina, fibronectina y ácido hialurónico). Por otra parte, las metaloproteinasas (MMP), específicamente MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-19, eliminan componentes de la matriz extracelular para que la migración de los fibroblastos sea ordenada [12].

3.2.2 Producción de la matriz extracelular

La síntesis de colágena inicia del tercer al quinto día después de haberse hecho la lesión. Empieza por la estimulación de diferentes factores de crecimiento [PDGF, TGF- β , factor de crecimiento epidérmico (EGF), IGF-1, FGF-2, factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), Cyr61 y esfingosina-1-fosfato (S1p)]; dando lugar a la formación de cadenas de polipéptidos (procolágena) en el interior de los fibroblastos, que son liberados a la matriz extracelular, en donde se agregan para formar fibrillas de colágena. En una herida reciente la proporción de colágena tipo III es de 40 a 50 %. Mientras que en la dermis normal y en las cicatrices maduras la proporción de colágena tipo I (80-90 %) es mayor que la de colágena tipo III (10-20 %) [12].

Por otra parte, los fibroblastos también sintetizan proteoglicanos, los cuales son cadenas de polipéptidos que se unen a los glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, dermatán sulfato, condroitín sulfato y heparín sulfato). Así mismo, la expresión de los glicosaminoglicanos es un proceso, al inicio predomina la expresión de ácido hialurónico, que rompe las interacciones adhesivas entre las células y la matriz de colágena con el fin de facilitar la migración de diferentes células. Después, aumenta la expresión de condroitín sulfato y dermatán sulfato, que sirven para polimerizar las moléculas de colágena en fibrillas maduras [12].

La elastina que es un componente habitual de la dermis, no se produce durante la cicatrización de una herida. Lo que podría explicar la firmeza y falta de elasticidad de las cicatrices [12].

3.2.3 Angiogénesis

La angiogénesis inicia el segundo día tras la herida, es el proceso por el que se generan nuevos vasos sanguíneos con el objetivo de nutrir el tejido de granulación. Es estimulada por los cambios locales que se producen en el tejido dañado, como el incremento en lactato, la disminución del pH y de la presión de oxígeno, por las diversas citocinas y los factores de crecimiento que se liberan durante la fase inflamatoria (VEGF, FGF, angiopoyetina, TGF- β). Cabe destacar que el TGF- β no sólo estimula la migración endotelial, su diferenciación y la formación de túbulos; sino que, amplifica el proceso [12].

3.2.4 Epitelización

El objetivo del proceso de epitelización es restablecer la epidermis sobre el tejido de granulación. Para ello, los queratinocitos que se encuentran cerca de la herida y del bulbo piloso, modifican su morfología, dando lugar a la retracción de los tonofilamentos intracelulares, la disolución de los desmosomas y hemidesmosomas y, la formación de filamentos de actina que permiten el movimiento de las células. Los queratinocitos se desplazan atravesando el tejido de granulación y continúan hasta que los extremos opuestos de la herida restablecen el contacto [12].

En este proceso se involucran numerosas citocinas y factores de crecimiento, los cuales favorecen la migración y proliferación de los queratinocitos. Además, los queratinocitos expresan en su superficie integrinas ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 5\beta 5$, $\alpha 5\beta 6$), que permiten la interacción con algunos elementos de la matriz extracelular (fibrina, fibronectina); aunado a ello, para pasar a través de la

matriz extracelular, liberan enzimas (activador plasminógeno tipo uroquinasa y MMP) que degradan diversos componentes [12].

3.3 Fase de remodelación o de maduración

Este proceso puede durar desde semanas hasta años, inicia junto con la formación del tejido de granulación en la fase proliferativa. En esta fase ocurre la contracción de la cicatriz, al mismo tiempo que disminuye el enrojecimiento, el grosor y la induración de ésta; además de incrementar su resistencia [12].

La contracción de la herida inicia el día 4 o 5 después de haberse formado la lesión. Los fibroblastos se transforman en miofibroblastos, que empieza por la acción de dos factores de crecimiento, PDGF y TGF- β . La síntesis de colágena disminuye con el tiempo, dando como resultado la disminución del grosor y el aumento de la resistencia de la cicatriz.

En una cicatriz reciente, hay gran cantidad de colágena y las fibrillas se encuentran desordenadas; con el tiempo, las fibrillas aumentan su grosor. En el proceso de remodelación, la colágena formada es escindida, se incrementan las uniones interfibrilares y se ordenan, lo que aumenta su resistencia. En este proceso participan determinadas metaloproteinasas con sus correspondientes inhibidores. Esto ocurre de forma más activa durante los primeros 6 meses. Con el tiempo, los vasos sanguíneos formados para nutrir el tejido de granulación se desintegran. Dando como resultado la disminución de la coloración en la cicatriz. Además, la densidad de fibroblastos disminuye, lo cual es una característica de la ausencia de apéndices cutáneos [12].

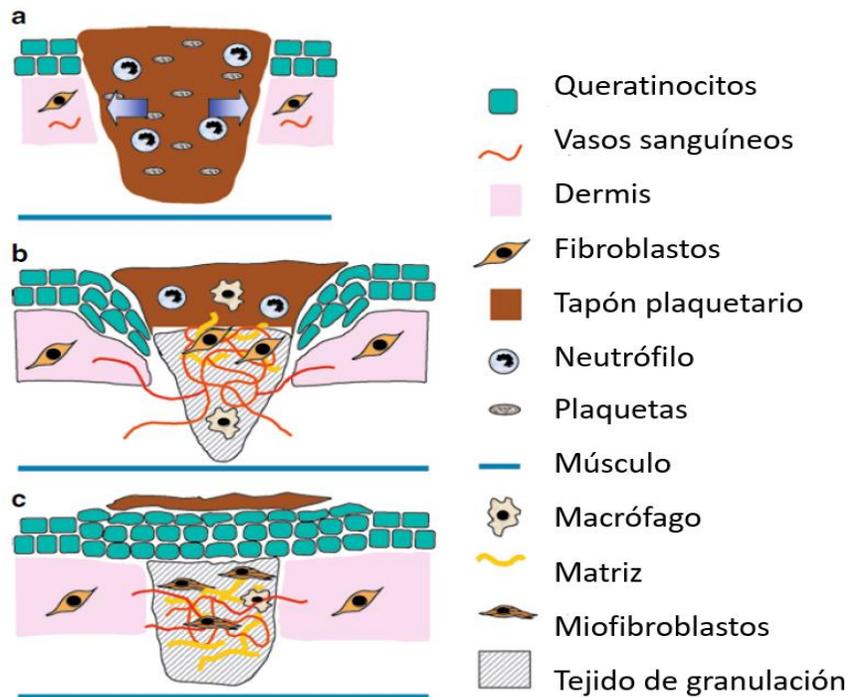


Figura 5. Proceso de cicatrización a) Fase inflamatoria, b) Fase proliferativa, c) Fase de remodelación. Modificado de [16]

4. pH

El pH es uno de los parámetros de interés en las heridas crónicas. En una persona sana varía entre cada individuo, típicamente oscila en un pH ligeramente ácido en un rango entre 4 y 6, lo cual ayuda a controlar la proliferación bacteriana. Sin embargo, cuando existe una herida en la piel expone el tejido subyacente, que se regula normalmente a 7.4; esto produce un aumento de pH a un rango débilmente alcalino entre 7 y 8, pudiendo estimular la adhesión y proliferación bacteriana, lo que aumenta la susceptibilidad a la infección [17].

La cicatrización de heridas está regulada por procesos químicos complejos mediados por varias enzimas y hormonas. Por lo tanto, varios factores intrínsecos y extrínsecos pueden influir en el pH del entorno de la herida, lo que lleva a alteraciones en el proceso de cicatrización. El utilizar cubiertas

cutáneas con un pH ligeramente ácido ayudará a cambiar el pH de la superficie corporal [17], manteniendo las condiciones óptimas en el proceso de cicatrización sin irritar la piel por un cambio drástico de pH.

5. Apósitos

Para promover los procesos que conllevan a la cicatrización de una herida, al tiempo que ésta es protegida, se ha hecho uso de apósitos, que son productos sanitarios empleados como material de curación, los cuales aíslan, protegen y optimizan el proceso de cierre de una herida.

Actualmente existen diversos tipos de apósitos, los cuales son elegidos dependiendo del tipo de tejido en donde se encuentra la herida, su localización, la profundidad y la cantidad de exudado de la misma.

Los apósitos se pueden clasificar:

5.1 Según su permeabilidad

Se encuentran los apósitos oclusivos y semioclusivos. Los primeros inhiben la transmisión de vapor de agua, fluidos de la superficie de la herida a la atmósfera y la entrada de bacterias, mientras que los semioclusivos son permeables al oxígeno, al monóxido de carbono y al vapor de agua, siendo impermeables al agua y a bacterias.

5.2 Según su localización

Se dividen en: primario, que va en contacto directo con la herida; y secundario, que se coloca sobre el primario para protegerlo y sostenerlo.

5.3 Según su complejidad

Se dividen en: apósitos pasivos, interactivos, bioactivos, apósitos de plata e implantes de colágena.

5.3.1 Apósitos pasivos

Protegen, aíslan, absorben y actúan como un tapón. Estos apósitos se clasifican como: de gasa, apósito tradicional y de espuma.

Tabla 1. Clasificación de los apósitos pasivos. Modificada de [18]

Apósitos Pasivos			
Clasificación	Composición	Indicaciones	Ejemplos Comerciales
Gasa tejida	Algodón	Desbridar y rellenar	Cranberry®
Gasa no tejida	Poliéster + rayón o celulosa	Exudado escaso a moderado	Aposán, alfaSAFE
Apósito tradicional	Gasa no tejida + algodón	Proteger	PROTEC ^{MR} Apósitos quirúrgicos,
Apósito especial	Gasa no tejida + celulosa	Aislar	Cuticell® Epigraft Gasa de Celulosa
Espuma	Poliuretano	Taponar, exudado moderado a abundante	Skin Foam

5.3.2 Apósitos interactivos

No se adhieren a la herida y mantienen un ambiente húmedo, ayudan a estimular enzimas catalíticas que favorecen la autólisis, con lo que el desbridamiento no tendrá dolor. Existen tres tipos: tul, espuma hidrofílica y apósitos transparentes adhesivos y no adhesivos [18].

Tabla 2. Clasificación de los apósitos interactivos, modificada de [18]

Apósitos Interactivos			
Clasificación	Composición	Indicaciones	Ejemplos Comerciales
Tul	Gasa tejida + antimicrobiano y/o emulsión de petrolato	Favorece cicatrización	Linitul® apósito impregnado, Hydrotul de Hartmann
Espuma hidrofílica	Poliuretano	Exudado moderado a abundante	3M™ Tegaderm™ Foam Adhesive, Apósito adhesivo de espuma adherente, Luofucon® PU Foam dressing
Transparente adhesivo	Poliuretano	Desbridamiento autolítico, proteger, favorecer cicatrización	3M™ Tegaderm™ Roll
Transparente no adhesivo	Nylon o celulosa	Favorece cicatrización	

5.3.3 Apósitos de plata

Poseen efecto antibacteriano debido a los iones de plata. Algunos ejemplos comerciales son AQUACEL® Ag Extra™ y Atrauman Ag de Hartmann.

5.3.4 Implante de colágena-apósito

La colágena funciona como una estructura sobre la cual podrá desarrollarse el nuevo tejido de granulación.

Puede usarse en quemaduras de todo tipo, incluso ha sido usada como relleno después de intervenciones de cirugía plástica mal cicatrizadas. También brinda protección a la piel en operaciones cercanas a los huesos.

Algunos ejemplos comerciales son CONDRESS Colágeno y Suprasorb® C Apósito de colágena.

5.3.5 Apósitos bioactivos

Estos apósitos interactúan con la herida manteniendo su humedad, lo cual permite la oxigenación. Existen 3 tipos: hidrocolooides, hidrogel y alginatos.

- Hidrocoloide

Se adhieren a la zona afectada y absorben moderadamente los exudados para mantener las condiciones fisiológicas que permitan la cicatrización. En general son elaborados de carboximetilcelulosa, gelatina y pectina en una base adhesiva.

Funcionan como barrera ante las bacterias, favoreciendo la granulación y epitelización en heridas y úlceras, son moldeables y protegen de la fricción. Están indicados en heridas sin infección. Su propiedad de retener la humedad permite el desbridamiento autolítico [19].

- Hidrogel

Es una red tridimensional conformada de cadenas flexibles de polímeros que absorben cantidades considerables de agua [20]. Debido a que contienen agua proporcionan un ambiente húmedo a la herida, suavizando y rehidratando al tejido necrótico, lo que promueve el desbridamiento autolítico [19].

- Alginatos

Los apósitos hechos a base de alginato generalmente se encuentran en forma de gel, mantienen un ambiente húmedo en la herida, siendo ideales para aquellas con abundante exudado debido a que pueden absorber cantidades grandes del mismo, por otro lado, debido a su alta capacidad de absorción, no se recomienda en heridas con exudado escaso [21].

Tabla 3. Clasificación de apósitos bioactivos, modificada de [18]

Apósitos Bioactivos			
Clasificación	Composición	Indicaciones	Ejemplos Comerciales
Hydrocoloides	Carboximetilcelulosa + pectina + gelatina	Favorece cicatrización, desbridamiento autolítico	Apósito Duo DERM® Extra Thin, 3M® Tegaderm® Apósito Hidrocoloide, Tiritas® Effect de Hartmann
Hidrogel	Agua + propilenglicol + agentes absorbentes como polímeros	Favorece cicatrización, desbridamiento autolítico	Hydrosorb® de Hartmann
Alginato	Polímero constituido por ácido D-manurónico y L-gulurónico	Absorber exudado de moderado a abundante	Biatain® Alginate, NU-DERM™ Alginate Wound Dressing

6. Membrana

Una membrana se define como “un sistema sólido, cuyo espesor es muy pequeño comparado con su superficie y separa dos fases macroscópicas (líquidos, gases o sólidos), experimentando un control selectivo de la transferencia de materia y energía entre ellas” [22].

En los últimos años, la tecnología de las membranas ha cobrado importancia en aplicaciones médicas, como: liberación de fármacos, órganos artificiales, ingeniería de tejidos, servicios de diagnóstico, cubiertas para servicios médicos y bioseparaciones [23].

Las membranas poliméricas son un tipo de reservorio que consisten en una capa delgada y uniforme de polímeros. Para su elaboración se utilizan diferentes métodos (*Freeze-casting, freeze drying, solvent casting*). El método

de *Solvent casting* es el más sencillo y consiste en la preparación de una disolución o un gel de polímeros, el cual se vierte en un recipiente para posteriormente secarlo en la estufa de laboratorio, dando como resultado la obtención de una membrana.

Las membranas son una alternativa usada como cubierta cutánea o apósito para promover la cicatrización de las heridas agudas y crónicas. Entre las propiedades que deben presentar para promover la formación del tejido de granulación, la epitelización y cicatrización [24], se encuentran:

- Ser flexibles y adherentes, para ser aplicadas con facilidad en la lesión, además de proporcionar soporte para la formación de tejido [24].
- Ser porosas y biocompatibles, permitiendo la producción de su propia matriz extracelular al adherirse y migrar las células a través de las redes tridimensionales. Así mismo, al presentar una estructura porosa permitirá la transpiración de la herida [24].
- Absorber el exudado de la herida, convirtiendo la membrana en gel, esto le permitirá suministrar agua a una herida seca, manteniendo un microambiente fisiológicamente húmedo [24].

Actualmente, existen membranas disponibles en el mercado como: Polimem[®], Apósitos AQUACEL[®], Cutimed[®] Alginate, Tiritas[®] MEDICAL, 3M[®] Tegaderm[®] MR Film.

7. Polímeros

Los polímeros han sido empleados en diferentes aplicaciones biomédicas; se pueden clasificar por su origen en: naturales y sintéticos. Los polímeros sintéticos son muy utilizados, generalmente presentan características reproducibles en el peso molecular, la degradación y propiedades mecánicas.

Sin embargo, no todos los polímeros sintéticos son biocompatibles ni bioactivos, por lo que su uso en aplicaciones médicas es restringido [25].

A pesar de ello, en los últimos años se ha investigado en el área de ingeniería de tejidos, el uso de polímeros sintéticos que sean biocompatibles para el tratamiento de diferentes enfermedades, entre las que destacan aquellas relacionadas con los huesos [26], aplicaciones dentales, hidrogeles y materiales de curación para la atención de heridas. En donde el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona son utilizados en la elaboración de películas o membranas, ya que les proporcionan transparencia, resistencia mecánica y elasticidad [25,26].

Por su parte, los polímeros naturales al presentar una estructura similar a los componentes presentes en la matriz extracelular, también pueden ser o no biodegradables y biocompatibles. Además, la mayoría evita la estimulación de reacciones inmunológicas crónicas y tienen baja toxicidad; por lo tanto, son fácilmente aceptados por el cuerpo [25]. Por ello, son altamente utilizados en el área de ingeniería de tejidos para la elaboración de cubiertas cutáneas para heridas [26].

Los polímeros naturales se derivan del reino animal y vegetal. Se pueden dividir en tres clases de acuerdo con su estructura química: polisacáridos, proteínas y poliésteres [25].

Los polisacáridos consisten en monosacáridos unidos entre sí por enlaces O-glucosídicos. Las características físicas de los polímeros (solubilidad, viscosidad, potencial de gelificación) son atribuidas a las diferencias en la composición de los monosacáridos, los tipos y patrones de enlace, las formas de las cadenas y el peso molecular. Se obtienen de plantas, animales y microorganismos; y por lo tanto están ampliamente distribuidos en la naturaleza [25]. Algunos ejemplos de muestran en la Tabla 4.

Sin embargo, a pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, existen algunas desventajas en el uso de los polímeros naturales, tales como, alto costo de producción (en algunos casos), variación entre lotes principalmente debido a la complejidad de su estructura y la composición química, y limitación de recursos.

Tabla 4. Ejemplos de la clasificación de polímeros biodegradables utilizados en la ingeniería de tejidos.

Origen	Clasificación	Ejemplos	Referencia
Naturales	Polisacáridos	Alginatos, agarosa, carragenina, pectina, goma, glicosaminoglicanos	[26]
	Polipéptidos	Colágena, gelatina, fibrina, enzimas	[26]
Sintéticos	Poliésteres	Policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA)	[27]
	Poliuretanos	Diisocianatos derivados de aminoácidos y diisocianato 4, 4'-metilendifenil	[27]

Actualmente, los polímeros naturales y sintéticos se combinan para obtener biomateriales con características deseadas de ambos polímeros. Uno de los polímeros naturales más utilizados en la ingeniería de tejidos para la elaboración de apósitos es el alginato de sodio.

7.1 Alginato de sodio (AS)

El AS es la sal del ácido algínico [28], es un polímero aniónico, compuesto de copolímeros lineales (Figura 6) que contienen bloques de β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G).

El contenido de M y G depende de la fuente de la cual se extrae el AS, pudiéndose obtener de dos maneras:

- a) Típicamente extraído de las algas pardas (*Phaeophyceae*), incluyendo: *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japónica*, *Ascophyllum nodosum*, y *Macrocystis pyrifera* [28].
- b) Mediante biosíntesis bacteriana, en donde se utiliza *Azotobacter vinelandii* o *Pseudomonas aeruginosa* [29].

En la Figura 6 se observa la estructura del AS, que está distribuido en bloques sucesivos de residuos G (GGGGGG), seguidos de residuos M (MMMMM); y residuos G y M (GMGMGMGMG) alternados [30].

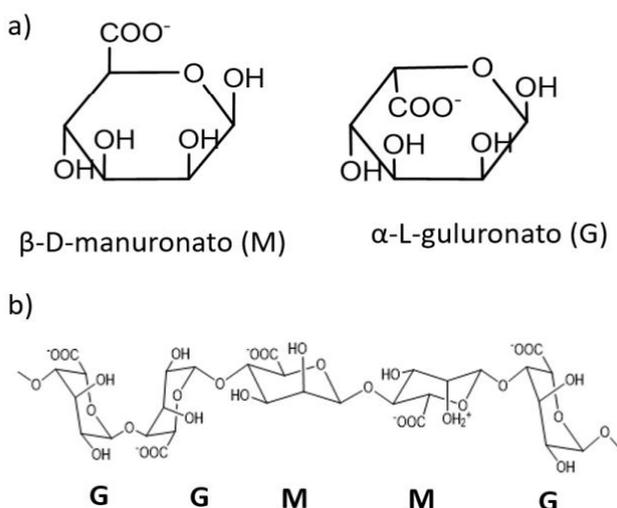


Figura 6. Estructura del alginato de sodio a) monosacáridos del AS, (1,4)- β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G), b) bloques G y M, unidos mediante enlaces O-glucosídicos.

Así mismo, al alinearse dos cadenas del bloque G, se forman sitios de coordinación (Figura 7). Estas cadenas presentan forma de bucles, permitiendo formar cavidades entre ellas con el tamaño adecuado para que agentes iónicos, como Ca^{2+} se coloquen en ese espacio. La carga negativa de los grupos carboxilos del bloque G interactúan con la carga positiva de Ca^{2+} , lo que produce la formación de la estructura conocida como “caja de huevo” [31].

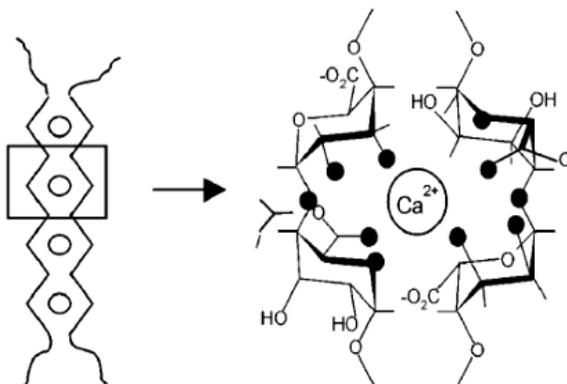


Figura 7. Bloques G al formar la estructura de “caja de huevo” mediante interacciones iónicas con Ca^{2+} .

7.1.1 Características fisicoquímicas

Tabla 5. Propiedades físicas y químicas del AS.

Propiedad	Parámetro	Referencia
Aspecto físico	Polvo	
Color	Crema	[32]
Viscosidad (1 % p/v, RV a 20 rpm, 25 °C)	581 cPs	
pH (1 % p/v)	7.2	
Solubilidad	Agua	
Incompatibilidades	Derivados de acridina, violeta cristal, acetato y nitrato de fenilmercurio, metales pesados	[28]

Algunas características fisicoquímicas del AS se muestran en la Tabla 5. La viscosidad de las disoluciones de AS depende de la longitud de las cadenas del polímero, lo que a su vez, depende de la fuente de extracción. La viscosidad aumenta al disminuir el pH y alcanza un valor máximo aproximadamente en 3.5. Esto es debido a que los grupos carboxílicos de los monómeros se protonan, favoreciendo la formación de enlaces de los bloques G [31]. En contraste, la viscosidad disminuye a un pH mayor a 10 [28].

Las características de flexibilidad o rigidez dependen de la cantidad de bloques G y M, la distribución de los monómeros de la cadena polimérica, la carga y el volumen de los grupos carboxílicos. Si hay mayor cantidad de bloques G, el gel será duro y frágil; mientras que el gel será suave y elástico al aumentar la proporción de bloques M. Los bloques de secuencias MM y MG, se encuentran unidos mediante enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$ y los bloques GG y GM, unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$ [31].

El AS es utilizado en formulaciones tópicas como agente viscosante, dispersante y estabilizante [28]. Además, es empleado en la liberación controlada de fármacos de bajo peso molecular [26]. En ingeniería de tejidos es de gran importancia, por ser un material biocompatible, presentar baja toxicidad, ser de bajo costo y gelificar al adicionar cationes divalentes como Ca^{2+} . Los apósitos de alginato se han utilizado por ser un material hemostático, adhesivo, promover la proliferación celular y absorber el exudado de la herida para volver a gelificar [33].

Algunos ejemplos de membranas hechas de alginato son Algicell™ (Derma Sciences), AlgiSite M™ (Smith & Nephew), Comfeel Plus™ (Coloplast), Kaltostat™ (ConvaTec), Sorbsan™ (UDL Laboratories) y Tegaderm™ (3M® Salud), las cuales se encuentran disponibles en el mercado.

Sin embargo, para aplicaciones de andamiaje tisular, los materiales de alginato puro tienen una pobre integridad estructural, propiedades de manejo

y estabilidad inadecuadas. Para superar estos inconvenientes, se mezcla con uno o más plastificantes, lo que reduce las fuerzas de atracción intermolecular entre las cadenas de polímeros, pudiendo aumentar el manejo y la estabilidad de los materiales basados en alginato [34].

Además, para elaborar las membranas de alginato, generalmente se combina con otros polímeros sintéticos para proporcionarle una estructura más resistente. Algunos de ellos son la polivinilpirrolidona y el alcohol polivinílico.

7.2 Polivinilpirrolidona (PVP)

La PVP K30 (Figura 8) tiene amplio uso farmacéutico debido a las múltiples funciones que posee, puede ser utilizada como aglutinante en la granulación húmeda, como solubilizante en formulaciones orales y parenterales, además de favorecer la solubilidad de algunos fármacos también favorece la dispersión de formulaciones líquidas, además posee propiedades humectantes y es capaz de formar películas.

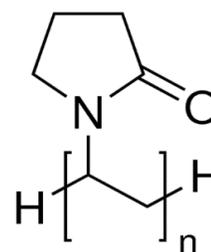


Figura 8.
Estructura química de la PVP.

La PVP K30 también es utilizada para aumentar la viscosidad de soluciones y suspensiones tópicas y orales. La PVP K30, es un polímero que consiste de monómeros lineales de 1-vinil-2-pirrolidona. Esta poliamida es clasificada de acuerdo a su viscosidad según su valor de K de prensa (valor K de Fikentscher): K-15, K-30, K-60, K-90, con un peso molecular promedio de 8,000, 50,000, 400,000, y 1,000,000, respectivamente. Este valor es importante porque determina qué propiedades tendrá [28]. Algunas propiedades físicas y químicas de PVP K30 se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Propiedades físicas y químicas de PVP K30.

Propiedad	Parámetro	Referencia
Aspecto físico	Polvo	
Color	Blanco	
Fórmula Molecular	$(C_6H_9NO)_n$	[28]
Peso molecular	50,000	
Temperatura de fusión	~150 °C	
Densidad	1.18 g/cm ³	
Viscosidad (Soluciones al 10 % a 20 °C)	5.5-8.5 mPa·S	[35]
Solubilidad	Agua (100 mg/mL), etanol, amina, nitro-parafina, cloroformo y ácidos grasos de bajo peso molecular, sales inorgánicas y resinas	[28]
Incompatibilidades	Sulfatiazol, ácido salicílico, sodio salicilato, fenobarbital, taninos, timerosal.	

La PVP K30 es fisiológicamente inerte, tiene una toxicidad oral aguda de LD50 > 100 g/kg en rata. No irrita ojos ni piel, posee un pH 3.0-5.0 y no causa reacciones alérgicas.

7.2.1 Reactividad

En su estado de polvo seco no reacciona químicamente, es estable térmicamente, sin embargo, es higroscópica, absorbiendo hasta un 40 % de su peso en agua [36].

7.3 Alcohol polivinílico (PVA)

Debido a sus propiedades químicas y físicas, así como a su bajo costo, el PVA se utiliza en aplicaciones médicas, alimentarias e industriales (Figura 9). En medicina es usado para la síntesis de hidrogeles, hilos quirúrgicos, órganos artificiales, preparación de membranas, dispositivos de administración de fármacos como parches transdérmicos y apósitos para heridas [38,39].

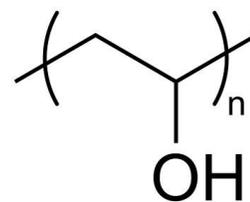


Figura 9. Estructura química del PVA.

El PVA tiene gran uso en el área farmacéutica debido a su biocompatibilidad, naturaleza no tóxica, pH, resistencia y estabilidad térmica [39]; es por ello, que su uso como biomaterial para la síntesis de hidrogeles ha ganado importancia [40]. En la Tabla 7 se muestran algunas propiedades físicas y químicas del PVA.

Tabla 7. Propiedades físicas y químicas del PVA

Propiedad	Parámetro	Referencia
Aspecto físico	Granulado	
Color	Incoloro	
Fórmula Molecular	$(C_4H_6O_2)_n$	
Peso molecular (Depende de la longitud de la cadena)	20,000-200,000 g/mol	[28]
Temperatura de fusión (muestra hidrolizada)	228 °C	
Densidad relativa	1.19 g/cm ³	
Viscosidad (4 % en agua a 20 °C)	3.5-4.5 mPa·s	[41]
Solubilidad	Soluble en agua. Depende del grado de polimerización y del porcentaje de hidrólisis, es mayor entre menor peso molecular,	[28] [42]

	insoluble en disolventes orgánicos	
Incompatibilidades	En alta concentración con sales inorgánicas como fosfatos y sulfatos. Puede gelificarse una solución de PVA en presencia de bórax	[28]

El PVA es un polímero de origen sintético, de carácter hidrofílico. Tiene lugar tras la hidrólisis del acetato de polivinilo pues no es viable polimerizar unidades de alcohol vinílico debido a la pureza del mismo (Figura 10). Cuando el acetato de polivinilo se hidroliza, el grupo éster es intercambiado por un grupo OH del metanol en presencia de hidróxido de sodio acuoso [44,38].

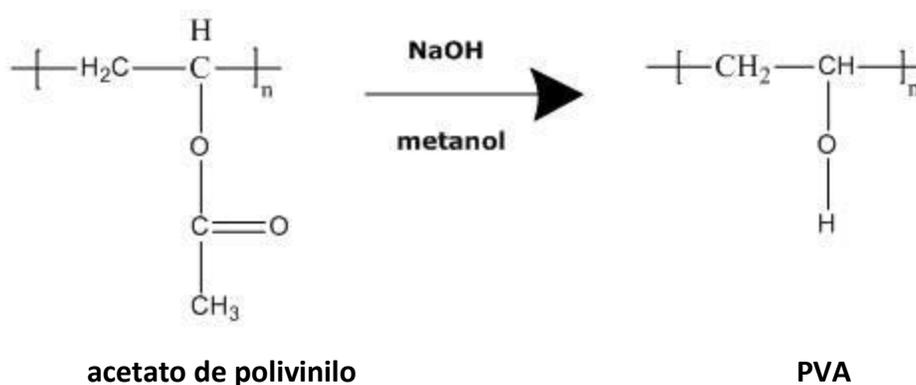


Figura 10. Reacción para la síntesis del PVA.

7.3.1 Características fisicoquímicas

Debido a sus grupos hidroxilo, el PVA puede formar puentes de hidrógeno, lo cual le brinda hidrofiliidad. Es usado con frecuencia en la fabricación de membranas comerciales por su buena, estabilidad térmica, química y mecánica; también posee propiedades emulsionantes y adhesivas que le permiten formar películas, además de ser biocompatible con tejidos [46,47].

Muchas propiedades físicas del PVA dependen de su masa molecular. La longitud del acetato de vinilo a hidrolizar, el grado y las condiciones de

hidrólisis, ya sean ácidas o alcalinas afectarán los productos de PVA y se obtendrán diferentes pesos moleculares (20,000–400,000), solubilidad, flexibilidad, adhesividad y resistencia a la tracción. El PVA se puede clasificar como parcialmente hidrolizado (87-89 %) y totalmente hidrolizado (>98 %) [40,44].

La solubilidad en agua depende del grado de polimerización y el porcentaje de hidrólisis, así como de la temperatura. Los grupos OH a través de puentes de hidrógeno interactúan intra e intermolecularmente reduciendo la solubilidad en agua del PVA [43].

El PVA al ser hidrofílico retiene el agua, entre mayor sea su porcentaje en peso dentro de una formulación, el hinchamiento de la misma se verá aumentado [39]. Algunas otras características del PVA son baja resistencia a la ruptura, baja temperatura de descomposición y alta temperatura de transición vítrea [38].

El PVA no es considerado un material peligroso, se ha reportado que su toxicidad oral aguda es baja 15-20 g/kg, además de ser completamente biodegradable [38].

Debido a que la mayoría de los polímeros no les proporcionan buenas propiedades mecánicas a las membranas o películas, es recomendable mezclarlos con plastificantes, los cuales mejoran considerablemente esta característica.

8. Plastificantes

Los plastificantes son sustancias que al agregarse a un material plástico mejoran sus propiedades, ya que aumentan la flexibilidad en las cadenas poliméricas; así como la elasticidad, resistencia a la tracción y al impacto. También disminuye la viscosidad de las soluciones de polímero; lo cual afecta

su reactividad química, disminuye la temperatura de fusión, gelificación y de transición vítrea del polímero, así como la tensión de deformación.

Los plastificantes en general son líquidos de alto punto de ebullición y tienen bajo tamaño molecular, por lo que pueden intercalarse entre las cadenas de los polímeros cambiando su organización tridimensional. Al intercalarse provocan una disminución en sus fuerzas intermoleculares y en las interacciones polímero-polímero. Es importante que el plastificante sea compatible con el polímero para que el material final sea efectivo, para lo cual es importante tomar en cuenta la polaridad y solubilidad, así como la solvatación, pues si la solubilidad del plastificante es cercana a la del polímero será necesaria menos energía para solvatarlo [45].

Algunos plastificantes utilizados en ingeniería de tejidos, debido a que son biocompatibles y no tóxicos, se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Plastificantes usados en ingeniería de tejidos

Plastificante	Cantidad usada (%)	Referencia
Polietilenglicol (PEG)	40	[34]
Glicerina	1-40	[46]
Poli(L-ácido láctico) (PLLA-3-Arm)	10-30	[47]
Sorbitol	1-8	[48]

Por su parte, la glicerina es una sustancia que tiene un amplio uso como plastificante. Se ha reportado su uso junto con el alginato para mejorar las propiedades mecánicas en la formación de películas, pues tiene un alto impacto en el grosor de la película resultante, además de que brinda propiedades de elongación y resistencia a la tracción que dependen del porcentaje que se tenga en la formulación. Otras características que presenta son: es transparente, es miscible en agua y ayuda a incrementar la viscosidad de la solución [49].

8.1 Glicerina

La glicerina o glicerol (Figura 11) tiene amplio uso en el área farmacéutica como excipiente en formulaciones tópicas, óticas y oftálmicas. Puede funcionar como disolvente y cosolvente en soluciones orales, preparaciones parenterales y

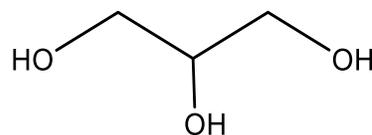


Figura 11. Estructura química de la glicerina

emulsiones. Puede utilizarse también como edulcorante, antimicrobiano (<20 %) y como viscosante, además es muy usada en productos cosméticos debido a sus propiedades emolientes y humectantes. Algunas propiedades físicas y químicas de la glicerina se muestran en la Tabla 9. Como plastificante suele adicionarse en la elaboración de cápsulas blandas y recubrimientos de película, pues proporciona mayor elasticidad a los materiales [28].

Tabla 9. Propiedades físicas y químicas de la glicerina

Propiedad	Parámetro	Referencia
Aspecto físico	Líquido	
Color	Incoloro	[36]
Fórmula Molecular	C ₃ H ₈ O ₃	[28]
Peso molecular	92.09 g/mol	[36]
Temperatura de fusión	17.8 °C	
Temperatura de ebullición	290 °C	
Densidad	1.2636 g/cm ³	[28]
Viscosidad (5-50 % p/p a 20 °C)	1.143 a 6.05 mPa·S	
Incompatibilidades	Agentes oxidantes fuertes	

La glicerina es un hidrocarburo y también es clasificada como un alcohol alifático acíclico, ya que tiene un grupo hidroxilo en cada uno de sus carbonos. Es un material higroscópico pues se une fácilmente a las moléculas de agua, lo que la hace muy soluble [29,50,51].

8.1.1 Toxicidad

La glicerina se encuentra en grasas vegetales y animales, así como en aceites que son parte de la dieta normal, por lo que no es considerada un material tóxico [28].

8.2 Propilenglicol

El propilenglicol es un excipiente líquido incoloro utilizado como disolvente, cosolvente, humectante, agente estabilizante y conservador en una gran variedad de formulaciones farmacéuticas parenterales y no parenterales [28].

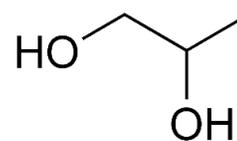


Figura 12. Estructura química del propilenglicol.

Es un compuesto orgánico, cuya estructura presenta dos grupos OH (diol) (Figura 12). Algunas propiedades físicas y químicas del propilenglicol se muestran en la Tabla 10. Industrialmente, se obtiene mediante la hidrólisis del óxido de propileno [28].

Tabla 10. Propiedades físicas y químicas del propilenglicol

Propiedad	Parámetro	Referencia
Aspecto físico	Líquido	
Color	Incoloro	
Fórmula molecular	C ₃ H ₈ O ₂	
Peso molecular	76.1 g/mol	
Temperatura de ebullición	188 °C	[28]
Densidad	1.038 g/mL (20 °C)	
Viscosidad	58.1 cP (20 °C)	
Miscibilidad	Agua, acetona, etanol (95 %), glicerina	
Incompatibilidades	Agentes oxidantes	

Además, presenta bajo peso molecular, lo que le permite formar enlaces tipo puente de hidrógeno con otras moléculas, con el objetivo de mejorar la

estructura de las películas plásticas, además de conferir mejores propiedades mecánicas.

Por otra parte, se puede incorporar en la formulación de una membrana o película algún fármaco, el cual puede ser algún producto de origen natural. Sin embargo, algunos productos de origen natural son lábiles, por lo que requieren un medio que los proteja tanto de las condiciones climatológicas como de los procesos que sufren en el cuerpo antes de llegar al sitio de acción.

9. Productos naturales con potencial uso en la cicatrización de heridas

El proceso de cicatrización de la herida es una secuencia de fenómenos bioquímicos y celulares para restaurar la integridad de la piel y el tejido subcutáneo. Existen varios extractos de plantas que son conocidos como alternativa prometedora para la curación de heridas debido a la presencia de diversos componentes activos como: flavonoides, aceites esenciales, alcaloides, compuestos fenólicos, terpenoides, ácidos grasos.

Diferentes dianas farmacológicas están involucradas en los efectos de curación de heridas, incluida la supresión de la producción de citoquinas inflamatorias y cascadas de transducción inflamatorias, reduciendo los factores oxidativos, mejorando las enzimas antioxidantes, y promoviendo la síntesis de colágena, así como la neovascularización y las vías angiogénicas mediante el aumento de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos y factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Entre los compuestos naturales más conocidos por sus propiedades cicatrizantes se encuentran: Emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilntraquinona), extracto encontrado en plantas como *Polygonum* y *Aloe vera*; curcumina, un polifenol obtenido de *Curcuma longa* Linn [52]; *Copaifera paupera* oleo [53]; quitosano, derivado de la quitina de exoesqueletos de artrópodos como el

camarón, cangrejo e insectos; la sericina, proteína extraída de los capullos de seda de *Bombyx mori* [54]; extracto de *Stichopus hermanni* mejor conocido como pepino de mar [55], extracto de la corteza de Palo Mulato (*Bursera morelensis*); aceite esencial de las hojas de *Eugenia dysenterica*, fruta originaria de Brasil [56].

9.1 Palo mulato (PM)

El Palo mulato (*Bursera morelensis*) es un árbol endémico de México. Comúnmente se utiliza su corteza para elaborar infusiones para el tratamiento de heridas e infecciones en la piel (Figura 13).

La familia *Burseraceae* ha demostrado tener actividad antiinflamatoria, antibacteriana y citotóxica. Además, se ha obtenido el perfil químico del género *Bursera*, que incluye aceites esenciales, triterpenos, esteroides, bilignanos, lignanos y flavonoides [57].

9.1.1 Actividad antibacteriana

El aceite esencial de *B. morelensis* presenta actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *V. cholerae*, *S. pneumoniae* y *E. coli*. Debido a su naturaleza lipofílica,

el aceite pasa a través de la membrana citoplasmática y pared celular de las bacterias, desestabilizando su estructura; además, daña los lípidos y proteínas [58].



Figura 13. Palo mulato

9.1.2 Actividad antiinflamatoria

El aceite esencial de *B. morelensis* es capaz de producir efecto antiinflamatorio al ser aplicado tópicamente, este efecto es similar al producido por dexametasona administrada subcutáneamente. La actividad antiinflamatoria podría ser relacionada a su contenido de α -pineno, *p*-cimeno, β -pineno, germacreno D y óxido cariofileno [59].

9.1.3 Actividad antioxidante y efecto analgésico

Se han realizado estudios con el extracto metanólico de la corteza de *B. morelensis*, en donde se ha observado que presenta capacidad antioxidante al eliminar los radicales DPPH. Además, la CE₅₀ fue de 3.05 μ g/mL y no mostró diferencias significativas con la quercetina, la cual es un antioxidante (EC₅₀ = 4.45 μ g/mL) [57].

9.2 **Curcumina**

La curcumina (Figura 14) es un producto natural que se encuentra en los tallos subterráneos de la Cúrcuma (*Curcuma longa* L.), la cual proviene del sur y sudeste de Asia [60].

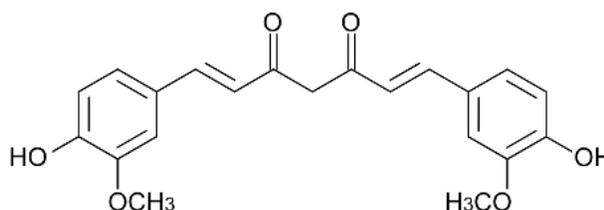


Figura 14. Estructura química de la curcumina.

Ha sido empleada en modelos animales observándose su efecto promotor de la cicatrización en heridas de la piel, proceso que se observa acelerado debido a que la reepitelización ocurre tempranamente, pues ayuda a aumentar la síntesis de colágena, la cual es requerida para regular el nivel de TGF- β 1, aumentar el tejido de granulación y los vasos sanguíneos, así como la neovascularización; también mejora la migración y proliferación de fibroblastos además de proteger a las células del estrés oxidante [61].

Se ha demostrado que la curcumina aplicada tópicamente en una herida de la piel disminuye el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Por otro lado, disminuye la producción de ROS y aumenta la proliferación celular para acelerar la cicatrización de heridas. Su aplicación en la piel herida mostró niveles elevados de citoquinas antiinflamatorias que incluyen interleucina-10 (IL-10) y enzimas antioxidantes, es decir, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) [62].

9.2.1 Propiedades físicas y químicas

La curcumina 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, en su esqueleto hidroxicarbonado contiene dos cetonas y varios grupos funcionales que le brindan muchas de sus propiedades [63]. Algunas propiedades físicas y químicas de la curcumina se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Propiedades físicas y químicas de la curcumina

Propiedad	Parámetro	Referencia
Aspecto físico	Polvo formado por finas agujas	
Color	Amarillo, ligeramente fluorescente	
Fórmula Molecular	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	
Peso molecular	368.385 g/mol	[63]
Temperatura de fusión	183 °C	
Densidad	1.28 g/cm ³	
Solubilidad	Poco soluble en agua	
Incompatibilidades	Fotosensible, se degrada por peroxidación	

9.2.2 Solubilidad y tautomería ceto-enólica

Es una molécula anfipática siendo parcialmente soluble en agua y en disolventes orgánicos, sin embargo, su parte hidrófila se encuentra al centro de la molécula (puente diacetónico α,β -insaturado). La curcumina posee tautomería ceto-enólica, tanto en disoluciones polares como no polares (Figura 15). En medios no polares, se encuentra como un tautómero cis-enol

de conformación cerrada, mientras que en medios polares adopta una conformación abierta, y es así como se encuentra en el medio fisiológico, por lo que es capaz de interactuar con grupos polares [63].

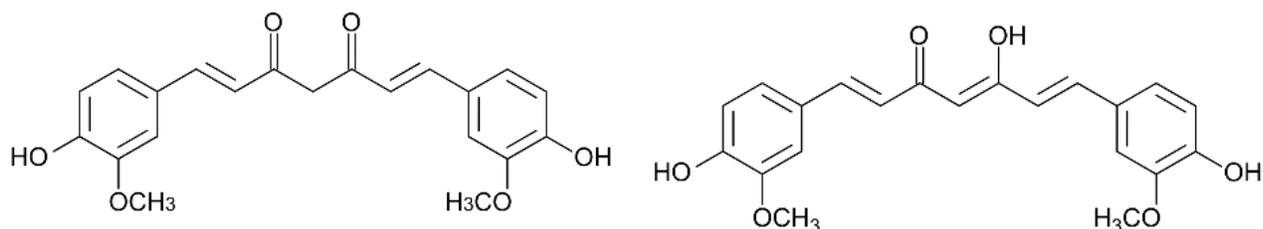


Figura 15. Tautomería ceto-enólica de la curcumina [64]

9.2.3 Efecto del pH

La curcumina es estable a pH ácido pero inestable a pH alcalino y neutro, esto se debe a que en medio ácido mantiene la estructura de dieno conjugado pero en medio alcalino o neutro el OH del fenol se desprotona [63].

9.2.4 Aplicaciones terapéuticas

Como se ha mencionado, al tener la curcumina varios grupos funcionales, posee diversas dianas moleculares, con múltiples actividades farmacológicas. Entre las que destacan su actividad contra muchos tipos de cáncer, como cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas; su actividad antiinflamatoria es útil en enfermedades como pancreatitis, artritis, gastritis y colitis; también tiene actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral. Además, tiene actividad contra algunas enfermedades autoinmunes incluidas esclerodermia, psoriasis, esclerosis múltiple y diabetes. La curcumina exhibe actividad antioxidante, propiedad a la que se atribuyen sus características terapéuticas, entre ellas problemas de la piel como eczema, dermatitis, pigmentación, acné, lesiones debidas a psoriasis y las enfermedades exfoliativas (Figura 16) [64,65].

9.2.5 Actividad antioxidante

La peroxidación mediada por radicales libres de los lípidos de membrana y el daño oxidativo del ADN y las proteínas están asociados con una variedad de complicaciones patológicas crónicas. Enfermedades como el cáncer, la aterosclerosis y las enfermedades neurodegenerativas se encuentran asociadas al daño del ADN y de las membranas celulares debido a la peroxidación por radicales libres generados por proteínas y lípidos de membrana, que reaccionan en cadena.

La función de la curcumina se atribuye a la eliminación de los radicales libres involucrados. Esto lo logra gracias a grupos funcionales como el β -diceto, doble carbono-carbono y anillos de fenilo que contienen sustituyentes hidroxilo y metoxi que tienen capacidad antioxidante.

9.2.6 Actividad antiinflamatoria

La curcumina actúa como antiinflamatorio porque es capaz de suprimir la activación del factor de transcripción NF- β , el cual regula la expresión de productos proinflamatorios. Además, inhibe enzimas como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la lipoxigenasa (LOX) y óxido nítrico sintasa inducible (NOSi).

La COX-2, LOX y NOSi se encargan de mediar procesos inflamatorios. La incorrecta regulación de COX-2 y/o NOSi ha sido asociada con ciertos tipos de cáncer humano y trastornos inflamatorios, pues la aparición de tumores tiene gran influencia al haber procesos inflamatorios [66].

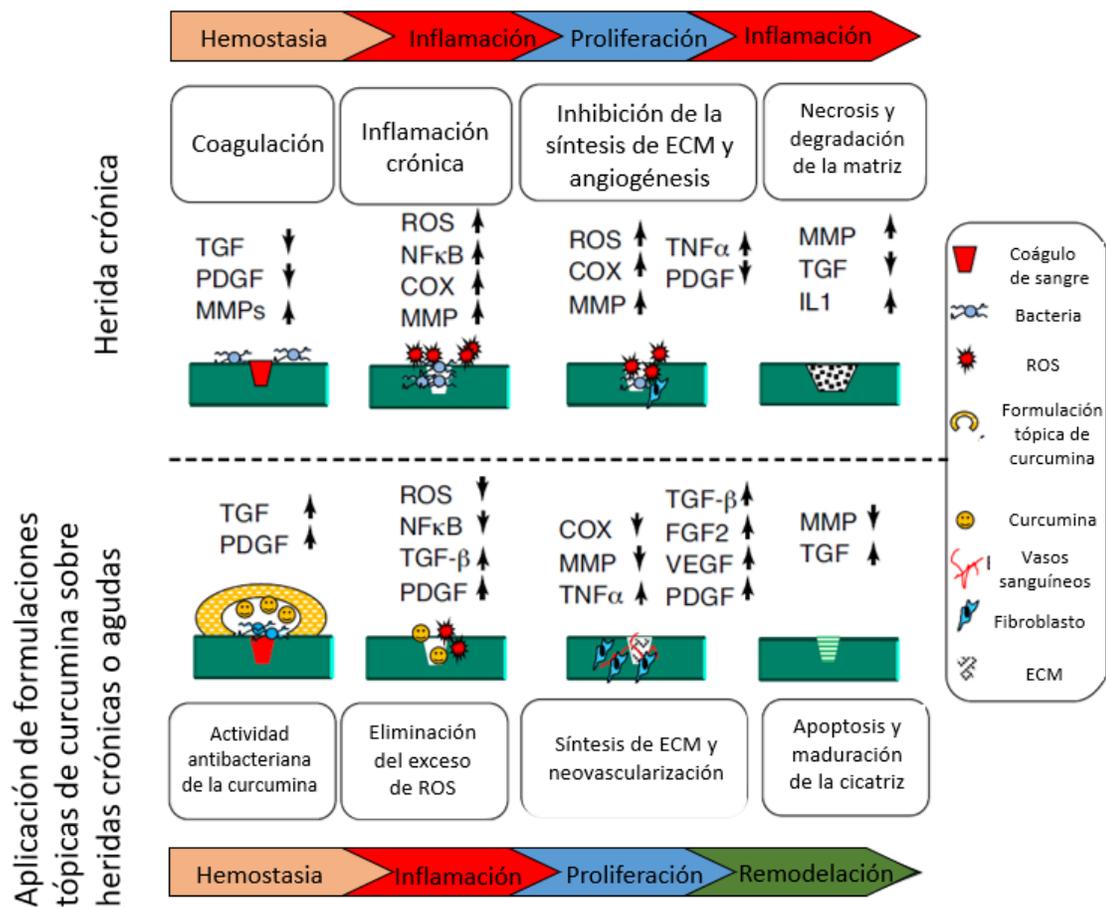


Figura 16. Mecanismo de la actividad cicatrizante de la curcumina. Modificado de [64].

9.2.7 Degradación

La curcumina tiene grupos cromóforos y es fotosensible. La principal forma en la que se degrada es a través de especies reactivas de oxígeno (ROS). También puede degradarse mediante ataques de NO y radicales dinitrógeno.

La curcumina es estable a temperaturas bajas y moderadas (<80-100 °C), pero susceptible a altas temperaturas generando su descomposición.

Algunos de sus compuestos de degradación son trans-6-(40-hidroxi-30-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexanal, ácido ferúlico, feruloilmetano y vainillina [63].

Si la curcumina se aplicara por sí sola sobre la piel, se degradaría debido a su fotosensibilidad, además tendría que afrontar el proceso de queratinización para poder permanecer en la piel. Por esta razón se requiere de un sistema que la proteja y le permita ejercer su efecto terapéutico de manera prolongada [62].

La formulación de curcumina en nanopartículas ofrece múltiples ventajas que le permitirán ejercer su efecto con mayor efectividad. Además de protegerla de agentes externos, puede mejorar su solubilidad acuosa y promover una liberación prolongada [62].

10. Nanopartículas

En los últimos años, el desarrollo de la nanotecnología ha aumentado, dando lugar a nuevos sistemas utilizados para la liberación de fármacos, así como en la ingeniería de tejidos [67].

Las nanopartículas (Nps) son pequeñas partículas cuyo tamaño varía de 1 a 1000 nm [68]. Son sistemas coloidales, que pueden ser clasificados basados en sus propiedades, formas o tamaños. Los diferentes grupos incluyen nanopartículas de metal, cerámica y poliméricas. Las nanopartículas poliméricas generalmente presentan forma de nanoesferas o nanocápsulas. En donde, las nanoesferas tienen el agente activo disperso en una matriz polimérica homogénea, mientras que en las nanocápsulas el fármaco se encuentra dentro de una cubierta polimérica (Figura 17), ambos sistemas controlan la liberación del fármaco dependiendo de su naturaleza [67].

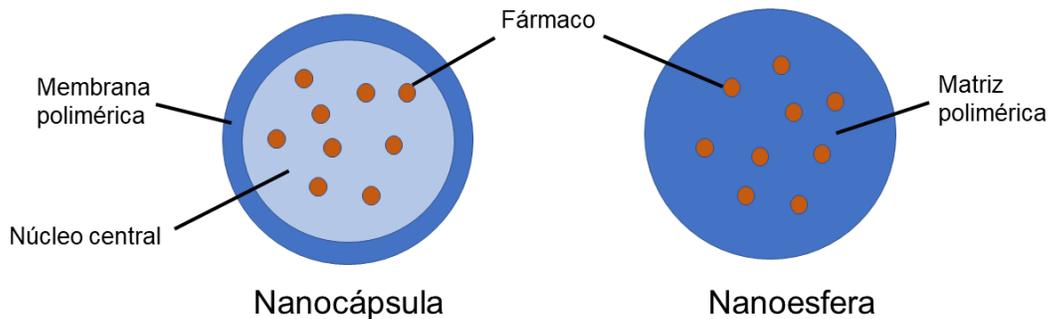


Figura 17. Representación esquemática de las estructuras de nanopartículas poliméricas: nanocápsulas y nanoesferas. Modificado de [69]

Su tamaño nanométrico les permite tener ventajas en la liberación de un fármaco; ya que presentan una mayor área superficial, facilitando la liberación por erosión y por difusión, la permeación a través de barreras fisiológicas, interacción de membranas celulares y el efecto terapéutico [70].

Para la síntesis de Nps se utilizan diferentes métodos como: emulsión-evaporación, doble o múltiple emulsión, emulsificación-difusión, nanoprecipitación [67].

El método de emulsificación-difusión es una de las técnicas que presenta grandes ventajas como: un mayor porcentaje de eficiencia de encapsulación (>70 %), tamaño de distribución reducido, alta reproducibilidad de lote a lote y facilidad en su elaboración con procesos sencillos [68].

El método de emulsificación-difusión (Figura 18) consiste en disolver el polímero en un disolvente orgánico, el cual debe estar previamente saturado con agua para asegurar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos. Ya que para producir la precipitación del polímero y en consecuencia la formación de Nps, cuando el disolvente orgánico es parcialmente miscible con agua o con otro disolvente orgánico es necesario promover la difusión del disolvente de la fase dispersa por la dilución en exceso de agua. Inmediatamente después,

se realiza una emulsión con el polímero disuelto en la fase orgánica saturada y la fase acuosa con el estabilizante disuelto en ella; permitiendo la difusión del disolvente a la fase externa y la formación de nanoesferas o nanocápsulas. Por último, el disolvente se elimina mediante evaporación o filtración, dependiendo de su punto de ebullición [68].

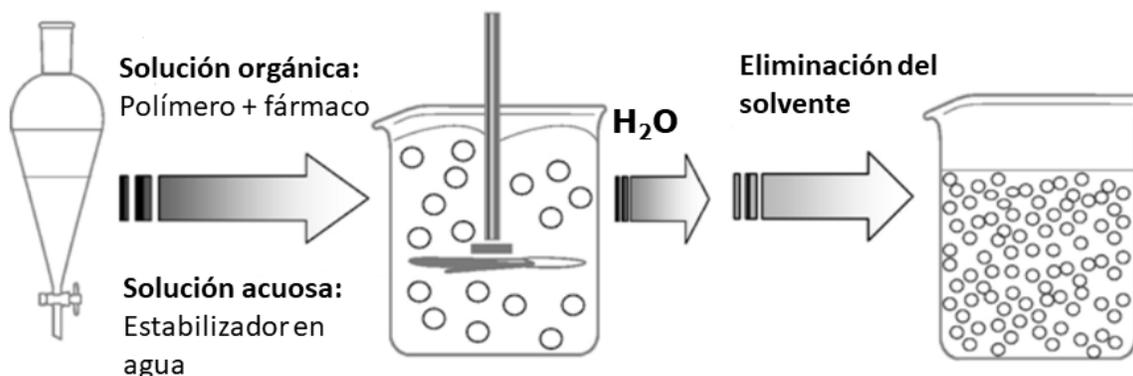


Figura 18. Esquema de la técnica de emulsificación-difusión. Modificado de [68]

Para que las nanopartículas permanezcan dispersas en el medio se utilizan estabilizantes, como moléculas anfifílicas o agentes protectores de coloides. Algunos ejemplos son PVA y poloxámeros. Los poloxámeros se adsorben en la superficie de las nanopartículas y mediante repulsión estérica le confieren estabilidad a las Nps [71].

10.1 Nanopartículas con curcumina

Ofrecer un medicamento con curcumina que permita alta eficacia en el tratamiento de heridas para promover su cierre, ha sido un reto debido a su baja solubilidad acuosa, degradación fotoquímica, rápida degradación en solución acuosa y rápido metabolismo [74,75,76].

Una tecnología reciente para transportar y distribuir fármacos en el organismo es el uso de nanotransportadores, siendo de gran relevancia aquellos capaces de conducir fármacos de carácter lipofílico hasta su sitio de acción. Las nanopartículas poliméricas son capaces de aumentar la solubilidad acuosa y

la biodisponibilidad de estas moléculas, pues al encapsularlas, las protegen de la degradación, además de promover la llegada del fármaco a su sitio de acción y controlar la liberación [74,75,76].

Por tanto, la encapsulación de curcumina en nanopartículas busca mejorar su estabilidad fotoquímica, una liberación prolongada, mejorar la solubilidad en agua y evitar su oxidación [76].

Debido a la naturaleza poco soluble de la curcumina en agua, para la síntesis de nanopartículas, ésta puede ser disuelta en una fase orgánica, en donde para lograr la incorporación dentro de un medio acuoso se crea una emulsión, la cual puede ser estabilizada con ayuda de polímeros compuestos de tres bloques, una estructura hidrofóbica central y dos estructuras hidrofílicas en los extremos, también conocidos como poloxámeros.

10.1.1 Poloxámero 188

Los poloxámeros, también conocidos como Pluronic[®], son copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de propileno) (PPO), que tienen un carácter anfifílico y propiedades de asociación y adsorción. Los bloques se encuentran en el orden (PEO-PPO-PEO) en el que PPO es el segmento hidrofóbico y contribuye con el 30 % del copolímero de bloque, mientras que PEO es un segmento hidrofílico que aporta el 70 % del copolímero de bloque. Los poloxámeros se utilizan para solubilizar o estabilizar compuestos, además presentan baja toxicidad [77].

El comportamiento de la fase (micelas, hidrogeles, cristales líquidos liotrópicos, etc.) de los poloxámeros los hace susceptibles a múltiples tipos de procesamiento y diversas formas de productos. Los parámetros importantes, como la velocidad de liberación del fármaco y la estabilidad de la formulación están directamente relacionados con las propiedades asociativas y de adsorción del poloxámero [77].

El proceso de micelización del poloxámero comienza cuando la concentración de copolímero de bloque PEO-PPO en disolución alcanza una cierta concentración micelar crítica (cmc) a una temperatura fija. Además, al aumentar la temperatura de micelización crítica (cmt) a una concentración de copolímero de bloque fijo también induce la micelización. El efecto de la temperatura surge de la solubilidad reducida del PEO, y especialmente del PPO, al calentar en agua. Esta característica termosensible del autoensamblaje de poloxámero se ha usado con un efecto significativo en la administración de fármacos [77].

La parte PPO hidrófoba de la molécula facilita el anclaje del modificador de superficie a la PCL, mientras que las cadenas PEO forman una capa externa capaz de estabilizar las Nps debido a un mecanismo estérico [75].

El Poloxámero 188 es un surfactante no iónico frecuentemente usado en la industria farmacéutica debido a su compatibilidad con los fármacos y excipientes. Se incorpora a las Nps como estabilizante, ya que es adsorbido en la superficie de las nanopartículas impidiendo que éstas se acerquen entre sí cuando interactúan las cadenas de PEO, las cuales se "aplastan", lo que provoca también la pérdida de grados de libertad del polímero, la rotación en los enlaces se ve impedida y la entropía disminuye [62,80].

Además se ha utilizado en el tratamiento de heridas, en un estudio hecho con más de 1000 pacientes con lesiones dérmicas se demostró que la aplicación del Poloxámero 188 en heridas no causa reacciones adversas, además de prevenir posibles infecciones [79].

Existen diferentes métodos utilizados en la caracterización de nanopartículas, en donde se evalúa su estructura, tamaño y estabilidad.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar y evaluar membranas de alginato con productos naturales que tengan potencial aplicación en heridas agudas y crónicas de la piel.

Objetivos particulares

- Sintetizar nanopartículas de PCL cargadas con curcumina (CNp) y caracterizarlas fisicoquímicamente.
- Elaborar membranas de alginato con diferentes polímeros (PVP o PVA), plastificantes (propilenglicol y glicerina) y extracto acuoso de palo mulato o nanopartículas de PCL cargadas con curcumina.
- Realizar las siguientes pruebas para elegir una formulación de membrana:
 - Hinchamiento
 - Determinación de pH
 - Ensayo mecánico
 - Evaluación sensorial
- Evaluar el grosor, transparencia, número y tamaño de poro de la membrana elegida.
- Evaluar la liberación de curcumina *in vitro*, desde la membrana con CNp y compararla con la liberación de curcumina desde una dispersión de nanopartículas de PCL.
- Evaluar el paso de curcumina a través de la piel mediante pruebas *in vivo* para determinar la permeación de curcumina en el estrato córneo y *ex vivo*, para determinar la permeación de curcumina a través de las diferentes capas de la piel.

V. HIPÓTESIS

Al formar una red polimérica entre el alginato de sodio, polímeros sintéticos y plastificantes, se obtendrán membranas con buenas propiedades mecánicas, de hinchamiento, de adhesión y transparencia. Las nanopartículas de PCL permitirán la incorporación de curcumina a la formulación y mejorarán su permeación en las diferentes capas de la piel.

VI. METODOLOGÍA Y PARTE EXPERIMENTAL

11. Lista de equipos, materiales y reactivos empleados

11.1 Equipos

Balanza analítica (Solinteli)

Estufa de laboratorio (OAKTON StableTemp, Illinois, EUA)

Centrifugadora (BIOBASE, BKC-TH18II, Shandong, China)

Rotavapor (Heidolph® Hei-VAP Value, Schwabach, Alemania)

Parrilla de agitación (IKA C MAG HS7, Staufen, Alemania)

Microscopio óptico (BioBlue, euromex, Arnhem, Países Bajos)

Cámara para microscopio óptico (Am Scope 3.7 Digital Camera, EUA)

Espectrofotómetro (DLAB SP-UV 1000, Beijing, China)

Multiparrilla (DLAB MS-M-S16, CA, EUA)

Ultra turrax (IKA modelo T18 digital, Staufen, Alemania)

Equipo de pruebas mecánicas (Sintech 1/2, MTS, EUA)

Micropipetas (Dragon Lab Top Pette Pipettor)

Zetasizer (Malvern Instrument ZS90; Malvern, Reino Unido)

Microscopio de Fuerza de Atómica (Scanning Probe Microscope JSPM-4210, JEOL[®], Tokio, Japón)

Analizador termogravimétrico (Hi-Res TGA 2950, New Castle, EUA)

Analizador DSC 2910 (Modulated TA Instruments, New Castle, EUA)

11.2 Materiales de laboratorio

Vasos de precipitado de 50 mL

Espátula acanalada

Pinzas de punta roma

Matraces de 20 mL

Matraces aforados de 10 mL

Matraces aforados de 50 mL

Matraces Erlenmeyer de 25 mL

Matraces Erlenmeyer de 150 mL

Moldes de teflón de 12 cm de diámetro

Cinta Scotch 3M[®]

Frascos color ámbar con tapa de 30 mL

Tubos cónicos para centrífuga Falcon[™] de 15 mL

Tubos cónicos para centrífuga Falcon[™] de 50 mL

Tubos de microcentrífuga

11.3 Reactivos

Acetato de etilo QP al 99 % de pureza. Distribuidora Química Alvi, Estado de México, México.

Acetona (Sigma-Aldrich[®])

Alcohol polivinílico. (PVA, por sus siglas en inglés) Sigma-Aldrich® No. de lote STBG2469

Alginato de sodio. [(AS) (300-700 Cps 1.0 %, RV, 20 rpm, 25°C)] Droguería Cosmopolita, Ciudad de México, México. No. de lote 38067

Carbonato de calcio. Farmacia París, Ciudad de México, México. No de lote 7254

Curcumina. Spectrum® Spectrum Laboratory Products, CA, EUA

Dihidrato de trehalosa. Sigma Aldrich® Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. No de lote 5LBV5487

Metanol. Fermont, Nuevo León, México

Glicerol USP. Droguería Cosmopolita, Ciudad de México, México. No. de lote 200108118101

Polivinilpirrolidona K30 (PVP K30) Kollidon® 30. BASF, EUA. No. de lote 643476550

Propilenglicol USP. Droguería Cosmopolita, Ciudad de México, México. No. de lote D357I7CW91

Poloxámero 188. Sigma Aldrich® Merck KGaA, Darmstadt Alemania. No. de lote SLMB3614V

Policaprolactona (PCL) Sigma-Aldrich® Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) No. de lote MKCB4025

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) Sigma Aldrich® Merck KGaA, Darmstadt, Alemania

Tween 80. Droguería Cosmopolita, Ciudad de México, México. No. de lote 42043917

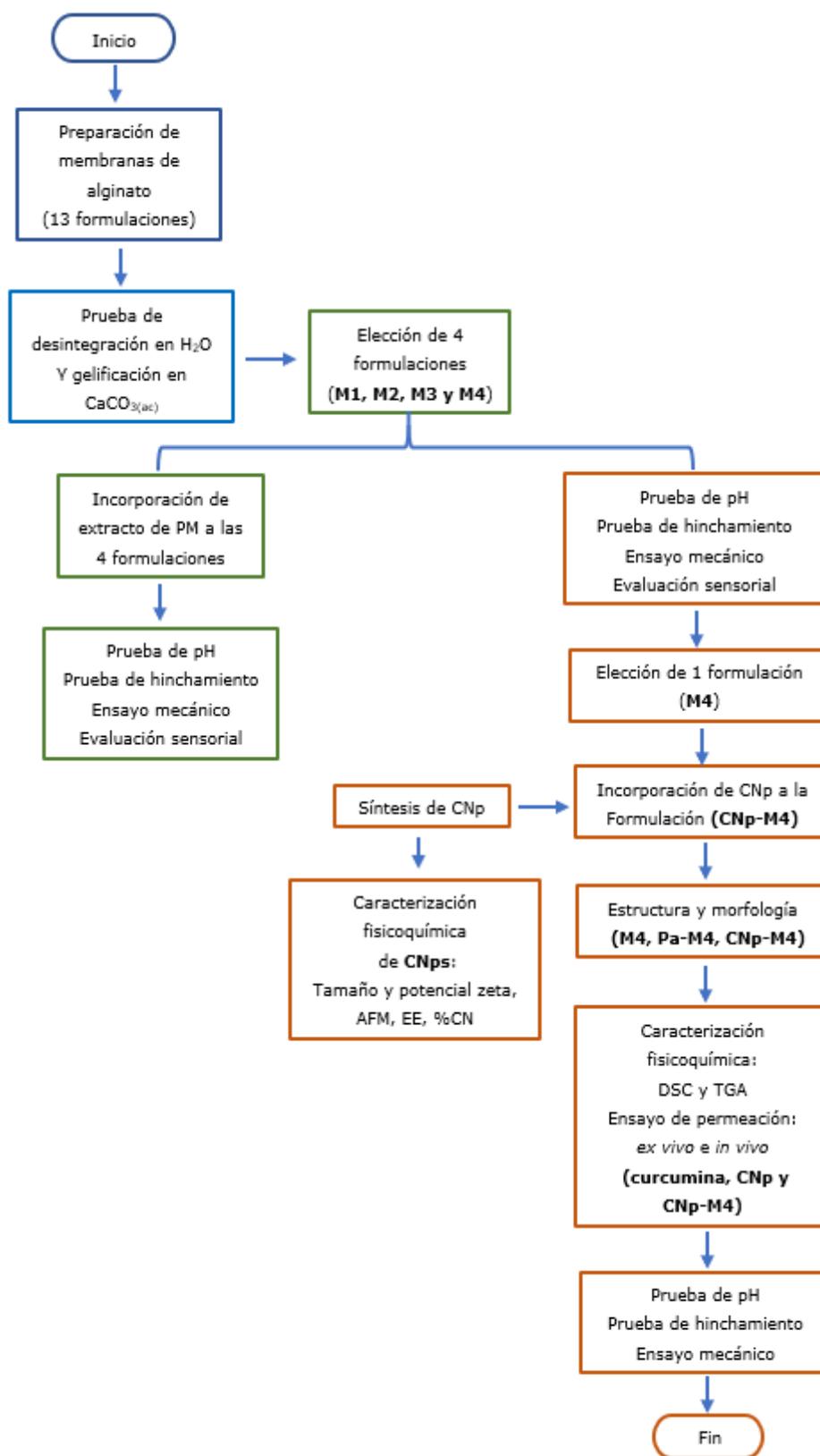


Figura 19. Diagrama de la metodología utilizada.

12. Primera etapa

Con la finalidad de obtener una membrana de alginato que presente las características antes mencionadas, como primera parte se elaboraron membranas con diferentes formulaciones (Tabla 12), posteriormente, se evaluó la desintegración de las membranas en agua y la gelificación de las membranas en una disolución de CaCO_3 .

12.1 Preparación del gel de polímeros y de las membranas

Para la elaboración de las membranas se utilizó el método *Solvent casting* [24]. Primero se elaboró el gel de polímeros, para ello, se pesaron los excipientes de acuerdo con el porcentaje indicado en la Tabla 12. El alginato y el polímero se disolvieron por separado en agua inyectable utilizando agitación mecánica a 35 °C. Una vez disueltos, se incorporaron entre sí y se añadieron los plastificantes, mezclándose hasta observarse un gel homogéneo. Posteriormente, el gel fue centrifugado a 636 *g* durante 20 minutos, para eliminar las burbujas.

Para obtener las membranas, se vertieron aproximadamente 10 g de cada gel en un molde de teflón, y éstos fueron colocados en el horno de secado a 75.0 ± 0.5 °C durante 3 h.

Tabla 12. Formulaciones utilizadas para la elaboración de membranas de alginato.

Formulación	AS (% p/v)	Polímero		Plastificante	
		PVA (% p/v)	PVP K 30 (% p/v)	Prop (% v/v)	Gli (% p/v)
M1	4.0	2.0	----	----	10.0
M2	4.0	2.0	----	12.0	10.0
M3	4.0	----	2.0	----	10.0
M4	4.0	----	2.0	12.0	10.0
M5	4.0	----	4.0	----	10.0
M6	4.0	4.0	----	----	10.0
M7	4.0	----	8.0	----	10.0
M8	4.0	8.0	----	----	10.0

M9	4.0	----	----	----	10.0
M10	4.5	----	----	-----	7.0
M11	1.0	----	----	----	1.0
M12	1.0	1.0	1.0	----	10.0
M13	0.5	----	----	----	2.0

En donde AS: Alginato de sodio; PVA: alcohol polivinílico; PVP K30: polivinilpirrolidona K30; Prop: propilenglicol y Gli: glicerina.

Con la finalidad de elegir las formulaciones que tardan más tiempo en desintegrarse al estar en medio acuoso, las membranas se sumergieron en agua, además para observar la gelificación de las membranas al añadir Ca^{2+} se sumergieron en una disolución de Ca^{2+} .

12.2 Prueba de desintegración en H_2O y gelificación con iones de calcio

Las membranas se cortaron en forma de cuadrado de 1 cm^2 , se colocaron en un recipiente de plástico con 1 mL de agua destilada o disolución de CaCO_3 0.014 M. Después de 1 hora se observaron los cambios en la estructura de las membranas.

12.2.1 Preparación de la disolución de CaCO_3 0.014 M

Se pesaron 140 mg de CaCO_3 y se colocaron en un vaso de precipitado, se le añadieron 20 mL de agua destilada y 450 μL de HCl concentrado para disolver el CaCO_3 , éste se vertió en un matraz aforado de 100.0 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

De acuerdo con los resultados obtenidos se eligieron las formulaciones M1, M2, M3 y M4 para incorporarles extracto acuoso de Palo Mulato.

12.3 Elaboración de las membranas con extracto acuoso de Palo Mulato

12.3.1 Preparación del extracto acuoso de Palo Mulato

Se enjuagaron 3.4 kg de corteza de PM con agua y se incorporaron a 2.7 L de agua hirviendo, dejándose en ebullición durante 20 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y por último se filtró utilizando papel filtro de tamaño de poro pequeño.

12.3.2 Preparación de las membranas

Las membranas se elaboraron utilizando el método de *Solvent Casting*, antes descrito; utilizando como vehículo extracto acuoso de Palo mulato en lugar de agua inyectable.

Con el objetivo de seleccionar la mejor formulación para incorporarle nanopartículas con curcumina (CNp), las membranas se caracterizaron física, fisicoquímica y mecánicamente; además se realizó una evaluación sensorial a las ocho formulaciones (membranas vehículo y con PM).

12.4 Caracterización de las membranas

12.4.1 Determinación de pH

El pH del gel se evaluó utilizando un potenciómetro. Para ello se prepararon los geles de las formulaciones M1, M2, M3, M4 y CNp-M4; el potenciómetro se calibró con soluciones estándar y las muestras se pusieron en contacto con el electrodo hasta obtener un valor constante. Este procedimiento se realizó 3 veces por cada muestra, para obtener el promedio y la desviación estándar.

12.4.2 Prueba de hinchamiento

Se cortaron quince muestras de cada formulación (M1, M2, M3, M4, Pa-M1, Pa-M2, Pa-M3, Pa-M4 y CNp-M4) en forma de cuadrado de 1 cm², las cuales

se pesaron sobre charolas de papel aluminio en forma de rectángulo de 3x4 cm previamente pesadas.

Las muestras se dividieron en 5 bloques, cada uno correspondiente a un tiempo distinto: 5, 10, 20, 30 y 60 minutos. Cada bloque contenía tres muestras de cada formulación.

Para cada tiempo, se llevó a cabo la siguiente metodología:

Las membranas sobre las charolas se dispusieron sobre una superficie plana y se agregaron 750 μ L de PBS 1X sobre cada muestra, al caer la primera gota se inició la cuenta del tiempo.

Una vez cumplido el tiempo establecido, las charolas se voltearon de forma vertical por dos minutos sobre papel absorbente permitiendo escurrir y absorber el exceso de PBS, transcurrido este tiempo se pesaron nuevamente las charolas con las membranas.

12.4.3 Ensayo mecánico

La resistencia a la tracción (RT) y el porcentaje de elongación (% E) de las membranas de alginato (M1, M2, M3, M4, Pa-M1, Pa-M2, Pa-M3, Pa-M4 y CNp-M4), se evaluaron con un equipo de pruebas mecánicas (Sintech 1/S marca MTS, EUA) equipado con una celda de carga nominal de 100 N y ajustado a una velocidad de 2.4 mm/s.

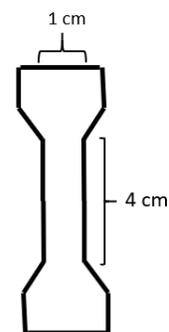


Figura 20. Dimensiones de la membrana en forma de mancuerna.

Antes de iniciar la prueba, se midió el grosor de las membranas con ayuda de un Vernier. Posteriormente, tres muestras de cada formulación se cortaron en forma de mancuerna (Figura 20) de acuerdo a lo reportado por *Sivalingam Udhayakumar* [80], con una longitud de 40 mm y 10 mm de ancho. Para realizar la prueba, cada muestra se colocó en las mordazas superior e inferior del equipo. Finalmente, se activó el equipo

de pruebas mecánicas, utilizando los parámetros antes mencionados. Se registró la carga (Lb) y el desplazamiento (mm) de cada membrana. Para calcular RT y % E se utilizaron las siguientes ecuaciones de acuerdo a lo publicado por Sandeep Karki [24]:

$$RT = \frac{F}{A}$$

$$\%E = \frac{D}{L} * 100$$

En donde RT está reportado en MPa, F: fuerza de ruptura (N); A: área transversal (mm²). D: desplazamiento al punto de ruptura (mm), L: longitud inicial de la membrana (mm).

12.4.4 Evaluación sensorial

Se cortaron veinte muestras en forma de cuadrado de 1 cm² de cada formulación (M1, M2, M3, M4, Pa-M1, Pa-M2, Pa-M3 y Pa-M4) con las cuales se realizó la evaluación sensorial en 20 voluntarios bajo los siguientes criterios:

❖ Criterios de inclusión

Voluntarios de sexo masculino y femenino entre 22 y 36 años de edad, que no hubieran utilizado productos cosméticos en los antebrazos 24 horas antes de realizar la prueba. Sin ninguna patología específica, ni en estado de ayuno y con su consentimiento.

❖ Criterios de exclusión

Personas con alguna enfermedad cutánea o sensibilidad en la piel, que hubieran utilizado productos cosméticos en los antebrazos 24 horas antes de realizar la prueba y que no presentaran su consentimiento. Personas que presentaran cicatrices, tatuajes o lunares en los antebrazos.

❖ Procedimiento

A cada voluntario se le limpiaron ambos antebrazos con una gasa impregnada de agua destilada y se le hizo entrega de una charola de plástico conteniendo una muestra de membrana de cada una de las formulaciones, designadas por claves de acuerdo a la Tabla 12, además de un cuestionario (Anexo 1), el cual respondieron, de acuerdo con lo que percibieron al tacto.

13. Segunda etapa

Tras los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se eligió la formulación M4 como la óptima para funcionar como un apósito ideal de acuerdo a sus características de capacidad de absorción, determinada a través de la prueba de hinchamiento; elasticidad y resistencia a la tracción, determinadas con la prueba mecánica y capacidad de adhesión a la piel, determinada mediante la evaluación sensorial.

Para poder determinar la capacidad de liberación de un principio activo desde la membrana M4, así como la permeación del mismo en la piel se incorporaron a la formulación nanopartículas con curcumina (CNp). La curcumina además de ser un compuesto fácilmente cuantificable mediante espectroscopía UV-vis, posee propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas que son ideales para la curación de heridas.

13.1 Preparación de nanopartículas de PCL con curcumina encapsulada (CNp)

Para la elaboración de CNp se utilizó el método de emulsificación-difusión [81]. Como primera parte, se saturaron la fase orgánica y acuosa. Para ello, se vertieron 100 mL de agua destilada (Fase acuosa) y 100 mL de acetato de etilo (Fase orgánica) en un embudo de separación de 1 L, ésta mezcla se agitó vigorosamente, dejando escapar la presión, hasta observar la separación de

ambas sustancias. Después se prepararon las soluciones A y B, como se indica a continuación.

Solución A

Se pesaron 400 mg de PCL, la cual se disolvió en 20 mL de fase orgánica (acetato de etilo) con ayuda de agitación mecánica y temperatura de 35 °C, una vez disuelta se dejó enfriar hasta temperatura ambiente para agregar 100 mg de curcumina y se continuó la agitación hasta su disolución.

Solución B

Se pesaron 5 gramos de Poloxámero 188 y se disolvieron en 100 mL de fase acuosa sumergida en un baño de hielo.

Posteriormente, se cubrió con plástico film la boquilla de un recipiente cilíndrico de cristal colocado bajo el aspa del Ultra túrrax, con la finalidad de evitar exceso de espuma. Luego se añadieron 40 mL de la Solución B con ayuda de un embudo de vidrio, se encendió el túrrax a la mínima velocidad y se vertió la solución A. Una vez añadidas las soluciones, se aumentó la velocidad a 14,000 rpm durante 10 minutos. Después, se agregaron 160 mL de agua destilada y nuevamente se colocó la agitación a 14,000 rpm durante 10 minutos más. Al finalizar el tiempo, el exceso de fase orgánica se evaporó utilizando un Rotavapor a 50 rpm, con el baño de agua previamente calentado a 40 °C.

La dispersión de CNp se contuvo en un vaso de precipitado cubierto con papel aluminio y se dejó en una parrilla de agitación dentro de la campana de extracción durante 48 h, permitiendo evaporar el remanente de disolvente.

Posterior a ello, se centrifugó la dispersión a 15,557 g durante 30 minutos y por cada 10 mL de la misma, el botón obtenido se resuspendió con 1 mL de

agua inyectable. Finalmente, el precipitado resuspendido se reunió en un tubo cónico para centrífuga Falcon™, el cual se conservó a 4 °C hasta su uso [52].

Con el objetivo de evaluar las propiedades y estabilidad térmica de las CNp, se congeló y liofilizó una muestra a -49 °C, 0.05 mBar durante 24 h, utilizando 5 % p/v de D-(+)-trehalosa como crioprotector.

13.2 Caracterización de CNp

13.2.1 Evaluación del tamaño de partícula y potencial zeta

Para evaluar el tamaño de partícula y la distribución de CNp, se utilizó dispersión dinámica de luz. Mediante Velocimetría Láser Doppler (VLD) se determinó el potencial zeta de CNp. Las dispersiones de CNp fueron evaluadas cinco veces a 25 °C en un Zetasizer (Malvern Instrument ZS90; Malvern, UK).

13.2.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El tamaño y la geometría de CNp se analizaron mediante AFM, utilizando modalidad de barrido (JSPM-4210, JEOL®, Tokio, Japón). Para ello, a partir de la dispersión de CNp obtenida después de resuspender el sedimento, se realizó una dilución 1:100 con agua destilada. De esta dilución se colocó una gota sobre un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Para evaluar la muestra, el cubreobjetos se colocó en cinta de carbón a temperatura ambiente.

13.2.3 Eficiencia de entrapamiento y porcentaje de carga

Para calcular la eficiencia de entrapamiento (EE) y la cantidad de curcumina cargada dentro de las nanopartículas (CN), la dispersión de CNp se centrifugó a 15,557 g durante 40 minutos.

Para obtener la EE, el sedimento se resuspendió en acetato de etilo y la absorbancia se midió mediante espectrofotometría UV-visible a 420 nm

(DLAB®, SP-UV1000, Beijing, China). La concentración de curcumina se determinó utilizando una curva de calibración (coeficiente de $R^2 = 0.99985$).

Para determinar la CN, el sedimento se secó a temperatura ambiente. Después, se pesó y se disolvió en acetato de etilo. Finalmente, la absorbancia se midió mediante espectrofotometría UV-visible. La cantidad de curcumina se calculó usando la misma curva de calibración. Las ecuaciones utilizadas para realizar los cálculos son las siguientes:

$$\% EE = \frac{C}{CI} * 100$$

$$\% CN = \frac{C}{N} * 100$$

en donde, C: Cantidad de curcumina encapsulada en las nanopartículas, CI: Cantidad inicial de curcumina y N: Cantidad de las nanopartículas.

13.3 Elaboración de membranas de alginato con CNp (CNp-M4)

Las membranas se elaboraron de acuerdo con el método antes descrito; sin embargo, como vehículo se utilizó una dispersión de CNp al 0.01 % de curcumina en agua inyectable.

13.3.1 Preparación de la dispersión de nanopartículas de PCL cargadas con curcumina al 0.01 % p/v

Se colocaron 4.160 mL (equivalente a 1 mg de curcumina) de dispersión de nanopartículas de PCL con curcumina en un matraz aforado de 10.0 mL y se llevó al aforo con agua inyectable.

13.4 Caracterización fisicoquímica

Las membranas CNp-M4 también fueron evaluadas con pruebas mecánicas, de hinchamiento y pH, utilizando los mismos procedimientos que en las formulaciones M1, M2, M3 y M4.

13.4.1 Análisis termogravimétrico (TGA) de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4

Para evaluar la estabilidad térmica se utilizó el analizador termogravimétrico (Hi-Res TGA 2950, New Castle, EUA). Se analizaron 5 mg de cada muestra de membrana, en un rango de temperatura ambiente a 500 °C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, bajo una atmósfera de nitrógeno.

13.4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4

Las propiedades térmicas fueron determinadas con un analizador de calorimetría diferencial de barrido (DSC 2910 Modulated TA Instruments). Las muestras se colocaron en celdas de aluminio herméticas y se evaluaron desde temperatura ambiente hasta 250 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, bajo una atmósfera de nitrógeno.

13.4.3 Estructura y morfología de M4, Pa-M4 y CNp-M4

La estructura y morfología de las membranas se analizó mediante microscopía óptica. Las membranas fueron cortadas en una sección longitudinal y en forma circular con 1 cm de diámetro; se utilizó un microscopio óptico (BioBlue, euromex, Arnhem, Netherlands) a 10x para observar todas las muestras. Las imágenes fueron tomadas en cuatro campos diferentes. El diámetro de poro y el grosor de las membranas fue calculado usando un software (Am Scope 3.7 For Digital Camera, EUA). Además, los poros fueron contados en cada campo, y se determinó el promedio.

Así mismo, las muestras se colocaron a 5.2 cm de distancia del microscopio digital (Dino-Lite Premier, Taiwan) a 9.4x y se tomaron fotografías para observar la superficie de las muestras.

Por otra parte, con el objetivo de observar la transparencia, las membranas se cortaron en forma circular de 3 cm de diámetro. Después se colocaron

sobre una imagen (Antes de hinchamiento), se observaron y se tomaron fotografías. Después de ello, a cada muestra se le añadió 1 mL de solución PBS y después de 2 minutos (Durante el hinchamiento) se tomaron fotografías a las muestras.

13.5 Ensayo de liberación

13.5.1 Estudio de liberación *in vitro*

Para evaluar los perfiles de liberación de curcumina desde las CNp y membrana CNp-M4, se utilizó el método de dispersión directa. Las membranas CNp-M4 (1 cm de diámetro) y la dispersión de CNp se colocaron por separado en viales con 5 mL de una solución de PBS (pH 7.4, 2 % p/v de Pluronic® F-127) en un baño de agua con agitación a 37 °C. A diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 y 48 h) 3 viales se retiraron de la agitación y se centrifugaron a 18,512 *g* durante 30 minutos. La curcumina liberada en el sobrenadante se cuantificó mediante espectrofotometría UV-visible a 420 nm. Con la finalidad de predecir el mecanismo de liberación, los resultados se analizaron mediante diferentes modelos matemáticos como: orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

13. 6 Ensayos de permeación

13.6.1 Estudio de permeación *ex vivo*

➤ Muestras de piel porcina

La piel porcina se obtuvo de la parte posterior de orejas de cerdo compradas en el mercado de San Juan (Ciudad de México) dentro de las 12 h posteriores al sacrificio [82]. Las orejas de cerdo se lavaron con solución salina; posteriormente, se realizaron 12 cortes de piel en forma circular de 5 cm de diámetro. Se eliminó el exceso de tejido adiposo [83] con ayuda de un bisturí y tijeras quirúrgicas.

➤ Montaje de las celdas de Franz

Las muestras se dividieron en cinco grupos:

Grupo 1: Membrana CNp-M4 de 3 cm de diámetro (n= 3).

Grupo 2: Dispersión de CNp al 0.01 % (p/v) de curcumina (control positivo, 2 mL, n= 3)

Grupo 3: Membrana M4 de 3 cm de diámetro (Control negativo, n= 1)

Grupo 4: Solución salina (Control negativo, n = 2)

Grupo 5: Dispersión de curcumina en agua al 0.01 % (p/v) de curcumina (n= 3)

Se utilizaron celdas de difusión de Franz de vidrio con un área de difusión disponible de 7.07 cm². La piel recién cortada se montó en las celdas de Franz con el EC hacia el compartimento donador y la dermis hacia el compartimento receptor.

El compartimento receptor se llenó con 30 mL de solución de PBS 0.1 M con 2.5 % de Tween 80 (pH 7.4), éste último se adicionó para permitir la disolución de curcumina en el medio. Se mantuvo en agitación constante a 400 rpm durante el experimento. Se sumergieron 12 celdas de Franz en un baño de agua a una temperatura constante de 37.0 ± 0.5 °C [84].

➤ Aplicación del tratamiento

En cada estudio, se utilizaron 3 celdas de Franz para colocar el tratamiento y una para el blanco. Una vez instalado el sistema, se colocaron 2 mL de dispersión de CNp al 0.01 % (p/v) de curcumina sobre la piel de cerdo (control positivo). Como blanco se colocaron 2 mL de solución salina isotónica sobre la piel de cerdo.

En el ensayo con dispersión de curcumina en agua al 0.01 % (p/v) de curcumina, se colocaron 2 mL de la dispersión sobre la piel de cerdo. Como blanco se colocaron 2 mL de solución salina isotónica sobre la piel de cerdo.

Para el ensayo con las membranas CNp-M4, éstas se colocaron sobre la piel de cerdo con ayuda de pinzas punta roma y luego se ajustaron ambos compartimentos con unas pinzas. Posteriormente, se colocó 1 mL de agua destilada sobre las membranas. Como blanco se utilizó la membrana vehículo, posteriormente, se añadió 1 mL de agua destilada sobre cada membrana.

En todos los ensayos, tanto el compartimento donador de las celdas como el orificio para la toma de muestra fueron cubiertos con plástico film para evitar la evaporación de la solución de tratamiento y de la solución de PBS [85], el recipiente de plástico también se tapó para evitar la pérdida de agua del sistema.

➤ Toma de muestras

Para cada análisis se tomó 1 mL de muestra con la reposición simultánea del mismo volumen de PBS 0.1 M con 2.5 % de Tween 80 en el compartimento receptor.

Las muestras se tomaron en los siguientes intervalos de tiempo: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 22, 24, 26, 28 y 30 h.

Al terminar la prueba, se desmontó el sistema y la piel fue removida cuidadosamente de las celdas de Franz para realizarle *Tape stripping*.

➤ *Tape stripping* en piel de cerdo

Se cortaron 15 tiras de 3x3 cm de cinta Scotch 3M®, inmediatamente después se colocó una por una en la superficie de la piel en donde se aplicó el tratamiento, se presionó deslizando uniformemente una espátula sobre la superficie de la cinta cinco veces, luego se retiró jalándola con unas pinzas de

acero inoxidable con punta roma desde el extremo inferior derecho hacia el extremo superior izquierdo. Este procedimiento se repitió 14 veces más.

Posteriormente, todas las cintas de cada muestra fueron colocadas en un matraz Erlenmeyer de 150 mL, se añadieron 40 mL de acetona, se selló con plástico film y se mantuvo en agitación mecánica durante 15 h a 4 °C.

➤ Extracción de curcumina de dermis y epidermis

Por último, cada muestra de piel fue cortada en pedazos pequeños con ayuda de una tijera, la curcumina se extrajo con 25 mL de acetato de etilo: metanol 9:1. El extracto fue centrifugado a 7,602 g durante 10 minutos [86].

➤ Cuantificación de curcumina

En todos los procedimientos, se realizó la cuantificación de curcumina mediante espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 420 nm [52].

13.6.2 Estudio de permeación *in vivo*

Para evaluar la permeación *in vivo* de CNp a través del estrato córneo se utilizó la técnica de *Tape Stripping*.

➤ Criterios de inclusión

Voluntarios de sexo masculino entre 22 y 36 años de edad, que no hubieran utilizado productos cosméticos en los antebrazos 24 h antes de realizar la prueba. Sin ninguna patología específica, ni en estado de ayuno y con su consentimiento.

➤ Criterios de exclusión

Personas de sexo femenino, con alguna enfermedad cutánea o sensibilidad en la piel, que hubieran utilizado productos cosméticos en los antebrazos 24

horas antes de realizar la prueba y que no presentaran su consentimiento. Personas con cicatrices, tatuajes o lunares en los antebrazos.

➤ Tamaño de la muestra y tratamientos

Cuatro personas de sexo masculino. A cada uno se les aplicaron 3 tratamientos: Dispersión de CNp al 0.01 % (p/v) de curcumina en agua, dispersión de curcumina al 0.01 % (p/v) en agua y CNp-M4 al 0.01 % (p/v) de curcumina. Y en todos los voluntarios se analizó un blanco de piel.

➤ Aplicación del tratamiento

Antes de aplicar el tratamiento, a cada voluntario se le limpió la zona del antebrazo con un algodón impregnado con agua y se dejó secar, inmediatamente después se colocó el tratamiento, el cual permaneció en contacto con la piel durante 6 h.

- Membranas de alginato con CNp (CNp-M4)

Se cortaron membranas de 3 cm de diámetro, a cada voluntario se le colocó una de ellas sobre el antebrazo limpio (Figura 21). Sobre cada membrana se agregaron 1.75 mL de agua destilada, una vez finalizado el tiempo se retiró con ayuda de unas pinzas de acero inoxidable con punta roma.



Figura 21. CNp-M4 aplicada sobre el antebrazo.

- Dispersión de curcumina en agua y dispersión de CNp

Al antebrazo de cada voluntario se le agregaron 2 mL de la dispersión, la cual fue contenida con ayuda de un cilindro de vidrio de 3 cm de diámetro (Figura 22). Una vez finalizado el tiempo se retiró el tratamiento, dejándose caer la solución excedente sobre papel absorbente, la piel se dejó secar antes de continuar con la prueba de *Tape Stripping* (Figura 23).

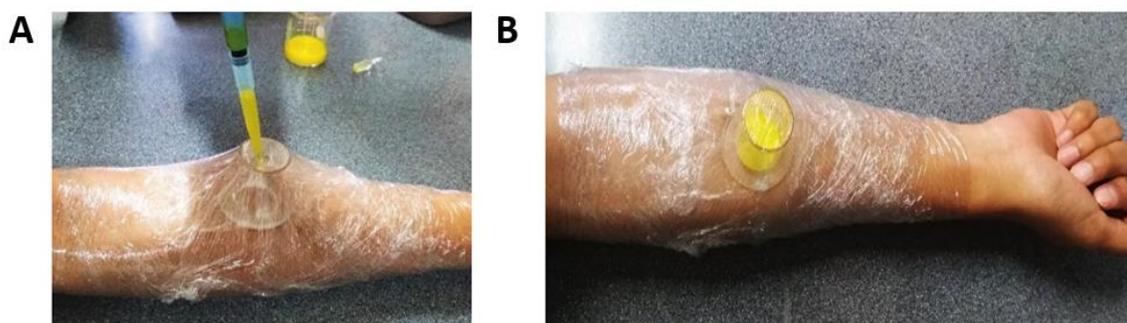


Figura 22. A. Aplicación de la dispersión de CNp sobre el antebrazo. B. Brazo de un voluntario después de la aplicación de dispersión de curcumina.



Figura 23. Antebrazo después de 6 horas de tratamiento con dispersión de CNp.

➤ *Tape stripping*

Se cortaron y etiquetaron 15 tiras de 3x3 cm de cinta Scotch 3M®, inmediatamente después, se colocó una por una en el sitio en donde se aplicó el tratamiento, se presionó deslizando uniformemente una espátula sobre la superficie de la cinta cinco veces, luego se retiró jalándola con unas pinzas de

acero inoxidable con punta roma desde el extremo inferior derecho hacia el extremo superior izquierdo. Este procedimiento se repitió 14 veces más (Figura 24).



Figura 24. Cinta Scotch 3M® después de realizar *tape stripping* sobre el sitio de tratamiento.

➤ Extracción de curcumina

Cada una de las cintas se colocó en un frasco color ámbar con tapa de 30 mL y se añadieron 15 mL de acetona. Todos los frascos se colocaron en agitación mecánica durante 15 h, posteriormente las muestras fueron filtradas para eliminar las partículas de pegamento.

➤ Cuantificación de curcumina

Se realizó la cuantificación de curcumina mediante espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 420 nm. Cada muestra se analizó por triplicado.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

14. Primera etapa

14.1 Prueba de desintegración en H₂O y gelificación con iones de calcio

De acuerdo con la Tabla 13 se observa que las formulaciones que tienen baja concentración de polímeros y/o plastificantes se desintegran casi inmediatamente al estar en contacto con el agua. Esto se debe a que al tener baja proporción de excipientes hay una menor interacción entre las cadenas de polímeros para darle mayor resistencia a la estructura de la membrana, por lo que al interactuar con el agua fácilmente regresan a su estado anterior (gel).

En contraste, se observa que, al aumentar el número de excipientes y la concentración de éstos, las membranas son más resistentes al agua. Debido a que se forman mayor número de interacciones entre las cadenas de polímeros, como puentes de hidrógeno, lo que proporciona una estructura más resistente. A pesar de que los puentes de hidrógeno son más débiles que los covalentes, al tomar en consideración un elevado número de ellos entre las cadenas poliméricas, resultan en mayores fuerzas de atracción en los polímeros que los presentan [87].

Por otro lado, todas las formulaciones, excepto M13, se hincharon y formaron una estructura gelatinosa al estar en contacto con la disolución de CaCO₃. Ya que el AS forma una estructura conocida como "caja de huevo", al estar en contacto con Ca²⁺ [31]. En la formulación M13 no se observó que la membrana se hinchara, esto podría deberse a que la concentración de AS no era la suficiente para poder formar dicha estructura.

Tabla 13. Observaciones de las 13 formulaciones de membranas de alginato. En donde a) Se deshace después de cierto tiempo, b) No se deshace, c) Se hincha, d) Estructura gelatinosa y e) Se deshace al tocarla. En la presencia de burbujas, + es poco y +++++ es gran cantidad de burbujas.

Formulación	H₂O	CaCO_{3(ac)}	Presencia de burbujas en el gel
M1	a (45 s)	b, c, d	+++
M2	a (3 min)	b, c, d	+++
M3	a (30 s)	b, c, d	++
M4	a (1.5 min)	b, c, d	++
M5	a (3 min)	b, c, d	++++
M6	a (1 min)	b, c, d	++++
M7	a (3 min)	b, c, d	+++++
M8	a (70 s)	b, c, d	++++
M9	a (22 s)	c, d, e	+
M10	a (20 s)	b, c, d	+
M11	a (5 s)	b, c, d	+
M12	a (10 s)	c, d, e	+
M13	a (5 s)	a (10 s)	+

Las membranas se desintegraron en el agua en diferentes tiempos (Tabla 13), sin embargo, es necesario que éstas no se desintegren inmediatamente al estar en contacto con un medio acuoso, ya que una de las características deseadas es que las membranas absorban el exudado de las heridas. A su vez, se espera que se puedan desintegrar con agua después de cierto tiempo, para que se puedan retirar fácilmente de una herida y sin causar dolor.

Por esas razones, las membranas que se eligieron para continuar con las pruebas fueron M1, M2, M3 y M4, ya que de las formulaciones que tardan más en desintegrarse con el agua, éstas son las que presentan menor cantidad de burbujas al preparar el gel de polímeros, esto facilita el proceso de elaboración de las membranas.

Las formulaciones M1, M2, M3 y M4 se eligieron para continuar con las pruebas mecánicas, de hinchamiento y evaluación sensorial. Además, se les incorporó extracto acuoso de Palo mulato.

14.2 Caracterización de las membranas

14.2.1 Determinación de pH

El pH de las formulaciones tópicas es muy importante. Los apósitos deben tener un pH entre 5 y 6, ya que si el apósito presenta un pH ácido al aplicarse en la herida puede ser doloroso para los pacientes; mientras que si el pH es mayor a 6 podría facilitar una infección en la herida [17].

Los valores de pH de los geles de las formulaciones fueron 5.78 ± 0.06 , 5.76 ± 0.03 , 5.65 ± 0.01 , 5.97 ± 0.05 y 5.68 ± 0.03 para M1, M2, M3, M4 y CNp-M4, respectivamente. El pH natural de la piel está dentro de un rango de 5 a 6, dependiendo de la persona, mientras que el pH de una herida crónica oscila en un rango alcalino entre pH 7 y 8, lo que aumenta la susceptibilidad a la infección de la herida. Estos resultados demostraron que todas las formulaciones son adecuadas para cubrir una herida y favorecer el proceso de cicatrización.

14.2.2 Prueba de hinchamiento

Las membranas deben absorber el exudado de la herida, brindándole al mismo tiempo un ambiente húmedo que promueva la cicatrización. Por esta razón se determinó mediante diferencia de peso el porcentaje de hinchamiento de 9 formulaciones diferentes (Figura 25).

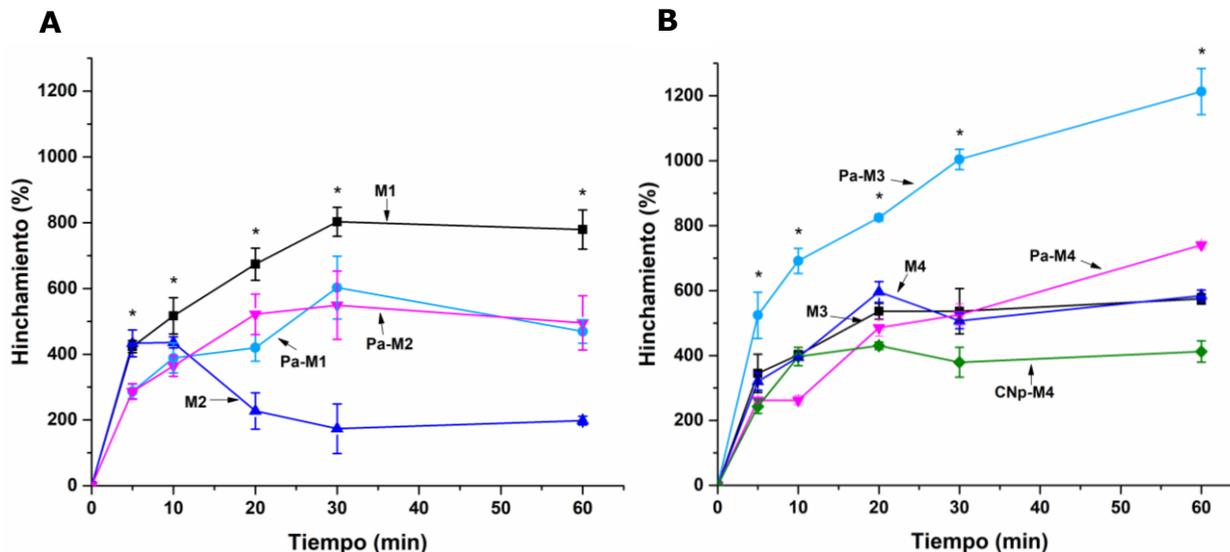


Figura 25. Porcentaje de hinchamiento de membranas en función del tiempo. A y B Formulaciones de membranas elaboradas con PVA y PVP, respectivamente (media \pm EE, n=3).

Se realizó un análisis de varianza para determinar las diferencias en el porcentaje de hinchamiento de acuerdo a cada formulación en función del tiempo, en donde se demostró que tanto la formulación como el tiempo en que las membranas fueron expuestas a PBS, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el hinchamiento, con un 95.0 % de nivel de confianza (ver Anexo II, Tabla 17).

Se encontró que existe diferencia significativa al utilizar un polímero u otro en formulaciones sin PM ni propilenglicol (M1 y M3) a los 10, 20 y 60 min. La diferencia de polímeros también influye en membranas con propilenglicol pero sin PM (M2 y M4) a los 20, 30 y 60 min, así como en formulaciones sin propilenglicol que contienen PM (Pa-M1 y Pa-M3) en todos los tiempos, sin embargo, en las formulaciones Pa-M2 y Pa-M4, las cuales contienen tanto propilenglicol como PM, sólo hay diferencia a los 60 min, es decir no influye el uso de PVA o de PVP.

No existe diferencia significativa al agregar propilenglicol a la formulación que contiene PM y PVA (Pa-M2 y Pa-M1) en ningún tiempo, pero sí la hay al agregarlo a la formulación que contiene PM y PVP (Pa-M4 y Pa-M3) a los 5,

20, 30 y 60 min. De acuerdo a la Figura 25, se observa que Pa-M3 es la membrana que representa el mayor porcentaje de hinchamiento de las nueve formulaciones.

Existe diferencia significativa en el porcentaje de hinchamiento al agregar PM a formulaciones con propilenglicol y PVA a los 5, 20, 30 y 60 minutos (M2 y Pa-M2) y sin propilenglicol en todos los tiempos (M1/Pa-M1). También existe diferencia al agregar PM a membranas sin propilenglicol con PVP a los 5, 10, 20 y 60 minutos (M3 y Pa-M3) pero no la hay cuando el propilenglicol se encuentra presente en formulaciones con PVP (M4 y Pa-M4), con excepción de los 60 minutos.

El tiempo que las membranas son expuestas a PBS, el tipo de polímero sintético y la adición de PM o CNp-M4 influyen en el porcentaje de hinchamiento. En la figura 25A se observa que el porcentaje máximo se alcanza entre los 10 y 30 minutos, después de este tiempo se observa un porcentaje menor. En la Figura 25B se observa que las formulaciones realizadas con PVP alcanzan el porcentaje máximo de hinchamiento entre los 20 y 60 minutos. Esto es debido a que las membranas comienzan a disolverse después de estar más de este tiempo expuestas a PBS, ya que todos los componentes son solubles en agua.

La diferencia en el porcentaje de hinchamiento entre PVP y PVA puede explicarse porque la PVP es más hidrófila que el PVA [39], lo cual se observó al ser disueltos en agua al momento de preparar las formulaciones. La naturaleza amorfa de la PVP y su alta afinidad por el agua crea una red polimérica que causa un mayor hinchamiento [40].

Cuando el agua penetra en la matriz del polímero las cadenas empiezan a relajarse, lo cual promueve la permeación de más agua, sin embargo, en las últimas etapas de hinchamiento el coeficiente de difusión se ve disminuido,

las cadenas están completamente relajadas y se alcanza un punto de equilibrio, en otras palabras, ya no es posible absorber más agua [39].

Los polímeros experimentan procesos de degradación y erosión. Cuando un polímero se degrada, las cadenas son escindidas formando oligómeros y posteriormente monómeros. La pérdida continua de monómeros conducirá finalmente al fenómeno de erosión. La degradación progresiva cambia la microestructura de la membrana a través de la formación de poros, a través de los cuales se liberan los oligómeros y los monómeros [88].

En cuanto al efecto del propilenglicol en el % de hinchamiento, en general no se observa una tendencia definida, sin embargo, es visible que cuando a la formulación M1, se agrega propilenglicol, el % de hinchamiento se abate (M2). Lo cual puede deberse a que entre el PVA y el propilenglicol se genera una interacción fuerte, y al soltar los enlaces que anteriormente tenía el PVA con el alginato, este último se vuelve más susceptible a disolverse, por lo que la formulación no puede retener el agua. Pero cuando las formulaciones contienen PM, éste mantiene los enlaces de ambos polímeros. Por el contrario, el propilenglicol afecta drásticamente el % de hinchamiento de Pa-M4 en comparación con Pa-M3, lo que puede ser debido a que en este caso el PM desestabiliza la formulación con PVP.

El extracto de PM contiene diversas moléculas, en su mayoría terpenos y lignanos, estas son moléculas grandes que se intercalan en la red uniéndose a los polímeros principalmente a través de sus grupos OH por puentes de hidrógeno [57,89].

Cuando a la formulación M2 se agrega PM (Pa-M2) el hinchamiento aumenta, del mismo modo, PM causa un mayor hinchamiento cuando se adiciona a M3. Lo cual puede deberse a que el extracto de palo mulato contiene lignanos (polifenoles) que debido a la interacción de sus grupos OH con el agua promueven la expansión de las redes poliméricas.

En cuanto a las membranas CNp-M4, se observa que al agregarse las CNp a la formulación M4 hay un menor porcentaje de hinchamiento, esto puede deberse al bloqueo de sitios de unión en la red polimérica por parte de las nanopartículas, razón por la cual la formulación ya no es capaz de absorber tanta agua como en M4, sin embargo, un valor de hinchamiento de 430.35 % resulta ideal para ser aplicado como apósito.

El nivel de exudado de una herida es variable, pudiendo ser desde ausente (herida seca), una herida mínimamente exudativa (<5 mL de fluido en 24 h), moderadamente exudativa (5 a 10 mL de fluido en 24 h) o altamente exudativa (>10 mL de fluido en 24 h) [90]. De esta manera, la medición de la capacidad de hinchamiento de un apósito hecho de alginato podría clasificarse de la siguiente manera: apósitos de baja absorbencia (apósito de alginato que absorbe menos de 6 g de líquido por g de apósito, o menos de 12 g/100 cm²) y apósitos de alta absorbencia (apósito de alginato que absorbe 6 g o más de líquido por g de apósito, o bien, más de 12 g/100 cm²) [91]. Con esta consideración, la membrana CNp-M4 posee un valor de 17.48 g/100 cm², correspondiente a una alta absorbencia, siendo similar a varios productos comerciales.

14.2.3 Ensayo mecánico

Para aplicar fácilmente las membranas en una lesión, éstas deben ser flexibles y resistentes a la ruptura, para elegir las formulaciones con las mejores propiedades mecánicas se realizó la prueba mecánica.

En las Figuras 26 y 27 se observan los resultados del ensayo mecánico. Al comparar las membranas vehículo (sin PM), se observa en la Figura 27 que la resistencia a la tracción de M1, M2 y M3 fue de 1.32 ± 0.02 MPa, 1.34 ± 0.01 MPa y 1.96 ± 0.05 MPa, respectivamente. Así mismo, las membranas que tienen PVA en su formulación (M1 y M2) no mostraron diferencia significativa en el porcentaje de elongación con 73.54 ± 0.87 % y 74.90 ± 1.67 %,

respectivamente. Además, se observó que la resistencia a la ruptura y el porcentaje de elongación de las membranas M1 y M2 es menor que la membrana M4. Esto se puede atribuir a que el PVA es un polímero caracterizado por tener pobre elasticidad [92].

Sin embargo, el porcentaje de elongación y resistencia a la tracción de M3 fue de 68.63 ± 6.75 % y 1.18 ± 0.07 MPa respectivamente, aumentando significativamente al adicionarle propilenglicol (M4) a 120.01 ± 5.97 % y 1.96 ± 0.05 MPa. Esto se podría explicar debido a que el propilenglicol es un plastificante con bajo peso molecular, capaz de crear múltiples puentes de hidrógeno con las cadenas de PVP y AS, dando como resultado una membrana más elástica y resistente.

En general, se observa que al incorporar el extracto acuoso de palo mulato en las diferentes formulaciones produce la disminución del porcentaje de elongación de las membranas; excepto en la formulación M1, en donde, por el contrario, aumenta. De la misma manera, al incorporar el extracto de PM a la formulación, disminuye la resistencia a la tracción de todas las membranas. Esto se podría deber a que el extracto acuoso del palo mulato contiene gran número de compuestos orgánicos como polifenoles y flavonoides [57], los cuales interactúan con la red polimérica de las membranas, disminuyendo el número de puentes de hidrógeno entre el AS, PVP, glicerina y/o propilenglicol de la estructura de la membrana dando como resultado la disminución de la resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación.

Por otra parte, se observa en la Figura 26 que al incorporar la dispersión de CNp en la formulación M4, el % E aumenta, obteniendo un valor de 144.39 ± 14.52 %; lo que se podría deber al efecto del Poloxámero 188, que al ser un surfactante produce la disminución del número de poro, proporcionando una estructura más homogénea a la membrana, y por ende más resistente a la ruptura. Por el contrario, la RT disminuye al obtenerse un valor de 1.52 ± 0.16

MPa (Figura 27). Lo cual se podría deber a que al incorporar la dispersión de CNp a la formulación, el número de puentes de hidrógeno entre las cadenas de polímero disminuyen, por lo que se necesita menor fuerza para romper la membrana.

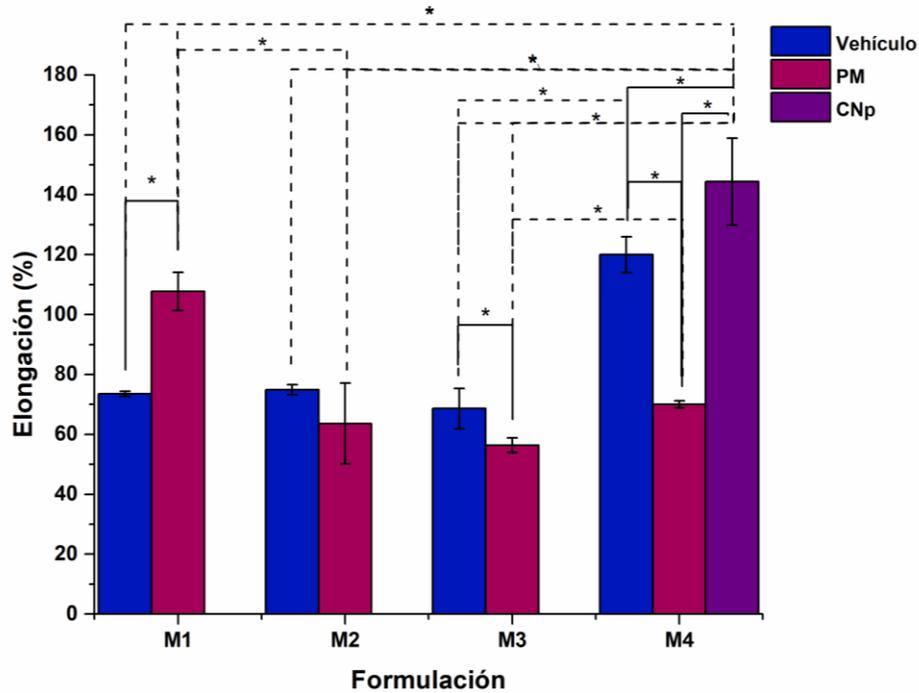


Figura 26. Efecto de los plastificantes, PM y CNp en el porcentaje de elongación de las membranas de alginato. * Indica diferencia significativa entre las muestras (valor de $p < 0.05$)

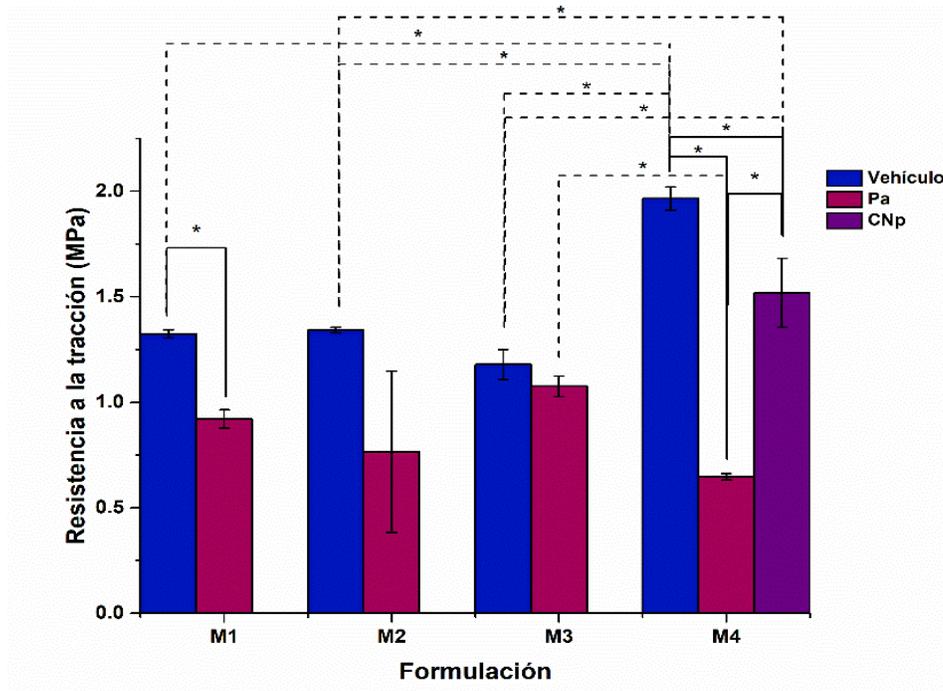


Figura 27. Efecto de los plastificantes y PM en la resistencia a la tracción de las membranas de alginato. * Indica diferencia significativa entre las muestras (valor de $p < 0.05$)

14.2.4 Evaluación sensorial

El cierre de una herida puede llegar a ser prolongado, por lo que se busca que el apósito que promueva la cicatrización sea cómodo y duradero, evitando que sea necesario cambiarlo continuamente. Las membranas desarrolladas serán manipuladas en muchos de los casos por los propios pacientes, por lo que es necesario que éstas tengan características que les permitan una fácil manipulación y colocación. Por lo antes mencionado se llevó a cabo una evaluación en donde fue asignado un puntaje de acuerdo a la característica percibida por 20 voluntarios, Tabla 14.

Tabla 14. Puntuación de los atributos de evaluación sensorial

Atributo	Valor	Característica
Textura	4	Rugosa
	1	Lisa
Adherencia	4	Muy fácil de despegarla
	3	Fácil de despegarla
	2	Difícil de despegarla
	1	Muy difícil de despegarla
Pegajosa	4	Muy pegajosa
	3	Pegajosa
	2	Poco pegajosa
	1	nada pegajosa
Adhesión en seco	4	Adhiere en seco en vertical
	1	No adhiere en seco en vertical
Adhesión con agua	4	Adhiere con agua en vertical
	1	No adhiere con agua en vertical
Deslizamiento	4	No desliza
	1	Desliza

Según los atributos percibidos se observa en las Figuras 28 y 29 que en general, todas las membranas tienen una textura lisa, excepto Pa-M1, esto puede ser debido a que el PVA genera más burbujas en las membranas, por lo que en su superficie puede sentirse el efecto de estos poros, aunado a que no se tiene el efecto plastificante del propilenglicol y a la presencia de extracto de PM.

Ninguna de las membranas presentó dificultades a la hora de ser manipulada, pues en general si ésta se adhiere a sí misma es fácil de despegar.

Las membranas M3, M4, Pa-M3 y Pa-M4 son percibidas como pegajosas, las membranas M1 y Pa-M2 como poco pegajosas. Se observa que esta característica es atribuida principalmente al tipo de polímero utilizado y no al efecto del propilenglicol ni del PM.

A

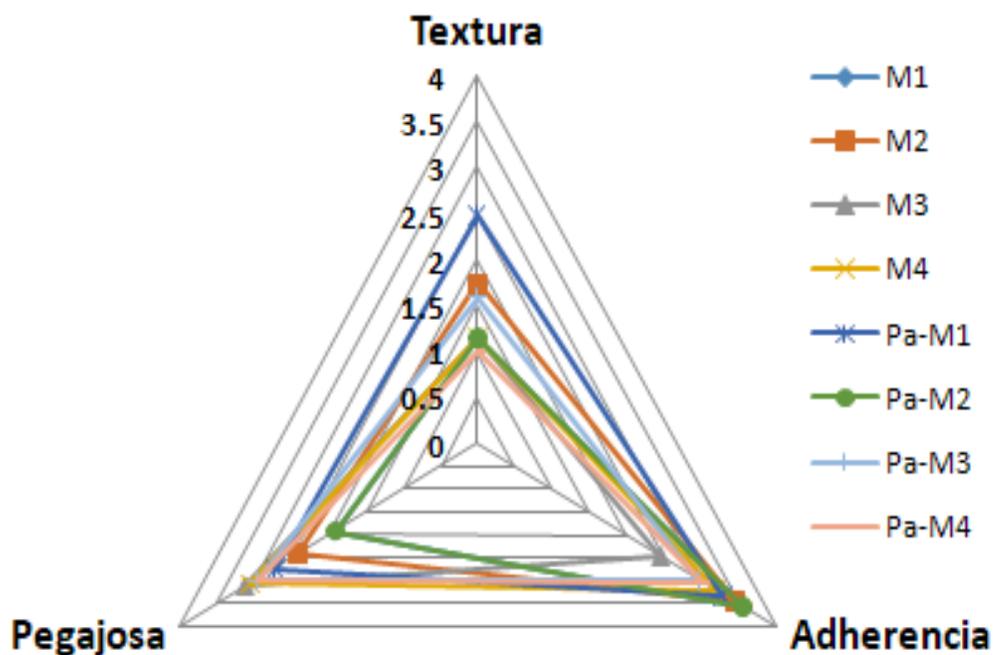


Figura 28. Evaluación sensorial de la textura de diferentes formulaciones de membranas.

B

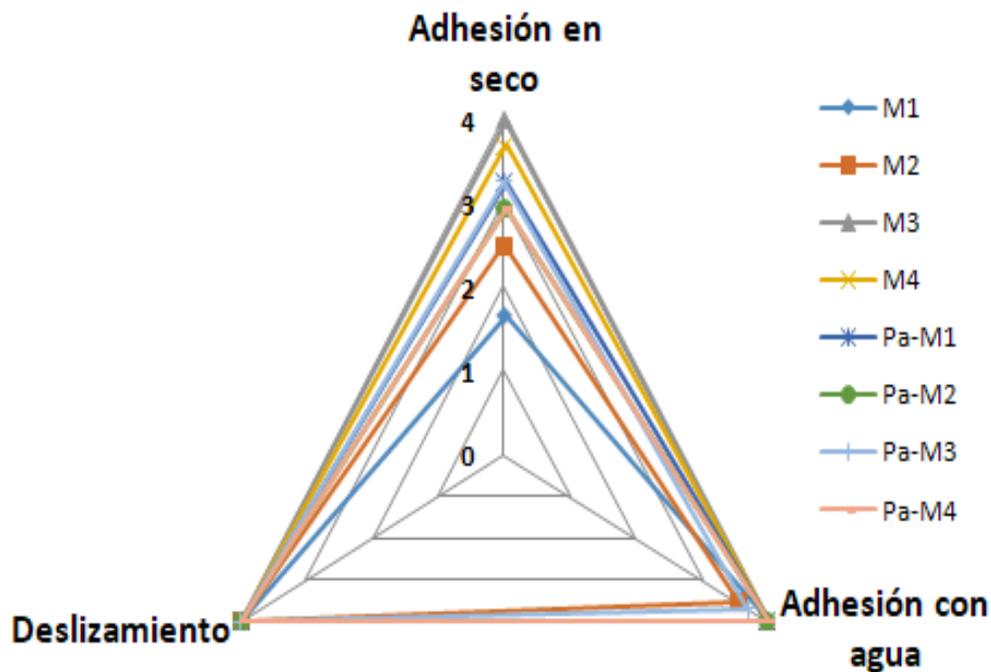


Figura 29. Evaluación sensorial de la adhesión de diferentes formulaciones de membranas.

De acuerdo con las Figuras 28 y 29, las membranas con puntaje más alto para adhesión en seco son M3 y M4 (4 y 3.7, respectivamente), ambas contienen PVP y ninguna contiene extracto de PM. Por el contrario, M1 y M2 tienen los puntajes más bajos (1.65 y 2.5, respectivamente) ambas membranas están hechas con PVA y tampoco contienen PM. Esto indica que las membranas con PVP son más adherentes que las elaboradas con PVA, aun cuando no cuentan con un medio húmedo en la piel. Al incorporar PM a las membranas M1 y M2 se observa que aumenta la adhesión en seco (Pa-M1 y Pa-M2); en contraste la adhesión de M3 y M4 disminuye al incorporar PM en la formulación, todas estas membranas con PM se mantienen dentro de valores cercanos de adhesión.

Una vez que se agrega agua se observa que aumenta la adhesión de todas las membranas, tanto así, que aun manteniendo el brazo de forma vertical, el apósito no se desliza sobre la piel.

De las ocho formulaciones evaluadas se eligieron Pa-M4 y M4, a esta última se le incorporó curcumina encapsulada en nanopartículas de policaprolactona (PCL). Se evaluaron las características fisicoquímicas de las nanopartículas de PCL cargadas con curcumina. Y las membranas (M4, Pa-M4y CNp-M4) fueron evaluadas con: microscopía óptica, transparencia y pruebas de permeación *ex vivo* e *in vivo*.

15. Segunda etapa

15.1 Caracterización de CNp

15.1.1 Evaluación del tamaño de partícula y potencial zeta

El promedio del tamaño de partícula y PDI de las nanopartículas de PCL cargadas con curcumina fue de 148.3 ± 1.9 nm y 0.044 ± 0.020 , respectivamente. Con estos valores se espera mejorar la permeación dérmica de CNp, ya que se ha reportado que nanopartículas con un tamaño menor a 500 nm tienen una mayor área superficial, lo que asegura el contacto directo con el EC y los surcos de la piel [66,112]. Además, el valor de PDI es menor a 0.1, indicando un tamaño de distribución pequeño en la muestra [93].

Por otra parte, el potencial zeta se utilizó para medir la carga y/o repulsión electrostática de las nanopartículas [81]. El valor obtenido fue de -7.32 ± 0.03 mV. La literatura indica que las nanopartículas son estables en suspensión con un potencial zeta por encima de ± 30 mV [94]. A pesar de que el resultado obtenido no está dentro de los valores establecidos en la literatura, se espera que las nanopartículas sean estables [71]. Debido a que se utilizó Poloxámero 188 como estabilizante, el cual provee estabilidad a las nanopartículas mediante repulsión estérica. Además, la carga negativa de CNp se debe al grupo carboxílico de la PCL [95], lo que podría favorecer la permeación de las nanopartículas en la piel [96].

15.1.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La morfología y tamaño de CNp fue evaluado mediante AFM. En este ensayo se corroboraron los resultados en la evaluación del tamaño de partícula y del potencial zeta (Figura 30), las nanopartículas obtenidas mostraron forma esférica de aproximadamente 200 nm sin aglomeración. Esto corrobora la idea de que las CNp obtenidas, al tener un tamaño nanométrico, podrán mejorar la permeación dérmica de la curcumina [66,116].

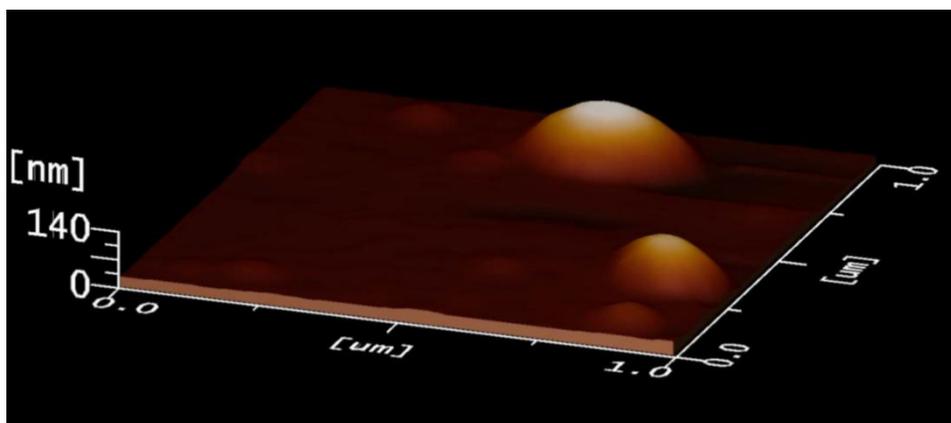


Figura 30. Topografía de CNp por AFM en 3D

15.1.3 Eficiencia de entrapamiento y porcentaje de carga

La eficiencia de entrapamiento (EE) y el porcentaje de carga (CN) fueron determinados con la finalidad de conocer la cantidad de curcumina entrapada dentro de las nanopartículas de PCL. Las CNp fueron obtenidas siguiendo el método de Del Prado Audelo [52], obteniéndose valores de $4.9 \pm 0.7 \%$ y $96.01 \pm 0.95 \%$, respectivamente. Estos resultados son los esperados, ya que en la literatura se sabe que el método de emulsificación-difusión presenta alta eficiencia de encapsulación (generalmente $>70 \%$) [68]. Por otra parte, CN depende de la estructura de las nanopartículas y de la metodología. Y, tanto CN como EE dependen de las interacciones entre el fármaco, la matriz y el medio [98].

15.2 Caracterización fisicoquímica

15.2.1 Análisis termogravimétrico (TGA) de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4

Es importante determinar las propiedades térmicas de una sustancia porque nos dan información para la identificación y caracterización de materiales. En la Figura 31, se presentan los termogramas de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4. En donde la pérdida de peso de curcumina se observa a $173 \text{ }^\circ\text{C}$, ésta se atribuye a la degradación del polvo turmérico; además, no se observó pérdida

de agua en la muestra, esto es debido al carácter hidrofóbico de la curcumina. Con respecto a CNp, la pérdida de peso inició aproximadamente en 90 °C, lo cual corresponde a la pérdida de agua de la muestra; una segunda meseta se observa de 280-350 °C demostrando mayor estabilidad en la curcumina al estar dentro de las nanopartículas de PCL que al estar sola. Sin embargo, CNp perdió más peso que la curcumina en un menor rango de temperatura.

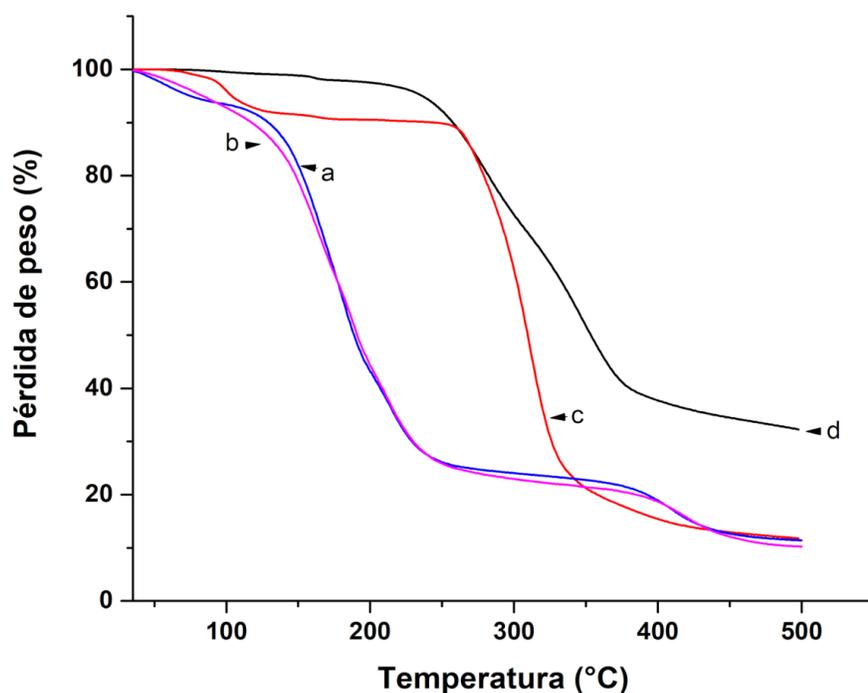


Figura 31. Propiedades térmicas de M4, CNp-M4, CNp y curcumina, representadas como a, b, c y d respectivamente, analizadas mediante TGA.

En general, se observa que CNp-M4 pierde ligeramente más peso que M4. En M4, la primera pérdida de peso ocurre entre 90-240 °C; mientras que para CNp-M4 fue entre 100-240 °C. Esto podría deberse a la evaporación de agua en las muestras, la degradación del propilenglicol, PVP, glicerina (150-220 °C) y del polvo turmérico [99]. La segunda pérdida de peso de M4 y CNp-M4 fue alrededor de 270-425 °C, en esta etapa se presenta la degradación de grupos funcionales del AS. Finalmente, la última meseta en M4 y CNp-M4 inicia en 425 °C, que corresponde a la degradación del esqueleto de AS [100]. Además,

se observa que CNp-M4 pierde más peso que CNp, ya que la membrana tiene mayor número de excipientes en su formulación que CNp.

15.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de curcumina, CNp, M4 y CNp-M4

La DSC es una técnica utilizada para determinar la cantidad de calor absorbido o liberado cuando las sustancias presentan cambios físicos o químicos [101]. En la Figura 32, se observan los termogramas de curcumina, CNp, membrana M4 (vehículo) y CNp-M4. El punto de fusión de la curcumina se observa a 174 °C (Tabla 15), el cual coincide con la literatura [86]. En CNp se observan tres eventos térmicos, a 63.5, 101 y 212 °C. El primer evento térmico podría corresponder al punto de fusión de PCL (61 °C) [102]. Mientras que 101 y 212 °C indican la presencia de D-(+)-trehalosa en la muestra, la cual es utilizada como crioprotector para liofilizar CNp [103]. Sin embargo, el punto de fusión de la curcumina no se detecta en la muestra de CNp, lo que podría deberse a la alta eficiencia de entrapamiento de curcumina dentro de las nanopartículas de PCL.

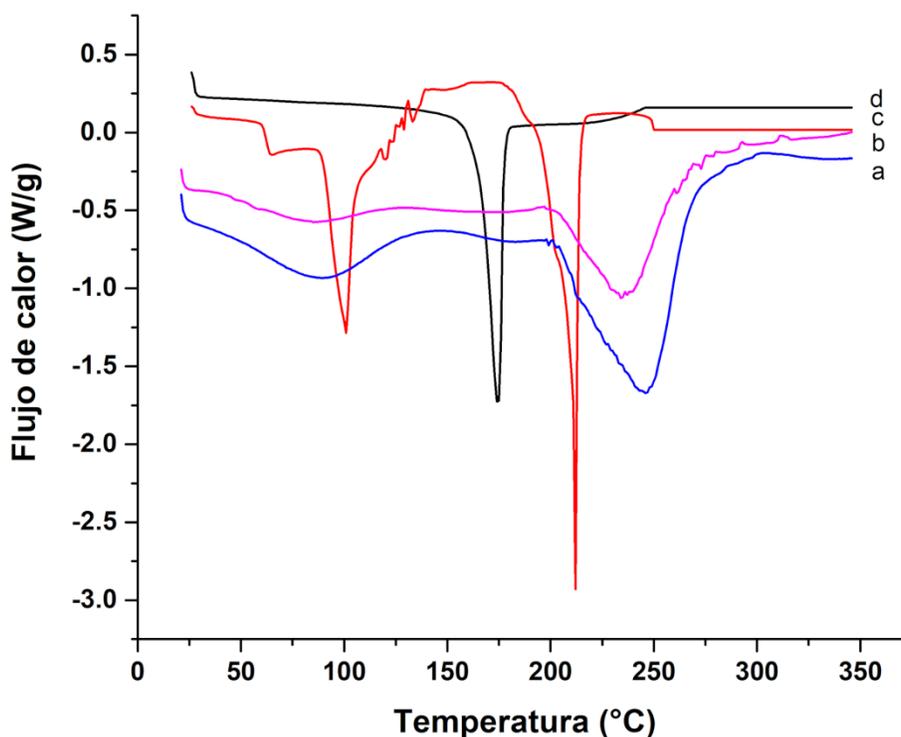


Figura 32. Propiedades térmicas de M4, CNp-M4, CNp y curcumina, representadas como a, b, c y d respectivamente, analizadas mediante DSC.

Por otra parte, M4 y CNp-M4 mostraron dos eventos endotérmicos, el primer pico para ambas muestras fue alrededor de 87 °C. El segundo pico fue alrededor de 233 y 249 °C para M4 y CNp-M4, respectivamente. El último pico indica la presencia de AS en la formulación. Además, ambas muestras presentaron un pico endotérmico antes de 100 °C lo que podría indicar la presencia de agua en las membranas.

Tabla 15. Eventos térmicos de curcumina, CNp y membranas de alginato mediante DSC

Muestra	T₁ (°C)	T₂ (°C)	T₃ (°C)
Curcumina	174	----	----
CNp	63.5	101	212
Vehículo	87	249	----
CNp-M4	87	233	----

15.2.3 Estructura y morfología de M4, Pa-M4, CNp-M4

Se espera que un andamio presente poros en su estructura para que transporte nutrientes, células, metabolitos y moléculas señalizadoras [104]. En la microscopia se observa que las membranas sólo presentan poros en la superficie (Figura 33). Sin embargo, se espera que al interactuar con el exudado de la herida se promueva la formación de poros que atraviesen la membrana. Esto podría permitir la transpiración, con la finalidad de crear un ambiente óptimo para la cicatrización de la herida.

Por otra parte, el promedio del número de poro por cada 0.234 mm^2 de superficie en M4, Pa-M4 y CNp-M4 fue 4, 3 y 2 respectivamente. Mientras que el diámetro de poro fue de 100.65 ± 20.56 , 108.40 ± 36.98 y $57.23 \pm 27.99 \mu\text{m}$ para M4, Pa-M4 y CNp-M4, respectivamente (Figura 34). Además, se observa que el diámetro de poro de CNp-M4 es significativamente más pequeño que M4 y Pa-M4. Así mismo, todas son significativamente diferentes entre sí con respecto al grosor y CNp-M4 presenta mayor grosor. Aunado a eso, Pa-M4 y CNp-M4 son más homogéneas en su estructura (Figura 33).

En el caso de CNp-M4 se puede atribuir a que en la formulación se utilizó como vehículo una dispersión de CNp, la cual contiene Poloxámero 188, que es un tensoactivo no iónico utilizado como estabilizante en las nanopartículas. Sin embargo, al ser un tensoactivo, disminuye la tensión superficial, dando como resultado la disminución significativa en el número y diámetro de poro [105].

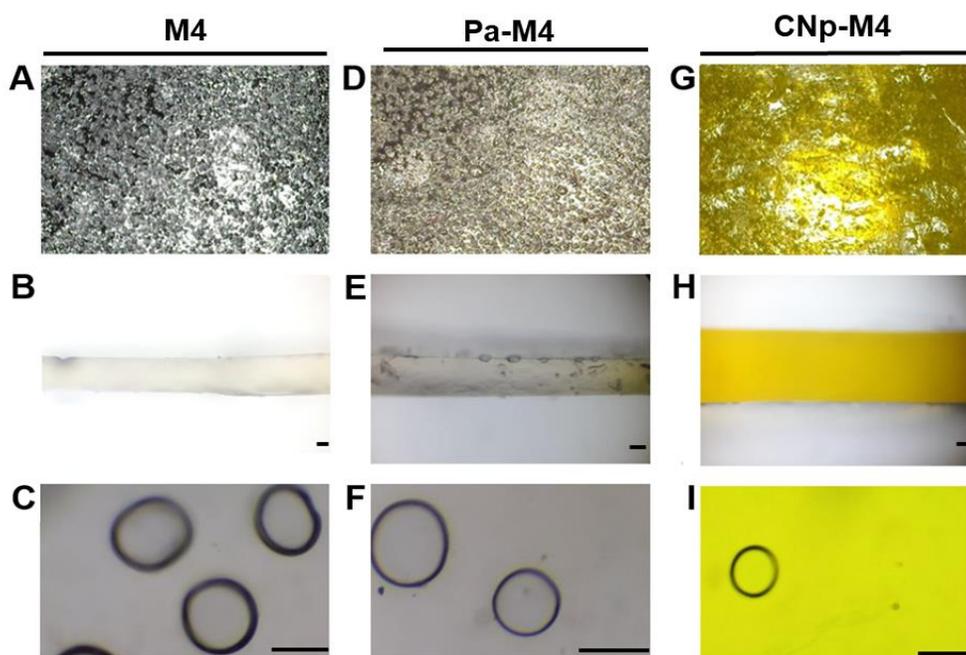


Figura 33. Fotografías de microscopía óptica de membranas de alginato. A, B y C muestran una membrana de alginato sin principio activo (vehículo), cortes transversal, longitudinal y transversal respectivamente. D, E y F muestran una membrana de alginato con extracto de Palo mulato, cortes transversal, longitudinal y transversal respectivamente. G, H e I muestran una membrana de alginato con CNp, cortes transversal, longitudinal y transversal respectivamente.

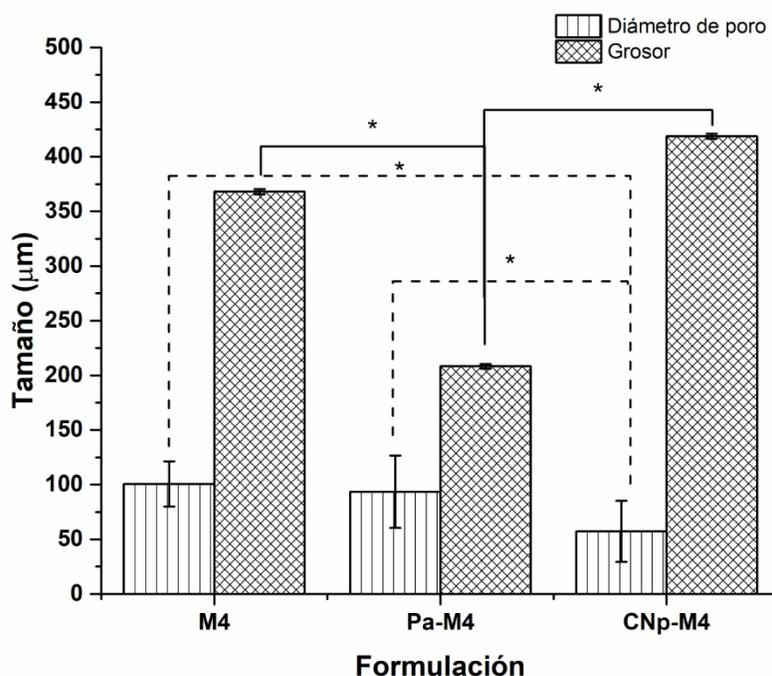


Figura 34. Diámetro de poro y grosor de membranas de alginato con respecto a la formulación utilizada.

De igual manera, es importante que las membranas permitan la observación de la herida a través de ellas, ya que así se evitará retirar la membrana para llevar el registro del proceso de cicatrización. En la Figura 35 se observa que las membranas M4 y Pa-M4 son transparentes antes y durante el proceso de hinchamiento, mientras que CNp-M4 se observa translúcida. A pesar de ello, es posible observar a través de las tres formulaciones de membranas, lo que podrá permitir el monitoreo de la lesión.

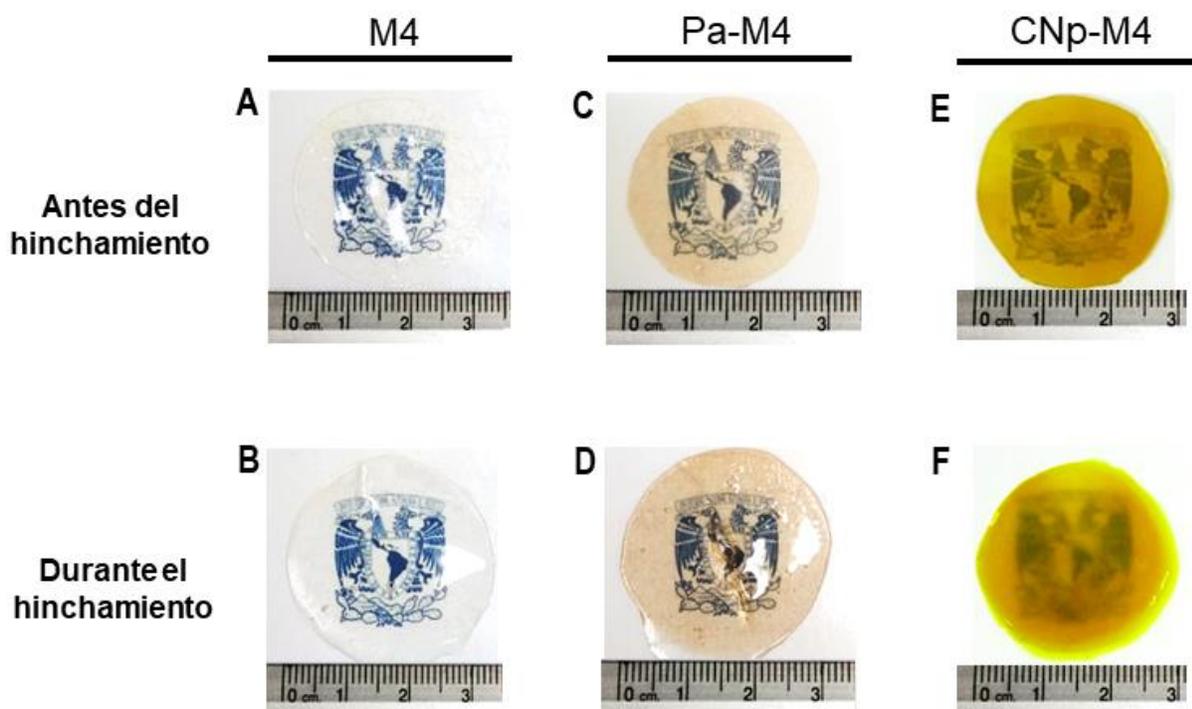


Figura 35. Membranas de alginato (M4) antes y durante el proceso de hinchamiento por la adición de PBS (A y B, respectivamente), membranas de alginato con Palo Mulato (Pa-M4) antes y durante el proceso de hinchamiento por la adición de PBS (C y D, respectivamente) y membranas de alginato con nanopartículas con curcumina (CNp-M4) antes y durante el proceso de hinchamiento (E y F, respectivamente). La escala de todas las imágenes se encuentra en centímetros.

15.3 Ensayos de liberación

Debido a que la corteza de Palo mulato contiene diversas moléculas que en conjunto ejercen su actividad terapéutica, no se realizó el seguimiento de cada una de éstas. En su lugar, se introdujo curcumina encapsulada en nanopartículas (CNp) a la formulación seleccionada para evaluar que el principio activo llegue al sitio de acción desde las membranas.

15.3.1 Estudio de liberación *in vitro*

Para analizar el mecanismo de liberación del fármaco encapsulado en las nanopartículas y a su vez, cuando estas se encuentran dentro de la membrana, se llevó a cabo un estudio de liberación *in vitro* mediante el método de dispersión. En la Figura 36, se observa que CNp muestra un efecto *burst* (liberación rápida del principio activo) a las 2 h, este comportamiento se debe tanto a la presencia de curcumina que se libera de las nanopartículas, como a los residuos de curcumina en la parte externa de las nanopartículas, esto es, entre el polímero y el estabilizante. El perfil mostró un comportamiento lineal, liberando casi el 60 % de curcumina después de 48 h.

Por el contrario, la membrana CNp-M4 no muestra el efecto *burst* y se observa una liberación más rápida, 80 % a las 48 h. Este comportamiento se debe a la interacción entre los excipientes de la membrana, disolventes y nanopartículas. Además, en la elaboración de las membranas CNp-M4, las nanopartículas están en contacto con agua y por tanto, la hidrólisis de CNp podría ser estimulada, dando como resultado la liberación de curcumina de las nanopartículas de PCL. También, algunos excipientes, como glicerina y propilenglicol al ser liposolubles pueden mejorar la solubilidad de la curcumina. Como se puede observar, la liberación de curcumina de la membrana CNp-M4 fue lenta, y fue aún más lenta para CNp, comparándolos con la dispersión de curcumina.

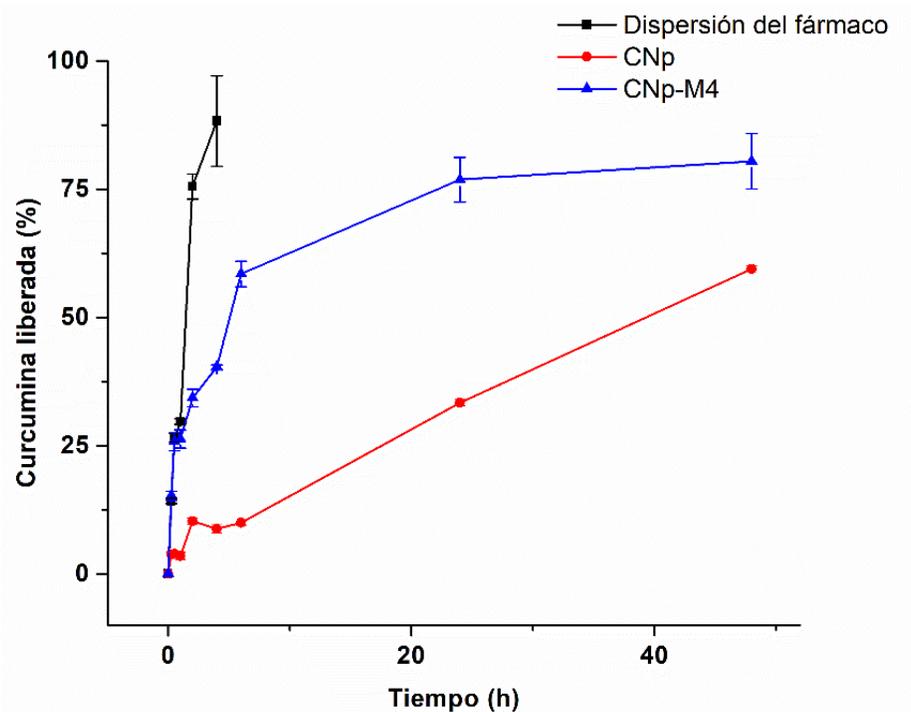


Figura 36. Perfil de liberación de curcumina desde una dispersión del fármaco en agua, nanopartículas cargadas de curcumina (CNp) y una membrana de alginato con nanopartículas cargadas de curcumina (CNp-M4) en PBS pH 7.4 (0.1 M, Pluronic® F-127 2 % p/v) a 37 °C. Cada punto representa la media \pm EE, n = 3.

Con el objetivo de investigar el mecanismo de liberación de la curcumina desde CNp y la membrana CNp-M4, se aplicaron diferentes modelos matemáticos (Tabla 16). Los datos obtenidos de la liberación de CNp se ajustaron al modelo Higuchi ($A=0.0852$, $B=-0.0459$, $R^2=0.9551$), de acuerdo con lo reportado anteriormente. Este modelo describe la liberación de la curcumina mediante la difusión del centro de las nanopartículas hacia la solución. Por otra parte, la liberación de curcumina desde la membrana CNp-M4 podría ser explicado con el modelo Korsmeyer-Peppas, ya que el coeficiente de correlación al cuadrado más alto se obtuvo al ajustarlo a ese modelo ($A=0.3119$, $B=-0.5609$, $R^2=0.9536$). Este modelo combina el mecanismo de difusión y erosión de las nanopartículas para explicar la liberación del fármaco.

Tabla 16. Coeficientes de correlación al cuadrado (R^2) y coeficientes obtenidos después de la regresión lineal de los datos de liberación de CNp y de la membrana CNp-M4 utilizando cuatro modelos matemáticos.

Modelo Matemático	Ecuación	CNp			CNp-M4		
		R ²	A	B	R ²	A	B
Orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0t$	0.8420	0.5264	4.7385	0.7358	1.2362	31.432
Primer orden	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1t$	0.8436	-0.0066	-2.3991	0.8453	-0.0303	-3.1975
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$	0.9551	0.0852	-0.0459	0.8939	0.1017	0.194
Korsmeyer-Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_K t^n$	0.9037	0.5422	-1.2655	0.9536	0.3119	-0.5609

En donde Q_t : cantidad de fármaco liberada a un tiempo determinado; Q_0 : cantidad inicial de fármaco en la forma farmacéutica; Q_∞ : cantidad total de fármaco disuelto cuando la forma farmacéutica ha sido desintegrada; K_0 , K_1 , K_H , K_K : constantes de velocidad de liberación; R^2 : coeficiente de correlación al cuadrado. $y = ax \pm b$ es la ecuación obtenida después de la regresión: a , pendiente y b , coeficiente lineal.

15.4 Ensayos de permeación

15.4.1 Estudio de permeación *ex vivo*

Para lograr que un principio activo ejerza su efecto sobre su diana terapéutica, es necesario que sea liberado de la forma farmacéutica y llegue a su sitio de acción.

Un sistema ideal para su potencial uso en enfermedades crónicas como heridas o psoriasis con un proceso de curación lento, debe permitir la liberación sostenida para que el fármaco penetre a través de la piel [4]. Cuando existe un daño en la piel, la barrera cutánea es más susceptible a la permeación de fármacos por sistemas de liberación tales como las nanopartículas [106].

Se realizó un estudio *ex vivo* para determinar la permeación de las CNp en el estrato córneo, la epidermis y la dermis. Además de verificar si estas son

capaces de atravesar la piel y llegar a la circulación sanguínea desde la membrana CNp-M4, la dispersión de CNp y la dispersión de curcumina en agua al 0.01 %, permitiéndonos además controlar las condiciones del experimento [107].

Mediante un análisis de varianza se determinó la diferencia en la concentración de curcumina entre la dispersión de CNp y la membrana CNp-M4, después de colocar cada tratamiento durante 30 h en piel de cerdo. La mayor diferencia en la concentración de curcumina se registró para EC, $p = 0.0009$. De acuerdo a la Figura 37 se muestra que en las tres evaluaciones existe diferencia significativa en la concentración de curcumina entre la dispersión de CNp y la membrana CNp-M4. El tratamiento con la membrana CNp-M4 mostró la mayor cantidad de curcumina retenida en la epidermis + dermis, $5.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1.620 ± 0.051 % de la concentración total de curcumina), una menor concentración de curcumina se encontró en el estrato córneo $0.65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0.140 ± 0.006 %). Por el contrario, en el tratamiento de dispersión de CNp, la curcumina se extrajo principalmente del estrato córneo $14.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (2.62 ± 0.49 %) [96], sitio en donde se encontró la mayor concentración de todo el ensayo, mientras que en epidermis + dermis se retuvo el 1.97 ± 0.16 %.

También existe diferencia en la cantidad de curcumina que atraviesa la piel (que en un modelo *in vivo* significa la llegada a circulación sistémica), en donde se observa que la concentración proveniente de la membrana CNp-M4 es significativamente menor que en la dispersión de CNp (0.12 % y 2.04 % respectivamente), resultado esperado para el fin de un medicamento tópico de liberación prolongada.

Con respecto a la dispersión acuosa de curcumina (Figura 37), debido al alto carácter lipófilo del fármaco, se observa una alta acumulación en las capas

superficiales del EC ($10.04 \pm 1.73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). De manera interesante, la permeación comprende una cantidad considerable, aun cuando la curcumina puede encontrarse aglomerada en partículas sólidas al estar en dispersión acuosa. Esto significa que las partículas de fármaco se involucran en un proceso de disolución con los componentes oleosos del estrato córneo, para dar paso a su breve permeación en la región superficial. Aunque los valores son altos, hay una mayor eficiencia de permeación con las CNp. En la región de la dermis y epidermis (de carácter hidrófilo), la cantidad permeada de la dispersión del fármaco disminuye considerablemente debido a su limitada solubilidad en medios acuosos ($2.40 \pm 0.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), casi un tercio en relación con el valor de las CNp ($6.99 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). En cuanto al nivel sistémico dentro del ensayo, no se detectó curcumina proveniente de la dispersión del fármaco en agua.

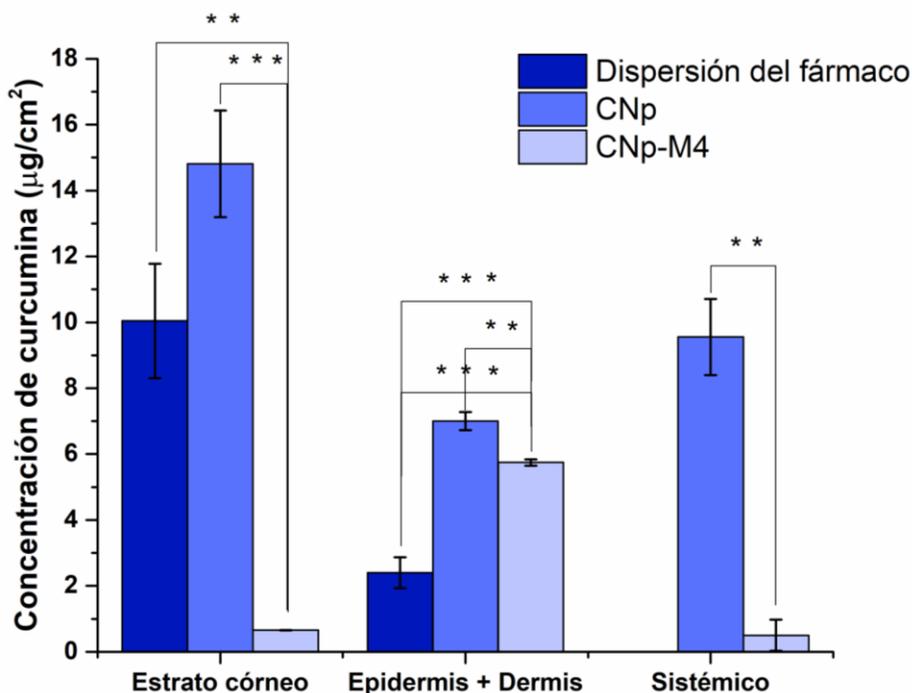


Figura 37. Permeación *ex vivo* de curcumina después de 30 h de tratamiento desde una dispersión de curcumina en agua, dispersión de CNp o membrana CNp-M4. Estrato córneo: partículas ligadas al estrato córneo obtenidas a partir de 15 tiras de cinta. Epidermis + dermis: superficie sobre la cual se dosificó el tratamiento durante 30 h. Sistémico: compartimiento receptor. (Media \pm EE, n = 4), ** indica $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, estadísticamente significativo.

El sistema acuoso de la dispersión de CNp permitió que la curcumina permeara a través de la dermis y cruzara por completo la piel. Además, la carga negativa de las CNp favorece su permeación a través de la piel, ya que el estrato córneo presenta carga negativa también; por ello, la difusión es favorecida en comparación con partículas que presenten carga positiva [96]. Por el contrario, la curcumina de la membrana CNp-M4 difunde lentamente, esto puede explicarse debido a que en la dispersión de CNp, el agua se utiliza como medio de difusión. El agua afecta la velocidad de absorción de diferentes sustancias a través del EC, ya que éste está en un estado constante de hidratación parcial bajo condiciones normales. Cuando la piel se sumerge en agua, los queratinocitos muertos absorben rápidamente el agua, resultando el *pruning effect* (la piel se arruga como pasa). Además, se crea un gradiente de flujo hacia las capas internas de la piel ya que estas se encuentran más hidratadas que la superficie del EC [108].

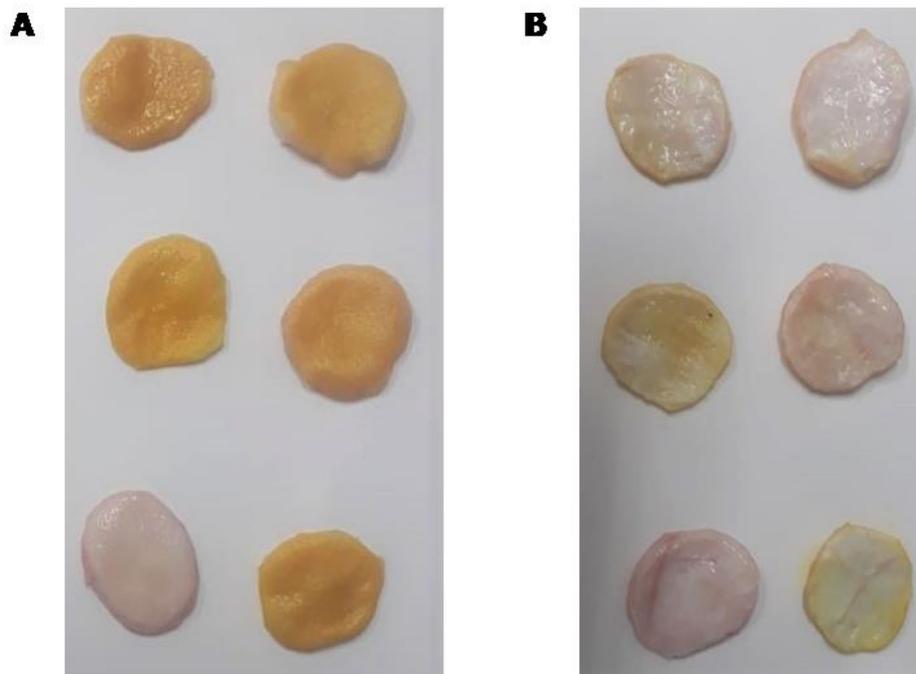


Figura 38. Piel de cerdo después de 30 horas de tratamiento con dispersión de CNp. A. Parte superior de la piel de cerdo y B. Parte inferior de la piel de cerdo.

Por otra parte, la piel tiene surcos en donde se retiene una cantidad considerable de curcumina, que no fue extraída con la aplicación de cintas adhesivas (Figura 38) [109]. Esta curcumina se cuantificó hasta la disgregación mecánica, como parte de la curcumina absorbida en el interior de la epidermis y la dermis. La membrana CNp-M4 no tiene un medio líquido en la interfaz que permita que las nanopartículas fluyan fácilmente hacia las capas profundas, como el agua en caso de dispersión de CNp. Además de la presencia de surcos de la piel explica por qué la epidermis y la dermis tienen la mayor concentración de fármaco. Incluso, para la membrana CNp-M4 se espera una liberación modulada debido al hinchamiento de la membrana a causa de la presencia de exudado. La hinchazón permitiría la relajación de las cadenas de polímero, y la liberación de las CNp. De lo contrario, se esperaría una difusión de un estado sólido (CNp-M4) a un estado semisólido (la piel). Por estas razones, la membrana CNp-M4 representa un sistema de liberación prolongada.

Es importante que las nanopartículas tengan un tamaño pequeño, ya que de esta manera pueden penetrar a través de las barreras fisiológicas, debido también a que su mayor área de superficie favorece la liberación del medicamento. Lo anterior hace que el tamaño de partícula sea un factor importante para obtener el efecto terapéutico [70]. Las nanopartículas poliméricas como CNp con su tamaño pequeño (148.3 nm) y el efecto surfactante del Poloxámero 188 pueden penetrar intercelularmente y a través de los folículos pilosos, lo que favorece la acumulación durante varias horas. Del mismo modo, debido al contacto de las nanopartículas con los corneocitos de la piel, así como a la liberación prolongada de las mismas, se encontró una gran cantidad de curcumina retenida en la dermis [66,125]. Al final de las 30 h, la mayoría de la curcumina permaneció en el EC cuando se aplicó la dispersión de CNp, el monitoreo de la permeación en tiempos más prolongados permitiría observar un sistema de liberación prolongada. Por lo

tanto, la membrana CNp-M4 se propone como un sistema funcional de liberación prolongada para la administración de fármacos en enfermedades crónicas.

15.4.2 Estudio de permeación *in vivo*

Para que la curcumina ejerza su efecto, es importante asegurarse que permee a través de la piel. El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la permeación *in vivo* de curcumina al utilizar una membrana CNp-M4, dispersión de CNp y dispersión de curcumina al 0.01 % en agua. Para ello, se cuantificó la curcumina depositada en el EC. En donde se observa que después de 6 h de mantener el tratamiento en la piel, la concentración de curcumina fue de $9.82 \pm 4.23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $18.96 \pm 1.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $33.09 \pm 2.57 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, considerando su EE, al utilizar CNp-M4, la dispersión de CNp y la dispersión de curcumina al 0.01 % en agua respectivamente.

Los resultados mostrados en la Figura 39 se presentan de acuerdo a lo reportado por Goto Norio, 2016 [110]. Se observaron valores de permeación más altos para la dispersión del fármaco en agua en comparación con la dispersión CNp y la membrana CNp-M4, al menos en las capas superficiales del estrato córneo, donde se aplica la técnica de *Tape Stripping*. Los valores más altos de permeación del fármaco podrían corresponder al bajo peso molecular y sobre todo a la alta lipofilidad de la curcumina; ya que al ser insoluble en agua, ésta sedimentó durante la aplicación del tratamiento, depositándose en el EC. Estos valores coinciden con la Figura 38, a mayor deposición del fármaco en la superficie del estrato córneo habrá una menor proporción en la dermis y epidermis debido a un equilibrio hidrofílico-lipofílico inadecuado.

Se registró una mayor cantidad de curcumina en el estrato córneo cuando se aplicó el tratamiento de dispersión de CNp, en comparación con la membrana

CNp-M4. Esto se debe a que en el caso de la membrana CNp-M4, las nanopartículas deben liberarse de la matriz polimérica. Este resultado sugiere a nuestra formulación como un sistema de liberación prolongada que puede ser útil para tratamientos largos, como el de una herida (por ejemplo, durante 7 a 14 días de aplicación hasta el cierre de la lesión). Es de destacar que la variación más pequeña observada en los valores de permeación con el tratamiento de la membrana CNp-M4 revela un sistema que permite una mejor liberación controlada que además es gradual.

Las nanopartículas poseen un estabilizante en la parte exterior, Poloxámero 188, el cual interactúa mediante puentes de hidrógeno con los grupos OH de los plastificantes y polímeros utilizados en la formulación y al agregar agua a la membrana, las regiones externas del polímero comienzan a hincharse permitiendo que las CNp se desplacen hacia afuera, promoviendo su liberación [111].

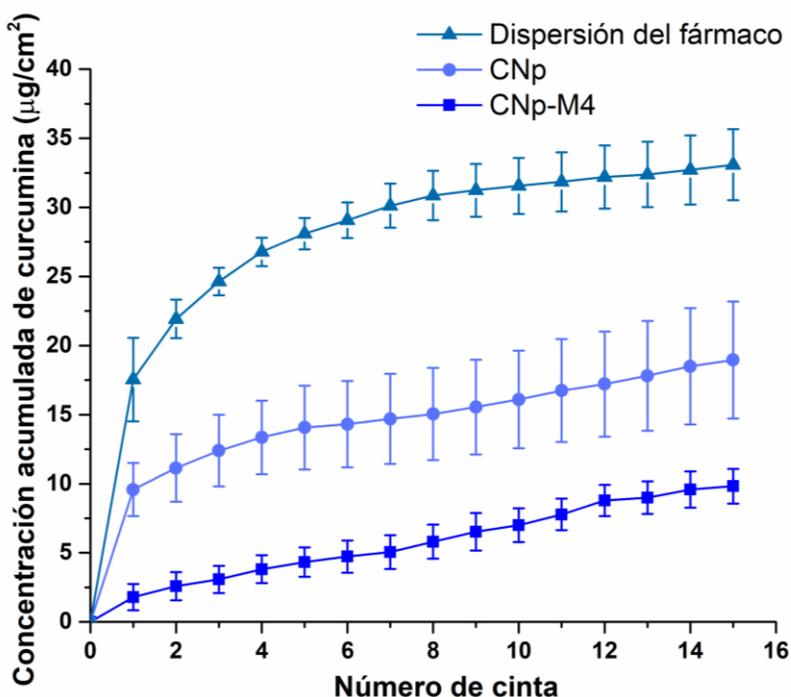


Figura 39. Concentración acumulada de curcumina en el estrato córneo de voluntarios sanos extraída de 15 cintas adhesivas aplicadas sobre el sitio de tratamiento después de colocar membrana CNp-M4, una dispersión de CNp y una dispersión de curcumina al 0.01 % en agua por 6 h (media ± EE, n=4).

Además, en la dispersión de CNp, las nanopartículas se encuentran libres en el medio, por lo que interactúan con mayor facilidad con el estrato EC.

La curcumina está encapsulada y uniformemente distribuida en nanopartículas de PCL, formando nanoesferas [67], la liberación de ésta depende de la solubilidad del fármaco, la desorción de la curcumina con la PCL, la difusión del fármaco a través de la matriz de las nanopartículas, la erosión de la matriz de las nanopartículas o degradación y la combinación de los procesos de erosión y difusión [94].

En condiciones fisiológicas ocurre la escisión aleatoria de enlaces éster de PCL, lo que produce la desestabilización de la matriz polimérica de las CNp, dentro de las cuales se encuentra la curcumina, induciendo su liberación (Figura 40) [95].

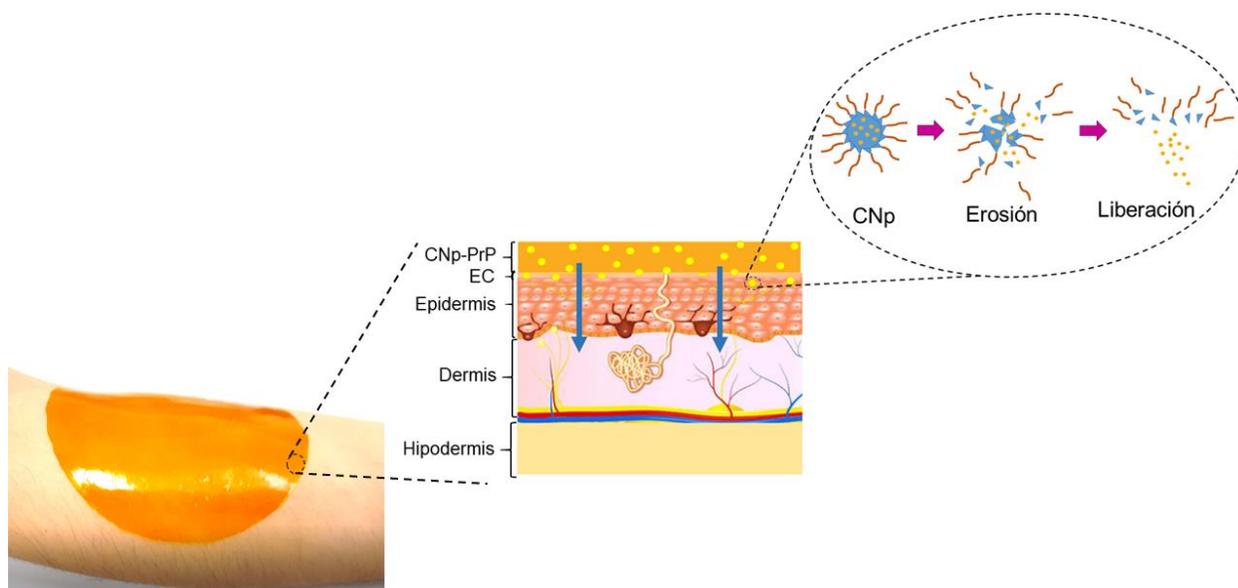


Figura 40. Esquema de la liberación de nanopartículas de PCL cargadas con curcumina desde la membrana CNp-M4 hacia el estrato córneo y la liberación de curcumina mediante la erosión de las nanopartículas de PCL.

Diversos estudios publicados en la literatura han demostrado una acumulación de nanopartículas en los folículos pilosos y las glándulas pilosebáceas en ensayos *ex vivo* [106]. De la misma manera, se ha informado que hay una mejor permeación del fármaco en la piel, así como una mayor absorción en áreas con alta densidad de folículos pilosos. El folículo piloso puede convertirse en un depósito de sustancias, siendo comparable con el EC [112]. Lo anterior significa que los fármacos permearán mejor a través de la piel de las personas con mayor cantidad de folículo piloso. Esto explica los resultados obtenidos, junto con la variabilidad entre individuos (edad, masa corporal, color y humectación de la piel).

El uso de nanopartículas mejora el transporte de fármacos a través de la piel, asegurando el contacto directo con el estrato córneo y los pliegues de la piel, además de controlar la liberación del fármaco y protegerlo de inestabilidades químicas y físicas [113].

VIII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvieron membranas de alginato con productos naturales. La membrana M4 presentó buenas propiedades mecánicas, así como adhesión en piel humana, lo que favorece su manipulación. Además, se observó un porcentaje de hinchamiento adecuado, demostrando su capacidad para absorber el exudado de una herida manteniendo al mismo tiempo la humedad. Por lo que fue seleccionada para la incorporación de CNp.

Las CNp se sintetizaron de manera eficaz, obteniéndose nanopartículas de forma esférica y un tamaño inferior a 200 nm.

Las membranas M4, Pa-M4 y CNp-M4 presentaron poros en su estructura, por lo que permitirían la transpiración de la herida; además se demostró que son

translucidas aún al hincharse, por lo que se puede revisar el proceso de cicatrización sin necesidad de retirarlas.

De acuerdo con el ensayo de liberación *in vitro*, la curcumina proveniente de la membrana CNp-M4 se libera por un proceso de difusión y erosión de las nanopartículas. Así mismo, con los ensayos de permeación *in vivo* y *ex vivo* se demostró que las CNp permean la piel y liberan de manera prolongada la curcumina. Por lo que, al ser colocadas sobre una herida, se espera que la curcumina ejerza su actividad cicatrizante, antiinflamatoria y antioxidante.

En conjunto estas características hacen que las membranas elegidas tengan potencial uso como apósitos en el tratamiento de heridas agudas y crónicas.

IX. REFERENCIAS

1. Kolarsick, P.A.J.; Kolarsick, M.A.; Goodwin, C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J. Dermatol. Nurses. Assoc.* **2011**, *3*, 203–213.
2. Salem Z., C.; Pérez P., J.A.; Henning L., E.; Uherek P., F.; Schultz O., C.; Butte B., J.M.; González F., P. Heridas: Conceptos generales. *Cuad. Cirugía* **2000**, *14*, 90–99.
3. Vela-Anaya, G.; Stegensek-Mejía, M.; Lejía-Hernández, C. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc.* **2018**, *26*, 105–114.
4. Tortora, G.J.; Derrickson, B. *Principles of Anatomy and Phisiology*; 12va ed.; Wiley: United States, 2009.
5. Anatomía y fisiología de la piel. Recuperado el 20 de marzo de 2018 de: <https://clasestetica.wordpress.com/2015/01/14/anatomia-y-fisiologia-de-la-piel/>.
6. Estratos de la epidermis. Recuperado el 20 de marzo de 2018: <https://tustareas.lat/index.php/biologia/item/5712-capas-de-la-epidermis-estrato-basal>.
7. Buendía Eisman, A.; Mazuecos Blanca, J.; Camacho Martínez, F. Anatomía y fisiología de la piel. *Manual de dermatología*; 2018; Vol. 1, pp. 2–27.
8. Galliano, S.; Cesario, C. Piel. Recuperado el 23 de marzo de 2018 de: [https://www.cemic.edu.ar/descargas/repositorio/2Guia 15 Piel.pdf](https://www.cemic.edu.ar/descargas/repositorio/2Guia%2015%20Piel.pdf).
9. Merino Pérez, J.; Borge, N.; La piel: Estructura y funciones. *Fisiología general*; Universidad de Cantabria; Vol. n.a., pp. 1–7.
10. Navarrete Franco, G. Histología de la piel. *Rev. la Fac. Med. UNAM* **2003**, *46*, 130–133.
11. Jones, E.M.; Cochrane, C.A.; Percival, S.L. The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. *Adv. wound care* **2015**, *4*, 431–439.
12. Pérez Ferrer, A. *Medicina transfusional*; Editorial Médica Panamericana: Madrid, 2010, 83-90.
13. Bielsa Marsol, I. Proceso de cicatrización de las heridas. *Piel* **2006**, *21*, 207–212.
14. Senet, P. Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC - Dermatología* **2011**, *42*, 1–10.

15. Velnar T; Bailey T; Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* **2009**, *37*, 1528–1542.
16. Engeland, C.G.; Gajendrareddy, P.K. Wound Healing in the Elderly. *Cardiothoracic Surgery in the Elderly*; 2011; pp. 259–270.
17. Panzarasa, G.; Osypova, A.; Toncelli, C.; Buhmann, M.T.; Rottmar, M.; Ren, Q.; Maniura-weber, K.; Rossi, R.M.; Boesel, L.F. The pyranine-benzalkonium ion pair: A promising fluorescent system for the ratiometric detection of wound pH. *Sensors Actuators B. Chem.* **2017**, *249*, 156–160.
18. Procedimientos de curación. Recuperado el 22 de junio de 2019 de: <http://www6.uc.cl/manejoheridas/html/aposito.html?fbclid=IwAR0mYNXNMk-vUjpl9BM6ksof4S3JX70VzdPxjEOiSYNpO3TMe6zhoAs46VM>.
19. Fletcher J, Moore Z, Anderson I, M.K. Pressure ulcers and Hydrocolloids. Made Easy. Wounds International. Recuperado el 26 de junio de 2019: http://www.woundsinternational.com/pdf/content_10143.pdf.
20. Arredondo Peñaranda, A.; Londoño López, M. Hidrogeles: Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Rev. Ing. Biomédica* **2009**, *3*, 83–94.
21. Benedí, J.; Romero, C. Apósitos. *Farm. Prof.* **2006**, *20*, 52–56.
22. Ramírez Jaime, A. Membranas compuestas base polimérica: preparación, caracterización y estudios para la separación de gases, Centro de Investigación en Química Aplicada, 2013.
23. Stamatialis, D.F.; Papenburg, B.J.; Gironés, M.; Saiful, S.; Bettahalli, S.N.M.; Schmitmeier, S.; Wessling, M. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science.* **2008**, *308*, 1–34.
24. Karki, S.; Kim, H.; Na, S.; Shin, D.; Jo, K.; Lee, J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **2016**, *11*, 559–574.
25. Aravamudhan, A.; Ramos, D.M.; Nada, A.A.; Kumbar, S.G. *Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications*; Elsevier Inc., 2014.
26. Mogoşanu, G.D.; Grumezescu, A.M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int. J. Pharm.* **2014**, *463*, 127–136.
27. Chalovich, J.M.; Eisenberg, E. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Sci. China Chem.* **2014**,

- 57, 490–500.
28. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; Rowe C, R., Sheskey, P.J., Quinn, M.E., Eds.; Sixth.; Pharmaceutical Press: Washington, 2009.
 29. Álvarez Cuesta, A.M.; Monsalve Fredy, J.F.; Correa Mesa, M.; Vélez Zapata, A.Ma.; Trujillo Roldán, M.A.; Roldán, T.; María, A.; Alvarez, C.; Fredy, J.; Gil, M. *Estrategias de cultivo en la producción de alginatos por Azotobacter vinelandii*. Universidad Nacional de Colombia, 1-8.
 30. Boateng, J.; Burgos-Amador, R.; Okeke, O.; Pawar, H. Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *79*, 63–71.
 31. Avendaño Romero, G.C.; López Malo, A.; Palou, E. *Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos*; Temas Sel. Ing Aliment, Vol. 1, pp-87-96, 2013.
 32. Salud, E.P. De *Hoja de datos de seguridad*; 2018; pp. 1–4.
 33. Golafshan, N.; Rezasani, R.; Tarkesh Esfahani, M.; Kharaziha, M.; Khorasani, S.N. Nanohybrid hydrogels of Iaponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *176*, 392–401.
 34. Rubio-Elizalde, I.; Bernáldez-Sarabia, J.; Moreno-Ulloa, A.; Juárez, P.; Vilanova, C.; Licea Navarro, A.; Castro Ceeña, A.B.; Moreno-Ulloa, A.; Castro-Ceseña, A.B. Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *206*, 455–467.
 35. Povidone. Recuperado el 23 de junio de 2019 de: https://www.jrspharma.com/pharma_en/products-services/excipients/new-povidone-family/vivapharm-pvp/.
 36. Polyvinylpyrrolidone. Recuperado el 22 de junio de 2019 de: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4209342.htm.
 37. Ciobanu, C.S.; Massuyeau, F.; Constantin, L.V.; Predoi, D. Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100 °C. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 613.
 38. DeMerlis, C.C.; Schoneker, D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chemical Toxicol.* **2003**, *41*, 319–326.
 39. Singh, B.; Pal, L. Radiation crosslinking polymerization of sterculia polysaccharide-PVA-PVP for making hydrogel wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48*, 501–510.

40. Mansour, L.M.; Taj Bakhsh, M.; Mokhtari, M. Synthesis and swelling characterization of cross-linked PVP/PVA hydrogels. *Iran. Polym. J.* **2005**, *14*, 1022–1030.
41. Poly(vinyl alcohol). Recuperada el 4 de junio de 2019 de: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/81381?lang=es®ion=MX>
42. Chang, I.S.; Kim, C. Il; Nam, B.U. The influence of poly-vinyl-alcohol (PVA) characteristics on the physical stability of encapsulated immobilization media for advanced wastewater treatment. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 3050–3054.
43. Domínguez Gómez, A.A. Preparación de membranas poliméricas de PVA reticuladas con ácidos dicarboxílicos alifáticos, empleadas en el proceso de pervaporación. Universidad Nacional Autónoma de México, 2018.
44. DeMerlis, C.C.; Schoneker, D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 319–326.
45. Vieira Adeodato, M.G.; Da Silva, M.A.; Dos Santos, L.O.; Beppu Masumi, M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 254–263.
46. Shavandi, A.; Bekhit, A.E.D.A.; Ali, M.A.; Sun, Z.; Gould, M. Development and characterization of hydroxyapatite/ β -TCP/chitosan composites for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *56*, 481–493.
47. Widiyanti, P.; Setyadi, E.D.; Rudyardjo, D.I. Collagen-chitosan scaffold - Lauric acid plasticizer for skin tissue engineering on burn cases. *AIP Conf. Proc.* **2017**, *1817*.
48. Tian, H.; Liu, D.; Yao, Y.; Ma, S.; Zhang, X.; Xiang, A. Effect of Sorbitol Plasticizer on the Structure and Properties of Melt Processed Polyvinyl Alcohol Films. *J. Food Sci.* **2017**, *82*, 2926–2932.
49. Khairunnisa, S.; Rostini, I. The effect of glycerol concentration as a plasticizer on edible films made from alginate towards its physical characteristic. *World Sci. News.* **2018**, *112*, 130–141.
50. Widiasanti, A.; Lenyta Ginting, A.M.; Asyifani, E.; Nurjanah, S. The production of paper soaps from coconut oil and Virgin Coconut Oil (VCO) with the addition of glycerine as plasticizer. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2018**, *141*.
51. Meaney, P.M.; Fox, C.J.; Geimer, S.D.; Paulsen, K.D. Electrical Characterization of Glycerin: Water Mixtures: Implications for Use as a

- Coupling Medium in Microwave Tomography. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* **2017**, *65*, 1471–1478.
52. Del Prado-Audelo, M.L.; Caballero-Florán, I.H.; Meza-Toledo, J.A.; Mendoza-Muñoz, N.; González-Torres, M.; Florán, B.; Cortés, H.; Leyva-Gómez, G. Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. *Biomolecules*. **2019**, *9*, 1-28.
 53. Amorim, J.L.; de Barros Figueiredo, J.; Fernandes Amaral, A.C.; Gouvêa de Oliveira Barros, E.; Palmero, C.; Athana MPalantinos, M.; de Souza Ramos, A.; Pinto Ferreira, J.L.; Rocha de Andrade Silva, J.; Benjamim, C.F.; et al. Wound healing properties of *Copaifera paupera* in diabetic mice. *PLoS One*. **2017**, *12*, 1–15.
 54. Napavichayanun, S.; Aramwit, P. Effect of animal products and extracts on wound healing promotion in topical applications: a review. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2017**, *28*, 703–729.
 55. Pangestuti, R.; Arifin, Z. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *J. Tradit. Complement. Med.* **2017**, *8*, 341–351.
 56. Da Silva, S.M.M.; Costa, C.R.R.; Gelfuso, G.M.; Guerra, E.N.S.; De Medeiros Nóbrega, Y.K.; Gomes, S.M.; Pic-Taylor, A.; Fonseca-Bazzo, Y.M.; Silveira, D.; De Oliveira Magalhães, P. Wound healing effect of essential oil extracted from eugenia dysenterica DC (Myrtaceae) leaves. *Molecules* **2019**, *24*, 1–16.
 57. Serrano-Parrales, R.; Vázquez-Cruz, B.; Segura-Cobos, D.; Anaya-Lang, A.L.; Jiménez-Estrada, M.; Canales-Martínez, M. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México): Implications for cutaneous wound healing. *J. Med. plants Res.* **2013**, *6*, 5609–5615.
 58. Canales-Martínez, M.; Rivera-Yañez, C.R.; Salas-Oropeza, J.; Lopez, H.R.; Jimenez-Estrada, M.; Rosas-Lopez, R.; Duran, D.A.; Flores, C.; Hernandez, L.B.; Rodriguez-Monroy, M.A. Antimicrobial Activity of *Bursera Morelensis* Ramírez Essential Oil. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2017**, *14*, 74–82.
 59. Carrera Martínez, C.A.; Rosas López, R.; Rodríguez Monroy, M.A.; Canales Martínez, M.M.; Román Guerrero, A.; Jiménez Alvarado, R. Chemical Composition and In vivo Anti-inflammatory Activity of *Bursera morelensis* Ramírez Essential Oil. *J. Essent. Oil-Bearing Plants*. **2014**, *17*, 758–768.
 60. Elguero, J.; Gonzalez Albadalejo, J.; Sanz, D.; Claramunt, R.M.; Lavandera, J.L.; Alkorta, I. Curcumin and curcuminoids: chemistry ,

- structural studies and biological properties. *An. la real Acad. Nac. Farm.* **2015**, *81*, 278–310.
61. Hajialyani, M.; Tewari, D.; Sobarzo-Sánchez, E.; Nabavi, S.M.; Farzaei, M.H.; Abdollahi, M. Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: Therapeutic targets and drug delivery systems. *Int. J. Nanomedicine.* **2018**, *13*, 5023–5043.
 62. Mao, K.-L.; Fan, Z.-L.; Yuan, J.-D.; Chen, P.-P.; Yang, J.-J.; Xu, J.; ZhuGe, D.-L.; Jin, B.-H.; Zhu, Q.-Y.; Shen, B.-X.; et al. Skin-penetrating polymeric nanoparticles incorporated in silk fibroin hydrogel for topical delivery of curcumin to improve its therapeutic effect on psoriasis mouse model. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* **2017**, *160*, 704–714.
 63. Gonzalez, J.; Sanz, D.; Claramunt, R.M.; Lavandera, J.L.; Alkorta, I.; Elguero, J. Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *An. la real Acad. Nac. Farm.* **2015**, *81*, 278–310.
 64. Mohanty, C.; Sahoo, S.K. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discov. Today.* **2017**, *22*, 1582–1592.
 65. Shrotriya, S.; Ranpise, N.; Satpute, P.; Vidhate, B. Skin targeting of curcumin solid lipid nanoparticles-engrossed topical gel for the treatment of pigmentation and irritant contact dermatitis. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2018**, *46*, 1471–1482.
 66. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*; Aggarwal, B.B., Surh, Y.-J., Shishodia, S., Eds.; Springer: Houston, 2007.
 67. Urrejola, M.C.; Soto, L. V.; Zumarán, C.; Peñaloza, P.; Álvarez, B.; Fuentesvilla, I.; Haidar, Z.S. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *Int. J. Morphol.* **2018**, *36*, 1463–1471.
 68. Pinto Reis, C.; Neufeld, R.J.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2006**, *2*, 8–21.
 69. Schaffazick, S.; Guterres, S.; Freitas, L.; Pohlmann, A. Physicochemical characterization and stability of the polymer nanoparticulate systems for drug administration. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726–737.
 70. KÜÇÜKTÜRKMEN, B.; ÖZ, U C; BOZKIR, A. In Situ Hydrogel Formulation for Intra-Articular Application of Diclofenac Sodium-Loaded Polymeric Nanoparticles. **2017**, *14*, 56–64.

71. Moghimi, S.M.; Hunter, A.C. Poloxamers and Poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 412–420.
72. Babaei, Z.; Jahanshahi, M.; Sanati, M.H. Fabrication and evaluation of gelatin nanoparticles for delivering of anti- cancer drug. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, 23–30.
73. Liang, J.; Dong, X.; Yang, A.; Zhu, D.; Kong, D.; Lv, F. A dual fluorescent reverse targeting drug delivery system based on curcumin-loaded ovalbumin nanoparticles for allergy treatment. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2019**, *16*, 56–68.
74. Chen, L.; Remondetto, G.E.; Subirade, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 272–283.
75. Gyulai, G.; Magyar, A.; Rohonczy, J.; Orosz, J.; Yamasaki, M.; Sz, B.; Kiss, E. Preparation and characterization of cationic Pluronic for surface modification and functionalization of polymeric drug delivery nanoparticles. *Express Polym. Lett.* **2016**, *10*, 216–226.
76. Liu, Q.; Jing, Y.; Han, C.; Zhang, H.; Tian, Y. Encapsulation of curcumin in zein/ caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. *Food Hydrocoll.* **2019**, *93*, 432–442.
77. Bodratti, A.M.; Alexandridis, P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *J. Funct. Biomaterals.* **2018**, *9*, 3–24.
78. Giudice, C.A.; Pereyra, A.M. Protección de materiales. Recuperado el 5 de marzo de 2019 de: <http://www.frlp.utn.edu.ar/materias/protecmat/estabilidad>.
79. Zorzi Bueno, C.; Antunes Dias, A.M.; Cipriano De Sousa, H.J.; Braga, M.E.M.; Moraes, Â.M. Control of the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68. *Mater. Sci. Eng. C.* **2014**, *44*, 117–125.
80. Udhayakumar, S.; Shankar, K.G.; Sowndarya, S. L-Arginine intercedes bio-crosslinking of a collagen–chitosan 3D-hybrid scaffold for tissue engineering and regeneration: *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. *R. Soc. Chem.* **2017**, *7*, 25070–25088.
81. Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113–1128.

82. Barbero, A.M.; Frasch, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. *Toxicol. Vitro.* **2009**, *23*, 1–13.
83. Cilurzo, F.; Musazzi, U.M.; Franzé, S.; Fedele, G.; Minghetti, P. Design of *in vitro* skin permeation studies according to the EMA guideline on quality of transdermal patches. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *125*, 86–92.
84. Simon, A.; Amaro, M.I.; Healy, A.M.; Cabral, L.M.; de Sousa, V.P. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with *in vivo-in vitro* correlation. *Int. J. Pharm.* **2016**, *512*, 234–241.
85. Alves, C.A.; Ramos, I.I.; Nunes, C.; Magalhães, L.M.; Sklená, H.; Segundo, M.A.; Lima, J.L.F.C.; Reis, S. On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography. *Talanta.* **2016**, *146*, 369–374.
86. Shrotriya, S.; Ranpise, N.; Satpute, P.; Vidhate, B. Skin targeting of curcumin solid lipid nanoparticles-engrossed topical gel for the treatment of pigmentation and irritant contact dermatitis. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2018**, *46*, 1471–1482.
87. Coreño-Alonso, J.; Méndez-Bautista, M.T. Relación estructura-propiedades de polímeros. *Educ. Quim.* **2010**, *21*, 291–299.
88. Achim, G. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* **1996**, *17*, 103–114.
89. García López, A.J. Caracterización del efecto del extracto metanólico de la corteza de *Bursera morelensis* sobre *Leishmania mexicana*, UNAM, 2015.
90. Gerit D., M. Quantifying wound fluids for the clinician and researcher. *Ostomy Wound Manag.* **1994**, *40*, 66–9.
91. Parikh, D. V; Fink, T.; DeLucca, A.J.; Parikh, A.D. Absorption and swelling characteristics of silver (I) antimicrobial wound dressings. *Text. Res. J.* **2010**, *81*, 494–503.
92. Kamoun, E.A.; Kenawy, E.S.; Chen, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J. Adv. Res.* **2017**, *8*, 217–233.
93. Clayton, K.N.; Salameh, J.W.; Wereley, S.T.; Kinzer-Ursem, T.L. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics* **2016**, *10*, 1–14.
94. Singh, R.; Jr, J.W.L. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp.*

- Mol. Pathol.* **2009**, *86*, 215–223.
95. Ramanujam, R.; Sundaram, B.; Janarthanan, G.; Devendran, E.; Venkadasalam, M.; John Milton, M.C. Biodegradable Polycaprolactone Nanoparticles Based Drug Delivery Systems: A Short Review. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* **2018**, *15*, 679–685.
 96. Kraeling, M.E.K.; Topping, V.D.; Keltner, Z.M.; Belgrave, K.R.; Bailey, K.D.; Gao, X.; Yourick, J. In vitro percutaneous penetration of silver nanoparticles in pig and human skin. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *95*, 314–322.
 97. Krausz, A.E.; Adler, B.L.; Cabral, V.; Navati, M.; Doerner, J.; Charafeddine, R.A.; Chandra, D.; Liang, H.; Gunther, L.; Clendaniel, A.; et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11*, 195–206.
 98. Judefeind, A.; de Villiers, M.M. *Nanotechnology in Drug Delivery*. Springer US: New York, 2009.
 99. Campus, K.; Kanchanaburi, M.L.; Road, S. Nanocomposites Based on Cassava Starch and Chitosan-Modified Clay: Physico-Mechanical Properties and Biodegradability in Simulated Compost Soil. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* **2017**, *28*, 649–658.
 100. Song, Y.; Jiang, Z.; Gao, B.; Wang, H.; Wang, M.; He, Z.; Cao, X.; Pan, F. Embedding hydrophobic MoS₂ nanosheets within hydrophilic sodium alginate membrane for enhanced ethanol dehydration. *Chem. Eng. Sci.* **2018**, *185*, 231–242.
 101. Aghazadeh, M.; Karim, R.; Abdul Rahman, R.; Sultan, M.T.; Johnson, S.K.; Paykary, M. Effect of Glycerol on the Physicochemical Properties of Cereal Starch Films. *Food Technol. Econ. Eng. Phys. Prop.* **2018**, *36*, 403–409.
 102. Kossack, W.; Kremer, F. Banded spherulites and twisting lamellae in poly- ϵ -caprolactone. *Colloid Polym. Sci.* **2019**, *297*, 771–779.
 103. Verhoeven, N.; Neoh, T.L.; Furuta, T.; Yamamoto, C.; Ohashi, T.; Yoshii, H. Characteristics of dehydration kinetics of dihydrate trehalose to its anhydrous form in ethanol by DSC. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1638–1643.
 104. Bueno, C.Z.; Moraes, Â.M. Development of Porous Lamellar Chitosa-Alginate Membranes: Effect of Different Surfactants on Biomaterial Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *122*, 624–631.
 105. Guadarrama-Acevedo, M.C.; Mendoza-Flores, R.A.; Del Prado-Audelo,

- M.L.; Urbán-Morlán, Z.; Giraldo-Gomez, D.M.; Magaña, J.J.; González-Torres, M.; Reyes-Hernández, O.D.; Figueroa-González, G.; Caballero-Florán, I.H.; et al. Development and Evaluation of Alginate Membranes with Curcumin-Loaded Nanoparticles for Potential Wound-Healing Applications. *Pharmaceutics*. **2019**, *11*, 1–20.
106. Zhang, N.; Said, A.; Wischke, C.; Kral, V.; Brodewolf, R.; Volz, P.; Boreham, A.; Gerecke, C.; Li, W.; Neffe, A.T.; et al. Poly[acrylonitrile-co-(N-vinyl pyrrolidone)] nanoparticles –Composition-dependent skin penetration enhancement of a dye probe and biocompatibility. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 66–75.
 107. EMA Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on quality of transdermal patches. **2014**, *44*.
 108. Tagami, H.; Kanamaru, Y.; Inoue, K.; Suehisa, S.; Iwatsuki, K.; Yoshikuni, K.; Yamada, M. Water sorption-desorption test of the skin in vivo for functional assessment of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 425–428.
 109. van der Molen, R.G.; Spies, J.; van 't Noordende, J.M.; Boelsma, E.; Mommaas, A.M.; Koerten, H.K. Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin. *Arch. Dermatol. Res.* **1997**, *289*, 514–518.
 110. Goto, N.; Morita, Y.; Terada, K. Deposits from Creams Containing 20 % (w/w) Urea and Suppression of Crystallization (Part 2): Novel Analytical Methods of Urea Accumulated in the Stratum Corneum by Tape stripping and Colorimetry. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 1092–1098.
 111. Langer, R. New Methods of Drug Delivery New Methods of Drug Delivery. *Science*. **1990**, *249*, 1527–1533.
 112. Lademann, J.; Richter, H.; Teichmann, A.; Otberg, N.; Blume-Peytavi, U.; Luengo, J.; Weiß, B.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.M.; Wepf, R.; et al. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 159–164.
 113. Zeb, A.; Tabassam, S.; Maimoona, A.; Fawad, M.; Shah, A.; Ud, F.; Omer, D.; Qureshi, S. Potential of nanoparticulate carriers for improved drug delivery via skin; *Journal of Pharmaceutical Investigation*; 2018.
 114. Malvern Panalytical Rango de equipos Zetasizer. Recuperado el 19 de julio de 2019 de: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/zetasizer-range>.
 115. Panalytical, M. Dispersión de luz dinámica (DLS). Recuperado el 2 de

- agosto de 2019 de:
<https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
116. CFATA-UNAM Laboratorio de Dispersión de Luz. Recuperado el 3 de agosto de 2019 de:
http://www.fata.unam.mx/servicios/dispersion_luz/info
117. LS Instruments AG Technology/Dynamic Light Scattering. Recuperado el 3 de agosto de 2019 de:
<https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls>
118. Hernández-García, A. Nuevo laboratorio de fuerza atómica. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de:
https://www.iquimica.unam.mx/publicacion/Gaceta_Digital_10_IQUUNA_M/HTML/files/assets/common/downloads/page0031.pdf
119. Microscopio de Fuerza Atómica (AFM). Recuperado el 15 de agosto de 2019 de: <http://www.cciqs.uaemex.mx/index.php>
120. De Juan Herrero, J. *Fundamentos y manejo del microscopio óptico compuesto común*. Recuperado el 10 de agosto de 2019 de:
<https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/13097/1/Microscopio.pdf>
121. Laboratorio de pruebas mecánicas. Recuperado el 11 de agosto de 2019 de: http://www.fata.unam.mx/servicios/pruebas_mecanicas/info.
122. Capítulo III Propiedades Mecánicas. Recuperado el 11 de agosto de 2019 de:
http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lim/villela_e_ij/capitulo3.pdf.
123. Llamas Silva, A. Estudio de la penetración sonoforética de pravastatina sódica formulada en parches transdérmicos mediante la técnica del Tape stripping, Universidad Nacional Autónoma de México. 2015.
124. Nallagundla, S.; Patnala, S.; Kanfer, I. Application of an Optimized Tape Stripping Method for the Bioequivalence Assessment of Topical Acyclovir Creams. *AAPS Pharm Sci Tech.* **2018**, *19*, 1567–1573.
125. Paillet-Mattei, C.; Guerret-Piécourt, C.; Zahouani, H.; Nicoli, S. Interpretation of the human skin biotribological behaviour after tape stripping. *J. R. Soc. Interface* **2011**, *8*, 934–941.
126. Ducrotté-Tassel, A.; Kirilov, P.; Salvi, J.P.; Tran, V.H.; Dore, V.; Marignac, G.; Pignon, C.P.; Perrot, S.; Boulieu, R. Ex-vivo permeation of enrofloxacin through shed skin of Python molurus bivittatus, as evaluated with a Franz cell. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *36*, 89–

94.

127. Morais Ruela, A.L.; Gravinez Perissinato, A.; Esselin de Sousa Lino, M.; Silva Mudrik, P.; Ribeiro Pereira, G. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2016**, *52*, 527–544.
128. Eman, A.; Shereen, A.Y.; Pastore, M.N.; Telaprolu, K.; Mohammed, Y.H.; Grice, J.E.; Roberts, M.S. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **2016**, 163–176.
129. Murdock, R.C.; Laura, B.-S.; Schrand, A.M.; Schlager, J.J.; Hussain, S.M. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicol. Sci.* **2008**, *101*, 239–253.
130. Velocimetry LDV - Laser Doppler Velocimetry. Recuperado el 9 de agosto de 2019 de: https://velocimetry.net/ldv_principles.htm

X. ANEXOS

ANEXO I. Métodos de caracterización

Métodos de caracterización de nanopartículas

Evaluación del tamaño de partícula y potencial zeta

El tamaño y PDI de las partículas pueden ser determinados mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés Dynamic Light Scattering), la cual permite determinar el tamaño promedio y la distribución de tamaño de partículas que se encuentren suspendidas o disueltas en un medio líquido. Es posible determinar el tamaño de partículas menor a 1 nm hasta varios micrones.

Su principio se basa en la incidencia de un láser sobre la muestra, la fluctuación de luz que se dispersa es detectada por un detector de fotones dentro de un ángulo conocido, esto es posible porque las partículas dispersan la luz. La frecuencia de luz dispersada otorga información sobre su movimiento, pues éste depende de la velocidad de la partícula, la cual está directamente relacionada con su tamaño. Entre menor sea una partícula tendrá mayor movimiento. Este principio obedece al movimiento browniano, que consiste en el movimiento aleatorio de partículas, el cual es causado por el choque de moléculas del fluido en el que se encuentran.

Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano, que está definida por una propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional, el cual puede ser convertido en tamaño de partícula utilizando la Ecuación de Stokes-Einstein.

La carga o potencial zeta de las partículas se puede determinar al medir su velocidad cuando éstas se encuentran en movimiento, pues existe una proporción entre la velocidad a la que se mueven, su campo de fuerza y su

potencial zeta. Al conocer su velocidad puede determinarse su campo de fuerza [114-117].

La Velocimetría Láser Doppler (LDV, por sus siglas en inglés) es la técnica de medición que utiliza el equipo Zetasizer para determinar el potencial zeta de partículas que se encuentran en un fluido. La técnica involucra un rayo láser monocromático, que pasa a través de la muestra y recoge la radiación reflejada, en donde el cambio de longitud de onda de esta radiación es función de la velocidad relativa de la muestra (de acuerdo al efecto Doppler). Al analizar la frecuencia de la luz láser que dispersan las partículas que se encuentran dentro del flujo, es posible que la velocidad local del fluido pueda ser determinada [129,130].

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

A través de la AFM se puede obtener información morfológica en 3D, a partir de la topografía de superficies sólidas y semisólidas; medir las dimensiones de nanopartículas, coloides o agregados supramoleculares; así como parámetros superficiales tales como valores en Z, rugosidad y límites de grano, distribución (homogeneidad) de partículas o dureza de películas delgadas, entre otras. Las imágenes son tomadas con una sonda física que barre la muestra y logra resoluciones subnanométricas.

Mientras que la muestra es analizada, se detecta la fuerza atómica generada cuando una punta o sonda en forma piramidal se aproxima a la superficie de la muestra, esta punta va acoplada a un listón de aproximadamente 200 μm que se flexiona como efecto de las fuerzas. Esta flexión es registrada a través de un haz láser que se refleja en la parte posterior de la micropalanca y finalmente llega a un fotodetector [118,119].

Además de caracterizar a las nanopartículas, es de gran importancia realizar la caracterización fisicoquímica de las membranas, de esta manera podrá

comprobarse si poseen las características ideales de un apósito para promover la cicatrización de heridas.

Métodos de caracterización de membranas

Algunas de las técnicas utilizadas para la caracterización de materiales en ingeniería de tejidos son: microscopía óptica, microscopía de fuerza atómica, calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico y pruebas mecánicas.

Microscopía óptica

La microscopía es una técnica que permite observar imágenes de estructuras pequeñas, que no son percibidas a simple vista. Para ello, se utiliza el microscopio, un instrumento que nos permite visualizar estructuras con un tamaño menor a 250 μm [120].

El mecanismo del microscopio óptico o fotónico, se basa en que la luz visible y no visible es transmitida a través de un sistema óptico de lentes, prismas o espejos [120].

El microscopio compuesto es el más utilizado, ya que el microscopio simple es una lupa, que está formada por un soporte y una lente biconvexa, que produce pocos aumentos e insuficiente poder de resolución. En contraste, el microscopio compuesto permite aumentos del orden de 1.500 a 2.000 y tiene un poder de resolución de 0.2 μm .

Ensayos mecánicos

Para determinar las propiedades mecánicas (dureza, elasticidad, fragilidad y resistencia) de los materiales se utilizan las pruebas mecánicas, que son pruebas destructivas en donde a los materiales se les aplica una fuerza externa hasta lograr su deformación o ruptura. Se pueden estudiar diferentes

materiales como: cerámicos, polímeros, metales de baja dureza, productos farmacéuticos y alimenticios [121]. En la Figura 41 se observa un ejemplo del perfil mecánico de un material, en donde se puede observar que el material se estira al aumentar la carga, hasta llegar a la carga máxima en donde el material se rompe.

En el presente trabajo se evaluaron la resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación de las membranas.

La resistencia a la tracción (RT), es la resistencia de un material a romperse bajo tensión, es decir, es la máxima cantidad de tensión que un material puede soportar antes de romperse [121]. Su cálculo se realiza de acuerdo con la siguiente ecuación,

$$RT = \frac{F}{A}$$

en donde RT está reportado en MPa, F: fuerza de ruptura (N); A: área transversal (mm²).

El porcentaje de elongación (% E), es la habilidad de un material de deformarse hasta romperse, lo que indica la capacidad de estiramiento del material [122]. Para determinarlo se utiliza la siguiente ecuación,

$$\%E = \frac{D}{L} * 100$$

en donde D: desplazamiento al punto de ruptura (mm), L: longitud inicial de la membrana (mm).

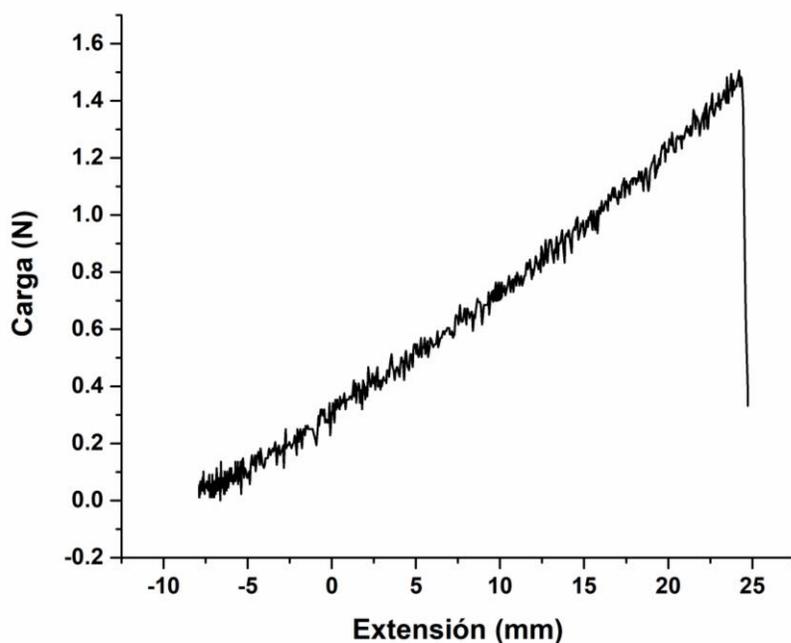


Figura 41. Ejemplo gráfico del perfil mecánico de un material.

Para evaluar estas propiedades se utilizó un instrumento llamado equipo de pruebas mecánicas o texturómetro.

El equipo consta básicamente de dos secciones: un marco de carga o aparato de permeación equipado con una mordaza y una computadora para el registro de datos y control del equipo (Figura 42). La muestra se coloca en las mordazas superior e inferior, las cuales se desplazan hacia arriba o hacia abajo para comprimir o estirar las muestras. El cabezal se desplaza hacia la muestra para transmitir una fuerza al espécimen en estudio y evaluar la resistencia del material a esfuerzos de elongación y/o compresión. Por último, la celda de carga mide la fuerza de tracción o de compresión que se ejerce en una muestra de ensayo; en una prueba se pueden recopilar la distancia de desplazamiento y la fuerza necesaria para que la muestra se rompa [74].

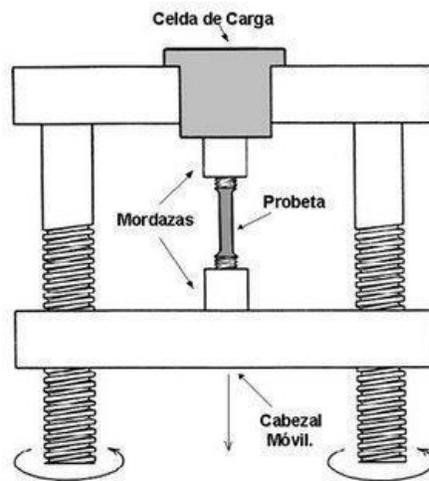


Figura 42. Esquema de la estructura del texturómetro o equipo de pruebas mecánicas. Modificado de [122]

Los ensayos mecánicos de las diferentes formulaciones de membranas creadas son importantes para determinar su resistencia, así como la capacidad que tienen para estirarse y comparar el efecto de diferentes polímeros y el uso de plastificantes; sin embargo, también es de gran interés observar cómo el fármaco puede llegar a modificar la estructura entre los componentes de la membrana y con ello modificar sus propiedades térmicas.

Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El Análisis Termogravimétrico y la Calorimetría Diferencial de Barrido son técnicas utilizadas para analizar los cambios físicos en las propiedades térmicas de un compuesto en función de la temperatura.

El TGA registra el porcentaje de la pérdida de peso de un compuesto dentro de un rango determinado de temperatura, esta pérdida se debe a la descomposición del mismo, a su deshidratación, pérdida de disolvente o pérdida de plastificante.

Por otra parte, al analizar un compuesto mediante DSC, se intenta mantener la muestra y una referencia a la misma temperatura, conforme la temperatura

del medio incrementa, el equipo registra las entalpías asociadas a las transiciones. El calor necesario para este fin es registrado como picos endotérmicos, en donde tienen lugar la temperatura de fusión, de ebullición y de transición vítrea o picos exotérmicos al haber cristalización. Mediante este análisis también pueden obtenerse la capacidad calorífica, el porcentaje de pureza, el porcentaje de cristalinidad y la compatibilidad entre el principio activo y excipientes en formulaciones.

Ambas técnicas tienen uso en la industria farmacéutica, de polímeros, cosméticos, alimentos, construcción, cerámicos, de metalurgia, entre otras. Las muestras pueden emplearse sólidas o líquidas.

Por otro lado, la cuantificación de la permeación de un fármaco a través de la piel es de gran importancia para asegurarse que el fármaco llega a su sitio de acción con la finalidad de ejercer su efecto terapéutico. Para ello, existen diferentes métodos utilizados tanto *in vivo* como *ex vivo*, como lo son *tape stripping* y celdas de difusión, respectivamente.

Ensayos para cuantificar la permeación de fármaco en la piel

Tape stripping

Es una técnica de invasión mínima que consiste en adherir y retirar secuencialmente tiras adhesivas en la superficie de la piel. Cada cinta adhesiva retira una capa de corneocitos que se encuentran embebidos en la matriz extracelular (Figura 43). La cantidad de EC removido no es directamente proporcional al número de cintas adhesivas. Esta técnica es simple y fácil de llevar a cabo, sin embargo, existen diferentes parámetros que pueden influir en la cantidad de EC removido en cada cinta, en donde se incluyen la hidratación de la piel, la cohesión entre las células (la cual incrementa con la profundidad del EC), el sitio anatómico en que se lleva a cabo, así como las

diferencias entre cada individuo. Otros parámetros que pueden influir son el tipo y marca de cinta que se utiliza en cuanto a su composición y propiedades adhesivas, la presión que se ejerce al pegar la cinta, así como el tiempo que se mantiene presionada y la manera en que es removida [93,94].

Mediante esta técnica podemos evaluar la biodisponibilidad local de sustancias cuya diana terapéutica es el mismo EC, como en el caso de los antifúngicos.

Además de que con esta técnica puede conocerse la concentración de fármaco en el EC, también es utilizada para generar susceptibilidad en la piel antes de colocar algún fármaco o material irritante y para inducir la disrupción de la barrera de agua y evaluar cómo ésta es restaurada por la aplicación de determinado producto o tratamiento. De igual manera, es utilizada para evaluar la biodisponibilidad y bioequivalencia de medicamentos tópicos [124].

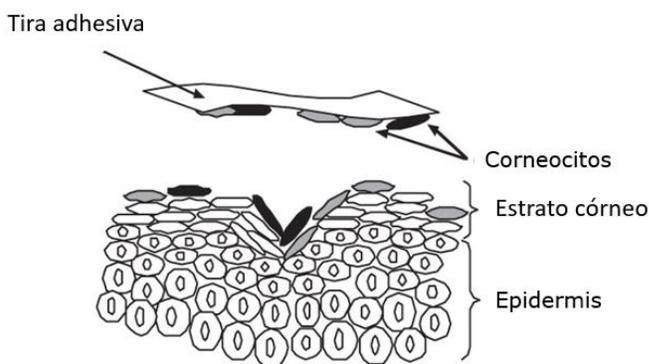


Figura 43. *Tape stripping*, se observa como los corneocitos son retirados con la tira adhesiva. Modificado de [125].

Celdas de difusión

Para determinar si un medicamento tópico se libera y pasa a través de la piel de una forma eficiente es necesario evaluar el proceso de permeación.

Las celdas de Franz son una metodología ampliamente utilizada para evaluar la permeación *in vitro* del fármaco en tiempo real. Al ser *in vitro* podemos

manipular el sistema y los tiempos de muestreo, permitiéndonos realizar una cinética de permeación más completa, con la suficiente información para predecir el comportamiento del fármaco [97,98].

La celda de Franz se compone de un compartimento donador y un compartimento receptor, los cuales están separados por una membrana sintética o de piel, ya sea humana o animal (Figura 44). El tratamiento se coloca en el compartimento donador, que permea a través de la membrana o piel hacia el compartimento receptor, el cual es llenado con el medio de solución. Además, el compartimento receptor tiene un acceso para muestreo, en donde las muestras son retiradas [127].

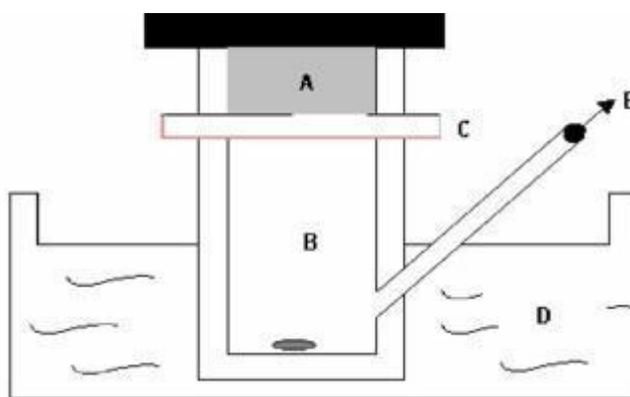


Figura 44. Representación esquemática de una celda de Franz. A) Compartimento donador, B) Compartimento receptor, C) Piel, D) Baño de agua, E) Acceso para muestreo. Imagen modificada de [127].

La piel porcina se ha utilizado como modelo animal convencional en estudios de permeación, ya que ha demostrado que su permeabilidad es similar a la piel humana [82]. Esto se ha atribuido por presentar lípidos similares en el estrato córneo, además de que el grosor y los aspectos morfológicos son comparables con la piel humana [128], tales como: capa de pelo extra, una epidermis gruesa, una dermis con cuerpo papilar bien diferenciado y gran contenido de tejido elástico [82].

Las condiciones experimentales para la evaluación de la permeación de piel incluyen un medio receptor en constante agitación mecánica y con control de la temperatura [127]. El volumen del medio debe ser de 5 a 10 veces el de saturación del fármaco, siendo importante asegurarse que el fármaco sea soluble en el medio receptor.

Los medios receptores recomendados son amortiguadores acuosos relacionados al ambiente fisiológico. El uso de aditivos en el medio receptor es necesario en algunos casos para aumentar la solubilidad del fármaco, pero estos aditivos no deben comprometer la integridad de la membrana o alterar la permeabilidad del fármaco. Algunos aditivos que se suelen incorporar al medio son surfactantes no iónicos como Tween 80, polietilenglicol y etanol. Para prevenir el crecimiento microbiológico en el medio se añaden conservadores, como gentamicina, azida de sodio y formaldehído [127].

ANEXO II. Pruebas estadísticas en la caracterización de las membranas

Tabla 17. Diferencia estadísticamente significativa de las membranas en la prueba de hinchamiento, realizado mediante un ANOVA a 95 % de confianza.

Tienen diferencia significativa		No tienen diferencia significativa
M1 y M2	M2 y Pa-M2	M3 y M4
M1 y M3	M3 y Pa-M3	M4 y Pa-M4
M2 y M4	CNp-M4 y M3	Pa-M1 y Pa-M2
Pa-M1 y Pa-M3	CNp-M4 y M4	Pa-M2 y Pa-M4
Pa-M3 y Pa-M4	CNp-M4 y Pa-M3	CNp-M4 y Pa-M4
M1 y Pa-M1		

Tabla 18. Diferencia estadísticamente significativa de las membranas en el porcentaje de elongación, realizado mediante un ANOVA a 95 % de confianza.

Tienen diferencia significativa		No tienen diferencia significativa
M4 y Pa-M4	CNp-M4 y M3	Pa-M2 y M2
M1-Pa-M1	CNp-M4 y M4	M3 y Pa-M1
M3 y M4	M2 y M4	M1 y M2
M3 y M1	M3 y M4	M2 y M3
M2 y M4	CNp-M4 y Pa-M3	
CNp-M4 y M1	M1 y M4	
CNp-M4 y M2		

Tabla 19. Diferencia estadísticamente significativa de las membranas en la resistencia a la tracción, realizado mediante un ANOVA a 95 % de confianza.

Tienen diferencia significativa		No tienen diferencia significativa
Pa-M2 y Pa-M4	M1 y M4	Pa-M4 y Pa-M1
Pa-M2 y M1	Pa-M1 y M2	M1 y M2
Pa-M2 y Pa-M1	Pa-M1 y M3	M1 y M3
Pa-M2 y M2	Pa-M1 y Pa-M3	M3 y Pa-M3
Pa-M2 y M3	Pa-M1 y M3	M2 y M3
PA-M2 y Pa-M3	Pa-M1 y M4	
Pa-M2 y M4	M2 y M3	
Pa-M4 y M1	M2 y Pa-M3	
Pa-M4 y Pa-M1	M2 y M4	
Pa-M4 y Pa-M3	M3 y M4	
Pa-M4 y M4	Pa-M3 y M4	
M1 y Pa-M1	M1 y Pa-M3	
CNp-M4 y M1	CNp-M4 y M3	
CNp-M4 y M2	CNp-M4 y M4	

ANEXO III. Cuestionario utilizado en la evaluación sensorial de las membranas



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química



Nombre _____ Edad _____ Género _____

Si padece alguna enfermedad favor de indicarlo.

Diabetes Psoriasis Dermatitis Sensibilidad de la piel Otra

Instrucciones generales. Antes de responder, lea el siguiente cuestionario. En caso de presentar alguna duda, consulte al responsable de esta prueba. Indique con una x en las escalas, la respuesta de su preferencia.

Ante usted se presenta una muestra de membrana de alginato. A continuación, deberá tomarla con las yemas de los dedos.

Al tomar la membrana con la yema de los dedos

1. ¿Qué textura tiene?

		M1	M2	M3	M4
1	Lisa				
2	Rugosa				

2. En caso de que la membrana se haya pegado entre sí misma, ¿qué tan fácil fue despegarla?

		M1	M2	M3	M4
1	Muy fácil				
2	Fácil				
3	Difícil				
4	Muy difícil				

3. ¿Qué tan pegajosa se siente?

		M1	M2	M3	M4
1	Muy pegajosa				
2	Pegajosa				
3	Poco pegajosa				
4	Nada Pegajosa				

Durante la aplicación

4. Coloque las membranas sobre el antebrazo derecho y responda. ¿La membrana se adhiere a la piel al colocar la zona de aplicación en vertical?

		M1	M2	M3	M4
1	Sí				
2	No				

5. ¿Con qué facilidad se adhirió la membrana a la piel?

		M1	M2	M3	M4
1	Muy fácil				
2	Fácil				
3	Difícil				
4	Muy difícil				

Deseche las 4 membranas al finalizar la pregunta 5. Avise al responsable de esta prueba para que le sean colocadas nuevas membranas sobre el antebrazo izquierdo y responda.

Esperar 5 minutos tras la aplicación antes de responder la siguiente pregunta.

6. Al humedecer la membrana con agua, ¿ésta se adhiere a la piel después de colocarla en la zona de aplicación de manera vertical?:

		M1	M2	M3	M4
1	Si				
2	No				

Una vez colocada cada membrana sobre la piel, responda lo siguiente:

7. ¿La membrana se deslizó sobre la piel? Si la respuesta es sí, indique la distancia en milímetros.

		M1	M2	M3	M4
1	Sí				
2	No				

ANEXO IV. Validación de los métodos analíticos

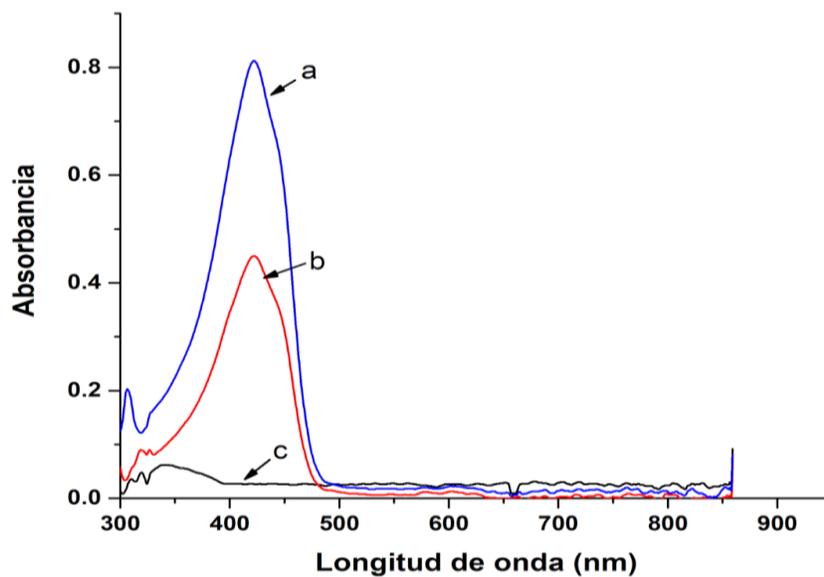


Figura 45. Espectro de a) curcumina, b) cinta con corneocitos y curcumina y c) cinta con corneocitos, en acetona.

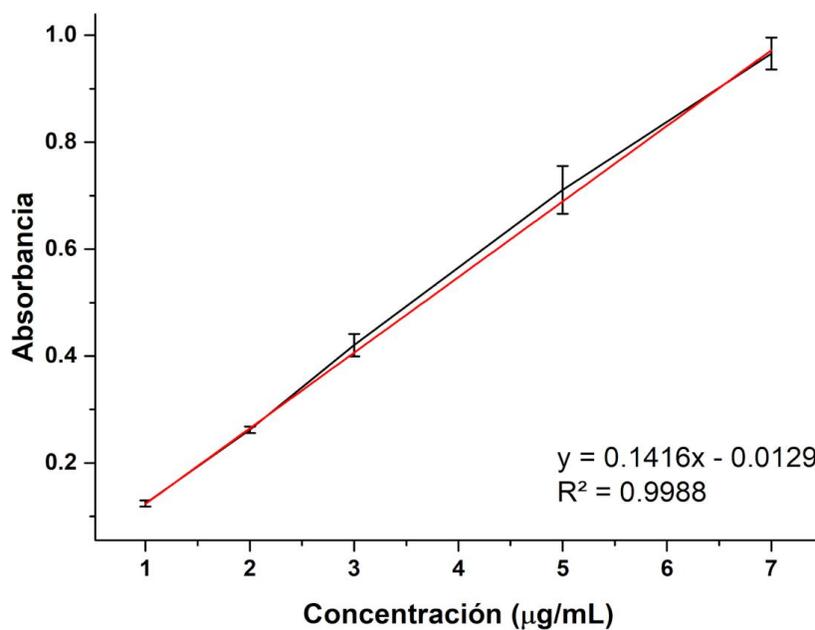


Figura 46. Curva de calibración de curcumina, utilizando como disolvente acetato-metanol 9:1

Tabla 20. Exactitud de la curva de calibración de curcumina, utilizando como disolvente acetato-metanol 9:1

EXACTITUD			
Niveles	Bajo ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Alto ($\mu\text{g/mL}$)
Concentración teórica	1.0000	3.0000	7.0000
Concentración calculada	0.9653	3.0654	6.9346
Recobro (%)	96.5327	102.1802	99.0656

Tabla 21. Parámetros evaluados en la validación del método analítico para la cuantificación de curcumina utilizando como disolvente acetato-metanol 9:1

Parámetro	Criterio	Resultado	Cumple
Linealidad	$r^2 > 0.98$	$r^2 = 0.9988$	Sí
Precisión (repetibilidad)	CV < 5 %	1 $\mu\text{g/mL}$ CV = 4.70 %	Sí
		3 $\mu\text{g/mL}$ CV = 4.94 %	Sí
		7 $\mu\text{g/mL}$ CV = 3.09 %	Sí
Exactitud	% de recobro: 97-103 %	1 $\mu\text{g/mL}$ CV = 96.53 %	No
		3 $\mu\text{g/mL}$ CV = 102.18 %	Sí
		7 $\mu\text{g/mL}$ CV = 99.07 %	Sí
Límite de detección	----	0.1484 $\mu\text{g/mL}$	Sí

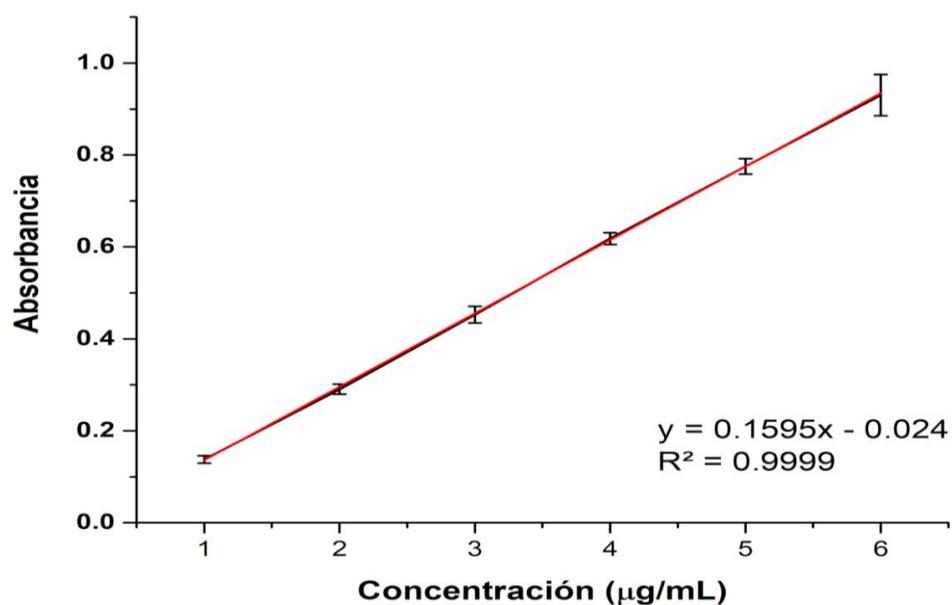


Figura 47. Curva de calibración de curcumina, utilizando como medio PBS 1x.

Tabla 22. Exactitud de la curva de calibración de curcumina, utilizando como medio PBS 1x.

EXACTITUD			
Niveles	Bajo (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Alto (µg/mL)
Concentración teórica	1.5000	3.5000	5.5000
Concentración calculada	1.6141	3.5758	5.6071
Recobro (%)	107.6048	102.1645	101.9474

Tabla 23. Parámetros evaluados en la validación del método analítico para la cuantificación de curcumina, utilizando PBS 1x.

Parámetro	Criterio	Resultado	Cumple
Linealidad	$r^2 > 0.98$	$r^2 = 0.9999$	Sí
Precisión (repetibilidad)	CV < 5 %	1.5 µg/mL CV = 1.39 %	Sí
		3.5 µg/mL CV = 4.20 %	Sí
		5.5 µg/mL CV = 0.92 %	Sí
Exactitud	% de recobro: 97-103 %	1.5 µg/mL CV = 107.60 %	No
		3.5 µg/mL CV = 102.16 %	Sí
		5.5 µg/mL CV = 101.95 %	Sí
Límite de detección	----	0.1 µg/mL	Sí
Límite de cuantificación	----	0.6 µg/mL	Sí

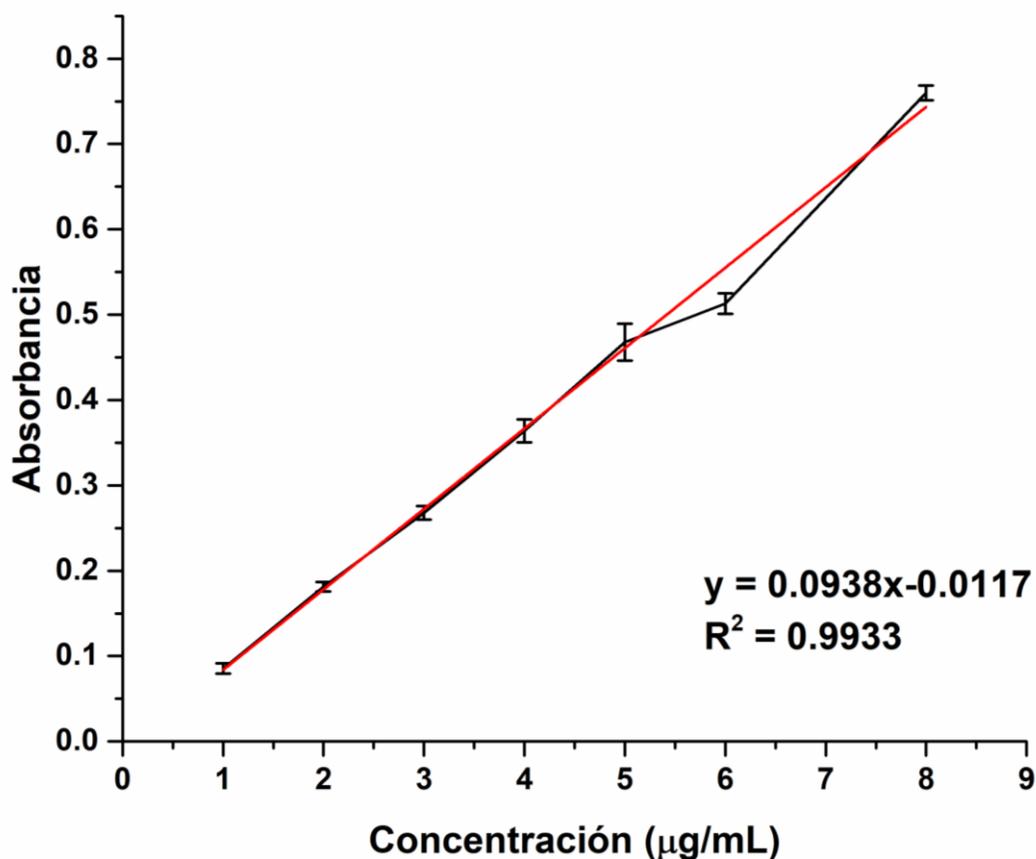


Figura 48. Curva de calibración de curcumina en acetona.

Tabla 24. Exactitud de la curva de calibración de curcumina, utilizando como disolvente acetona.

EXACTITUD			
Niveles	Bajo ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Alto ($\mu\text{g/mL}$)
Concentración teórica	1.500	4.500	7.000
Concentración calculada	1.457	4.132	7.106
Recobro (%)	97.130	91.820	101.510

Tabla 25. Parámetros evaluados en la validación del método analítico para la cuantificación de curcumina, utilizando como disolvente acetona.

Parámetro	Criterio	Resultado	Cumple
Linealidad	$r^2 > 0.98$	$r^2 = 0.9933$	Sí
Precisión (repetibilidad)	CV < 5 %	1.5 $\mu\text{g/mL}$ CV = 2.64 %	Sí
		4.5 $\mu\text{g/mL}$ CV = 2.16 %	Sí
		7.0 $\mu\text{g/mL}$ CV = 1.98 %	Sí
Exactitud	% de recobro: 97-103 %	1.5 $\mu\text{g/mL}$ CV = 97.13 %	Sí
		4.5 $\mu\text{g/mL}$ CV = 91.82 %	No
		7.0 $\mu\text{g/mL}$ CV = 101.51 %	Sí
Límite de detección	----	0.1 $\mu\text{g/mL}$	Sí
Límite de cuantificación	----	0.6 $\mu\text{g/mL}$	Sí

Article

Development and Evaluation of Alginate Membranes with Curcumin-Loaded Nanoparticles for Potential Wound-Healing Applications

Mónica C. Guadarrama-Acevedo ^{1,†}, Raisa A. Mendoza-Flores ^{1,†}, María L. Del Prado-Audelo ^{1,2}, Zaida Urbán-Morlán ¹, David M. Giraldo-Gomez ³ , Jonathan J. Magaña ⁴, Maykel González-Torres ^{5,6} , Octavio D. Reyes-Hernández ⁷, Gabriela Figueroa-González ⁸, Isaac H. Caballero-Florán ^{1,9}, Carla D. Florán-Hernández ⁴, Benjamín Florán ⁹ , Hernán Cortés ⁴  and Gerardo Leyva-Gómez ^{1,*} 

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior S/N, Del. Coyoacán, Ciudad de México 04510, México

² Laboratorio de Posgrado en Tecnología Farmacéutica, FES-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli 54740, México

³ Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Edificio "A" 3er piso, Circuito Interior, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México 04510, México

⁴ Laboratorio de Medicina Genómica, Departamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México 14389, México

⁵ CONACyT-Laboratorio de Biotecnología, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Ciudad de México 14389, México

⁶ Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Ciudad de México 14380, México

⁷ Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, UMIÉZ, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 09230, México

⁸ CONACyT-Laboratorio de Genómica, Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología. Av. San Fernando 22, Tlalpan, Sección XVI, Ciudad de México 14080, México

⁹ Departamento de Fisiología, Biofísica & Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 07360, México

* Correspondence: gerardoleyva@hotmail.com; Tel.: +52-(55)-5622-3899 (ext. 44408)

† Mónica C. Guadarrama-Acevedo and Raisa A. Mendoza-Flores equally contributed as first authors to the present work.

Received: 6 June 2019; Accepted: 30 July 2019; Published: 3 August 2019



Abstract: Non-biodegradable materials with a low swelling capacity and which are opaque and occlusive are the main problems associated with the clinical performance of some commercially available wound dressings. In this work, a novel biodegradable wound dressing was developed by means of alginate membrane and polycaprolactone nanoparticles loaded with curcumin for potential use in wound healing. Curcumin was employed as a model drug due to its important properties in wound healing, including antimicrobial, antifungal, and anti-inflammatory effects. To determine the potential use of wound dressing, *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* studies were carried out. The novel membrane exhibited the diverse functional characteristics required to perform as a substitute for synthetic skin, such as a high capacity for swelling and adherence to the skin, evidence of pores to regulate the loss of transepidermal water, transparency for monitoring the wound, and drug-controlled release by the incorporation of nanoparticles. The incorporation of the nanocarriers aids the drug in permeating into different skin layers, solving the solubility problems of curcumin. The clinical application of this system would cover extensive areas of mixed first- and second-degree wounds, without the need for removal, thus decreasing the patient's discomfort and the risk of altering the formation of the new epithelium.

Keywords: wound dressing; polymeric membrane; nanoparticles; curcumin; alginate; pluronic F68; drug skin permeation; Franz cells; tape stripping

1. Introduction

Human skin exerts a pivotal function as a protection barrier against diverse exogenous noxious factors; however, it is exposed and undergoes diverse types of injuries, including burns, ulcers, trauma, lacerations, and acute or chronic wounds, which may compromise its integrity [1].

In this regard, when skin is damaged, a specialized and highly regulated dynamic process immediately takes place: wound healing [2]. The main goal of wound healing is to restore tissue integrity and to achieve homeostasis; however, this process may be complicated by distinct intrinsic and extrinsic factors [2]. Thus, in order to accelerate wound healing, a variety of wound dressings have been designed.

Irrespective of the type of wound, the main function of dressings is to aid in the repair of the wound through the reduction of pain and inflammation, to protect the damaged tissue from pathogenic agents, and to enhance cell differentiation and proliferation [3]. Although there several types of dressings which are commercially available, many of these present some drawbacks, such as an inefficient absorption of exudates, poor protection against infections by microbes, the lack of ability to maintain humidity, and the triggering of allergic effects [4]. In addition, several dressings may adhere to the wound and require constant changes, which may interfere with the granulation process and delay the healing course.

Therefore, in recent years, there has been increasing interest in asymmetric membranes as an alternative for designing wound dressings [5]. These types of membranes possess multiple advantages, such as structural similarity with the skin, an ability to absorb exudates due to their porous structure, and improved cell adhesion and proliferation [6,7]. Different polymers have been employed for their development, including chitosan, hyaluronic acid, collagen, poly vinyl alcohol (PVA), polycaprolactone (PCL), and alginate [8]. In particular, alginate is a biopolymer extracted from seaweed and has shown several unique properties, such as biodegradability, good hydrophilicity, and good biocompatibility [4]. Alginate has exhibited potential for improving wound healing due to its hemostatic properties; moreover, it may reduce microbial infections, enhance the absorption of exudates, and decrease allergic reactions [9]. These features render alginate an interesting option for wound dressings. In addition, alginate membranes possess the advantage that they may be functionalized with bioactive compounds that enhance their healing properties.

In this regard, curcumin is a natural compound that possesses a plethora of biological activities, including antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, and antioxidant effects [10–12]. In addition, curcumin improves wound healing, enhances epithelial regeneration, and increases the proliferation of fibroblasts [13,14]. Thus, curcumin could be a suitable pharmacological agent for the elaboration of wound dressings. However, curcumin exhibits low bioavailability and is unstable in neutral and alkaline aqueous solutions, as well as in hydrophilic topical preparations [12,15]. These drawbacks could be overcome by a nanoparticle formulation that permits the controlled and gradual release of the compound.

Therefore, the objective of this study was to design and develop a novel wound dressing comprising an alginate membrane and PCL nanoparticles loaded with curcumin and stabilized with Pluronic® F-68 (CNp) for possible application in wound healing. The wound dressing was physicochemically characterized, and *in vivo* and *ex vivo* permeation assays were performed.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

For CNp fabrication, we used PCL (Mn 80,000 g/mol), Pluronic[®] F-68, and trehalose dihydrate, which were purchased from Sigma-Aldrich[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), whereas methanol, ethyl acetate, and curcumin were supplied by Spectrum[®] (Spectrum Laboratory Products, CA, USA). For membrane elaboration and characterization, we employed sodium alginate [(SA) (300–700 cps 1.0%, RV, 20 rpm, 25 °C)], glycerol (Gly), propylene glycol (Prop), and Tween 80, which were purchased from Droguería Cosmopolita (Mexico City, Mexico). PVA, Pluronic[®] F-127, acetone, and phosphate buffered saline (PBS) solution were supplied by Sigma-Aldrich[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Kollidon[®] 30 [Polyvinylpyrrolidone k 30; (PVP k30)] was obtained from BASF (USA). Ethyl acetate was acquired from Distribuidora Química Alvi (State of Mexico, Mexico). Methanol was purchased from Fermont (Nuevo León, Mexico). All other chemicals and reagents were of at least analytical-grade quality.

2.2. Preparation of PCL Nanoparticles Loaded with Curcumin (CNp)

CNp were prepared by the emulsification–diffusion method, as previously described by Quintanar-Guerrero, et al. [16]. Briefly, the organic saturated phase and aqueous saturated phase were obtained by the saturation of an ethyl acetate and distilled water mixture at a 1:1 ratio. After that, 2% (*w/v*) solution of PCL was prepared by dissolving 400 mg of PCL in 20 mL of the organic saturated phase; once PCL was dissolved, 100 mg of curcumin was added. At the same time, 5% (*w/v*) of Pluronic[®] F-68 solution was prepared using an aqueous saturated phase as solvent. In order to obtain an emulsion, both solutions were mixed at a 1:2 ratio with a high-speed homogenizer (Ultra Turrax T18; IKA[®]) at 14,000 rpm for 10 min at room temperature. Then, 160 mL of water was added to the emulsion to generate polymer aggregation, and the system was maintained under the same conditions for 10 min. The organic solvent was evaporated by a rotary vacuum (Heidolph[®], Schwabach, Germany), and the nanoparticle suspension obtained was centrifuged at 15,557 g for 30 min at 25 °C. Finally, the pellet was dissolved in distilled water. In order to assess the thermal stability and the properties of the nanoparticles, CNp were frozen and lyophilized at −49 °C, 0.05 mBar for 24 h, employing 5% *w/v* trehalose dihydrate as a cryoprotectant.

2.3. Physicochemical Characterization of CNp

2.3.1. Particle Size and Zeta Potential Assessment

The particle size and distribution (polydispersity index, PDI) of the CNp were evaluated by dynamic light scattering. On the other hand, to determine the Zeta potential of CNp, laser Doppler velocimetry was employed. CNp dispersions were assessed five times at 25 °C in a Zetasizer (Malvern Instrument ZS90; Malvern, UK).

2.3.2. Atomic Force Microscopy (AFM)

CNp size and geometry were analyzed by atomic force microscopy (AFM) with a scanning probe microscope (JSPM-4210, JEOL[®], Tokyo, Japan). In brief, the CNp dispersion was obtained after centrifugation, and the pellet resuspension was diluted to 1:100 with distilled water. A drop was placed on a coverslip, allowing it to dry at room temperature. The coverslip with the drop was held in place with carbon tape, and room-temperature conditions were utilized to assess the samples.

2.3.3. Drug Loading and Entrapment Efficiency of CNp

To calculate entrapment efficiency (EE) and drug loading (DL), the CNp dispersion was centrifuged at 15,557 g for 40 min; then, the sediment was resuspended in ethyl acetate and the absorbance was

measured by UV–Vis spectrophotometry at 420 nm (DLAB[®], SP-UV1000, Beijing, China). The amount of curcumin was obtained by interpolation in a calibration curve (R^2 coefficient = 0.99985).

The percentages of EE and DL were calculated from the equations below:

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{CN}}{\text{IC}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ DL} = \frac{\text{CN}}{\text{N}} \times 100 \quad (2)$$

where CN = the amount of curcumin in nanoparticles, IC = the initial amount of curcumin, and N = the number of nanoparticles.

2.4. Preparation of Polymer Gels and Membranes

Four membrane formulations based on SA (M1, M2, M3, and M4) (See Table 1) were prepared using the solvent casting method as published by Karki et al. [17]. First, SA and the polymer were dissolved separately in injectable water by stirring at 35 °C. After dissolution, they were mixed with each other by mechanical stirring. Then, the plasticizer (or a plasticizer mixture) was added by stirring at room temperature until a homogeneous gel was obtained. In order to eliminate bubbles from the gel, it was centrifuged at 636 g for 20 min at room temperature (BIOBASE, BKC-TH18II, Shandong, China).

Table 1. Formulation of alginate membranes with different polymers as plasticizers. PVA: poly vinyl alcohol; PVP: polyvinylpyrrolidone; CNp: polycaprolactone (PCL) nanoparticles loaded with curcumin.

Formulation Code	SA (% w/v)	Polymer		Plasticizer	
		PVA (%w/v)	PVP (%w/v)	Gly (%w/v)	Prop (%v/v)
	4	2	—	10	—
M2	4	2	—	10	12
M3	4	—	2	10	—
M4	4	—	2	10	12
CNp-M4	4	—	2	10	12

In order to obtain the membranes, 10 g of each gel, prepared with the previously mentioned methodology, was poured into a Teflon cast 12 cm in diameter and left to dry into an oven (OAKTON Stable Temp, IL, USA) at 75.0 ± 0.5 °C for 3 h.

2.4.1. Preparation of Nanoparticle-Coated Alginate Membranes (CNp-M4)

The methodology described previously was followed to prepare our nanoparticle-coated alginate membrane (CNp-M4), but the vehicle utilized was a dispersion of CNp to obtain 0.01% w/v of curcumin instead of injectable water. In order to prepare the membranes, the gel obtained was poured into a Teflon cast and left to dry in an oven at 40.0 ± 0.5 °C for 4 h.

2.5. Physicochemical Characterization of Membranes

2.5.1. Swelling Test

Samples of M1, M2, M3, M4, and CNp-M4 membranes were cut to a size of 1 × 1 cm and weighed on pre-weighed aluminum trays. The samples were divided into five blocks, corresponding to different times as follows: 5, 10, 20, 30, and 60 min. The membranes on the trays were placed on a flat surface, and 750 µL of PBS 1X pH 7.4 was added to each sample.

Once the established time had elapsed, the trays were turned vertically for 2 min on absorbent paper, allowing the draining and absorption of the excess of PBS. After that time, the membranes in the trays were weighed again [18]. The assessment was performed in triplicate for each of the different times.

The swelling percentage (%S) was calculated using the following formula [19]:

$$\%S = \frac{M_s - M_d}{M_d} \times 100 \quad (3)$$

where M_s and M_d are the weight of the swollen membrane and dried membrane, respectively.

2.5.2. Mechanical Test

Tensile strength (TS) and the elongation at a break (%E) of M1, M2, M3, M4, and CNp-M4 were determined using a Sintech $\frac{1}{2}$ testing machine (MTS, USA), which was equipped with a 100-N load cell at a crosshead speed of 2.4 mm s^{-1} . Three samples of each formulation were cut into a dumbbell shape with a width of 10 mm and an effective length of 40 mm between the clamps at the beginning of the measurement. The thickness of each sample was measured using a Vernier at five different points before testing, and the average of these was employed for TS calculation. The load (Lb) and displacement (mm) of each film were recorded during the stretching. TS and %E were calculated by Equations (4) and (5), as published by Karki et al. [17]:

$$TS = \frac{F}{A} \quad (4)$$

$$\%E = \frac{D}{L} \times 100 \quad (5)$$

where TS is reported in MPa, F is the maximum load (N) required to break the film, and A is the initial cross-sectional area in mm^2 . In Equation (5), D is the displacement of the film elongation at the rupture and L is the initial length.

2.5.3. Thermogravimetric Analysis (TGA)

The thermal stability of the membranes (M4, CNp-M4), CNp, and curcumin was evaluated through TGA, employing a Hi-Res TGA 2950 Thermogravimetric Analyzer (Modulated TA Instruments, New Castle, DE, USA). In brief, 5 mg of each sample was analyzed starting at room temperature and increasing to $500 \text{ }^\circ\text{C}$ at a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ under a nitrogen atmosphere.

2.5.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The thermal properties of the membranes (M4, CNp-M4), CNp, and curcumin were determined with the DSC 2910 (Modulated TA Instruments, DE, USA). Lyophilized samples were placed in hermetic aluminum cells and evaluated starting at room temperature and increasing to $250 \text{ }^\circ\text{C}$ at a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ under a nitrogen atmosphere.

2.5.5. pH Values

The pH values of M1, M2, M3, M4, and CNp-M4 polymer gels was measured through a pH meter. The samples were put into contact with the electrode until a constant value was obtained. The pH meter was previously calibrated against standard solutions to ensure the highest level of accuracy.

2.5.6. Structure and Morphology of M4 and CNp-M4 Membranes

In order to analyze the structure and morphology of the membranes, samples were cut in a circular shape 1 cm in diameter and in a longitudinal section and were analyzed using a scanning electron microscope (Jeol-JCM 6000, MA, USA) at $100\times$ and $220\times$ magnification; then, photographs were taken in four different fields.

The pore diameter and membrane width were measured using a software package (ImageJ, MD, USA), and the average was calculated. Pore number was counted field-by-field, and the average was determined.

In order to evaluate the transparency of M4 and CNp-M4 membranes, samples were cut into a circular shape 3 cm in diameter and these were placed over an image (before swelling); then, they were observed and photographed. Afterward, 1 mL of PBS 1X was added to the samples, and after 20 min (swelling process), photographs were taken of the samples.

2.5.7. In Vitro Release Study of Drug Dispersion, CNp and CNp-M4 Membrane

To evaluate the curcumin release profile from the CNp and CNp-M4 membrane, the direct dispersion method was applied. For the drug and CNp dispersion, a certain amount of curcumin (and the equivalent in nanoparticles) was dissolved into PBS solution (pH 7.4, Pluronic® F-127 2% *w/v*), divided into sets of three tubes each, and placed in a shaker incubator, maintaining this at 37 °C. For the CNp-M4 membrane, disks 1 cm in diameter were placed in tubes with the PBS solution under the conditions previously described. At the defined times of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, and 48 h, one set of tubes was removed from shaking and centrifuged at 18,514 *g* for 30 min. The curcumin released in the supernatant was quantified by UV-Vis spectrophotometry at 420 nm.

The results of the release tests of CNp and CNp-M4 membrane were analyzed by mathematical models such as zero-order, first-order, the Higuchi model, and the Korsmeyer–Peppas model to predict the drug release mechanism.

2.6. Permeation Assays

2.6.1. Ex Vivo Permeation Assay

Porcine skin was obtained from the back of pig ears within 12 h after slaughter. The pig ears were cut into circular sections 3 cm in diameter. The excess of fat was removed with surgical scissors, and the samples were washed with saline solution. The samples were divided into three groups: drug dispersion with 0.01% *w/v* of curcumin (2 mL; *n* = 3), CNp dispersion with 0.01% *w/v* of curcumin (2 mL; *n* = 3), and CNp-M4 membranes (3 cm in diameter; *n* = 3).

The experiments were conducted in 12 independent Franz cells with a diffusion area of 7.07 cm². The freshly excised skin was placed into Franz cells, and the stratum corneum remained in contact with the donor compartment, with the dermis facing the receptor compartment. This was filled with 30 mL of 0.1 M PBS solution (pH 7.4) with 2.5% of Tween 80 and maintained under constant stirring at 400 rpm.

Franz cells were immersed in a water bath at a constant temperature of 37.0 ± 0.5 °C. At predetermined times (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 22, 24, 26, 28, and 30 h), 1000 µL of medium was removed from the receptor compartment and replaced with 1000 µL of fresh receptor medium.

At the end of the test, the skin samples were carefully removed from the Franz cells to conduct the tape-stripping test, following the in vivo permeation assay methodology (described in Section 2.6.2). All tapes were placed in a flask with 40 mL of acetone and mechanically stirred for 15 h. Subsequently, each skin sample was fragmented into small pieces using surgical scissors. The curcumin was extracted with 25 mL of ethyl acetate:methanol at a ratio of 9:1. The extract was centrifuged at 10,174 *g* for 10 min. All samples were analyzed by UV-visible spectrophotometry at a wavelength of 420 nm.

2.6.2. In Vivo Permeation Assay

To evaluate the in vivo permeation of the CNp-M4 membrane through the stratum corneum, the tape-stripping technique was employed. Four healthy Mexican males aged 22–36 years were recruited as volunteers. The individuals had neither a history of skin disorders nor had used cosmetic products on their forearms 24 h prior to the test. Written informed consent was obtained from each volunteer before each study.

Four sites (3 × 3 cm) were demarcated: two on the right forearm and two on the left forearm. Before administering the treatment, the sites were cleaned with cotton impregnated with water. Three treatments were administered to each volunteer. The CNp dispersion with 0.01% of curcumin (2 mL) and the drug dispersion at the same concentration were contained within a glass cylinder on

the left forearm. The CNp-M4 membrane (3 cm in diameter) was put on the right forearm, and 1.75 mL of distilled water was added onto the surface of the membrane. The last site on the right forearm was used for the blank. The treatments were in contact with the skin for 6 h [20]. Once the time had elapsed, the membrane was removed with steel nippers. The skin was subjected to 15 successive tape strips (Scotch® 3M®), previously cut into 3 × 3 cm squares. In each case, the site was pressed uniformly by sliding a spatula over the surface of the tape five times; then, it was removed by pulling it with steel nippers from the lower right to the upper left end. The blank site was subjected to the same procedure. Each tape was immersed in 15 mL of acetone in a different amber glass bottle with a lid. All of the bottles were placed under mechanical agitation for 15 h; subsequently, the samples were filtered to remove the glue particles. The quantification of curcumin was performed by UV-visible spectrophotometry at a wavelength of 420 nm. Each sample was analyzed in triplicate.

3. Results and Discussion

3.1. Physicochemical Characterization of CNp

3.1.1. Particle Size and Zeta Potential Assessment

CNps were obtained, and their mean particle size and PDI were 148.3 ± 1.9 nm and 0.044 ± 0.020 , respectively. These values were expected to improve dermal permeation [21], since nanoparticles below 500 nm have a larger surface area-to-volume ratio, which ensures direct contact with the stratum corneum and skin appendages [6,7]. Moreover, the PDI value was below 0.1, which indicates that the small size measured in the sample is reliable and monodisperse [22].

On the other hand, CNp exhibited a zeta potential value of -7.32 ± 0.03 mV. In this regard, zeta potential is commonly employed to measure the charge in the nanoparticles and/or electrostatic repulsion [1], and the literature indicates that nanoparticles are stable in suspension with a zeta potential above ± 30 mV [23]. Despite the CNp zeta potential value not being in this range, it should be considered that Pluronic® F-68 was added as a stabilizer of nanoparticles, which provides them with stability by means of a repulsion effect through a steric mechanism [24]. Likewise, CNp possesses a negative charge, which is related to the carboxylic end group of PCL [25]; thus, negatively charged nanoparticles could permeate adequately in conjunction with the negative charges existing on the skin [26].

3.1.2. Atomic Force Microscopy (AFM)

The morphology and size of CNp were evaluated by AFM. In agreement with the particle-size and zeta-potential assessments, the nanoparticles demonstrated a spherical shape and a size of approximately 200 nm with no agglomeration (Figure 1) [27]. These results support the idea that the small size of CNp could improve the dermal permeation of curcumin, which would increase its anti-inflammatory, antimicrobial, and wound-healing activities [6,12].

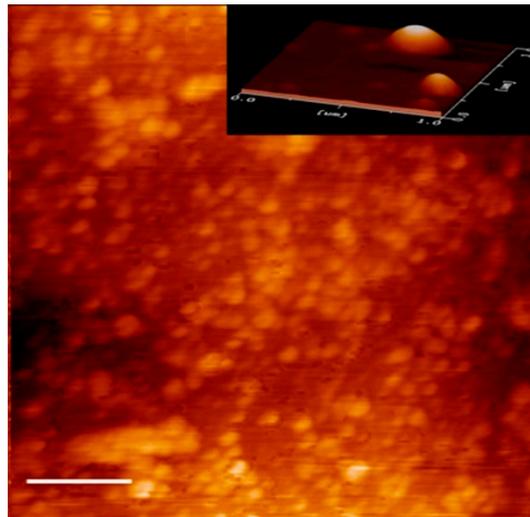


Figure 1. Atomic force microscopy (AFM) topography images of the CNp. The size bar is 1 μm .

3.1.3. Drug Loading and Entrapment Efficiency of Nanoparticles

In order to determine the amount of curcumin entrapped inside the CNp, the DL and EE were determined. The CNp showed DL and EE values of $4.9 \pm 0.7\%$ and $96.01 \pm 0.95\%$, respectively. It is known that the emulsification diffusion method ensures high encapsulation efficiencies (generally $>70\%$) [28]. On the other hand, DL depends on nanoparticle structure and methodology [29], whereas both DL and EE depend on the interactions between the drug, the matrix, and the medium [29].

3.2. Physicochemical and Mechanical Characterization of Nanoparticle-Coated Alginate Membranes as Wound Dressings

3.2.1. Swelling Test

From a practical point of view, the membranes should absorb the exudate from the wound and at the same time provide a moist environment that promotes healing. For this reason, the percentage of swelling of five different formulations was determined by weight difference (Figure 2).

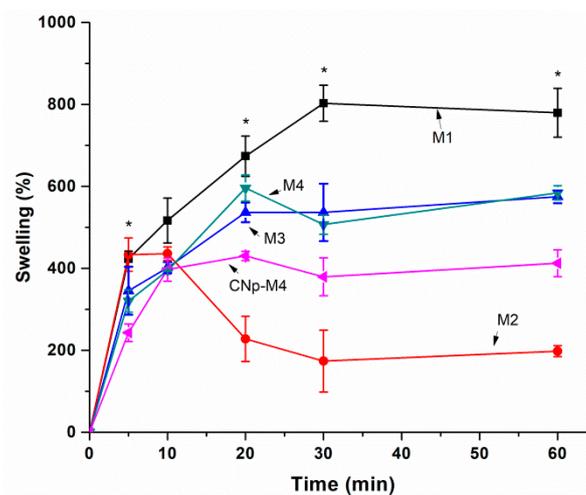


Figure 2. Percentage of swelling in alginate membranes as a function of time. Effect on swelling capacity by the addition of PVA + glycerin (M1), PVA + glycerin + propylene glycol (M2), PVP + glycerin (M3), PVP + glycerin + propylene glycol (M4), and CNp + PVP + glycerin + propylene glycol (CNp-M4) (mean \pm SE; $n = 3$). There were significant differences when ANOVA was applied at 5, 20, 30, and 60 min ($p < 0.05$).

Figure 2 depicts a difference at a time of 20 min, when propylene glycol is added to the formulation with PVA (M2) in comparison to M1; however, there is no significant difference between using or not using propylene glycol in the formulation combined with PVP (M3 and M4, respectively). In order to determine the differences in the percentage of swelling according to each formulation as a function of time, an ANOVA was performed. It was demonstrated that both the formulation and the time during which the membrane was exposed to PBS exerted a statistically significant effect on swelling with a 95% confidence level.

The formulation with the highest swelling value was M1, at 30 min ($802.8 \pm 76.0\%$), while the addition of propylene glycol (M2) decreased the swelling percentage after 10 min. On the other hand, M2 showed the lowest value in the swelling test before dissolving. The addition of propylene glycol to the polyvinyl alcohol mixture could increase the intermolecular interactions between both excipients via hydrogen bonds in the $-OH$ groups, favored by a wide steric disposition, but could decrease the entry capacity of water molecules and their interaction with alginate by saturation, decreasing the swelling ability. In the case of the interaction of propylene glycol and PVP, the situation could be the opposite. The interaction of both excipients is lower, resulting in a lower swelling capacity of the alginate; i.e., the excipient that determines the majority of the response. This phenomenon is confirmed with the profile observed for CNp-M4 in relation to M4.

Namely, when water enters the polymer matrix, the chains begin to relax, giving rise to the opening of the polymer networks. This promotes the penetration of more water; however, in the last stages of swelling, the diffusion coefficient is diminished because the chains are completely relaxed and near equilibrium [30].

The membranes began to dissolve after being exposed to PBS for a longer period of time. According to the composition of the medium, polymers undergo degradation and erosion processes. When a polymer degrades, the chains are cleaved into oligomers and subsequently monomers. The continuous loss of monomers will eventually lead to the phenomenon of erosion, which progressively changes the microstructure of the membrane through the formation of pores [31]. The combination of these processes could favor the possible application of our M4 and CNp-M4 membranes as wound dressings, because it would not be necessary to remove them from the application site, avoiding harm through injury and discomfort to the patient.

Moreover, the level of exudate from a wound (for example, an ulcer) can vary from absent (dry ulcer) to minimally exuding (<5 mL fluid per 24 h), to moderately exuding (5 to 10 mL fluid per 24 h), and finally to highly exuding (>10 mL fluid per 24 h) [32]. In this regard, the measurement of the swelling capacity of a wound dressing developed with alginate could be classified as dressings of low absorbance (alginate wound dressing that absorbs less than 6 g of liquid per g of dressing, or less than 12 g/100 cm²), and dressings of high absorbency (an alginate wound dressing that absorbs 6 g or more liquid per g of dressing, or 12 g or more/100 cm²) [33]. With this consideration, CNp-M4 possesses a value of 17.48 g/100 cm², corresponding to high absorbency and similar to several commercial products.

3.2.2. Mechanical Test

Wound dressings must be resistant and flexible for ease of handling [17]. Thus, the mechanical properties of the membranes are depicted in Figure 3. Formulations with PVA (M1 and M2) did not demonstrate a significant difference in %E with $73.54 \pm 0.87\%$ and $74.90 \pm 1.67\%$, respectively. TS was similar for M1, M2, and M3 samples with 1.32 ± 0.02 , 1.34 ± 0.01 , and 1.96 ± 0.05 MPa, respectively. By way of comparison, M1 and M2 membranes exhibited a lower TS and %E than the remaining formulations, probably due to PVA being a polymer that has been characterized as possessing poor elasticity, a rigid membrane, and low hydrophilic characteristics [34].

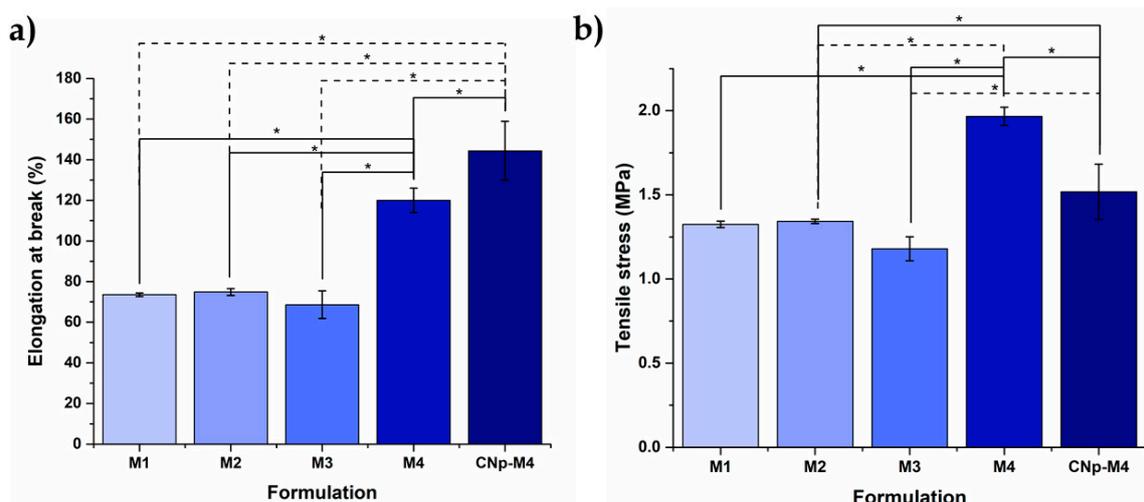


Figure 3. Effect of plasticizers on the mechanical properties of alginate membranes. Effect on mechanical properties by the addition of PVA + glycerin (M1), PVA + glycerin + propylene glycol (M2), PVP + glycerin (M3), PVP + glycerin + propylene glycol (M4), and CNp + PVP + glycerin + propylene glycol (CNp-M4), respectively. (a) Elongation at break; (b) tensile stress, (mean \pm SD; $n = 3$). * indicates $p < 0.05$ as statistically significant.

The %E and TS of M3 were $68.63 \pm 6.75\%$ and 1.18 ± 0.07 MPa, respectively; these values significantly increased with the addition of propylene glycol (M4), to $120.01 \pm 5.97\%$ and 1.96 ± 0.05 MPa, respectively. M4 exhibited the highest values in the assay and showed a significant difference with respect to the remaining formulations without CNp. This may be explained, at least in part, by the properties of propylene glycol, which is a plasticizer with a small molecular weight that is able to create multiple H-bonds with PVP and SA chains into a package and, consequently, aid in the formation of cross-linked networks [35].

Therefore, because of its greater swelling capacity and better mechanical properties, the M4 membrane (a mixture of sodium alginate, PVP, and propylene glycol) was chosen for the incorporation of CNp.

On the other hand, the mechanical properties of M4 were modified when CNp dispersion was added to the formulation. The %E of CNp-M4 showed the highest value, with $144.39 \pm 14.52\%$; in contrast, TS decreased to 1.52 ± 0.16 MPa. This could be due to the addition of CNp dispersion to the formulation decreasing the number of hydrogen bonds between the polymer molecular chains; as a result, less strength is necessary to break the membrane [36]. In comparison, CNp-M4 showed the highest %E, which could be due to the effect of Pluronic® F-68. The latter is a surfactant that decreases the pore number, providing a membrane with a homogeneous structure; thus, it is more resistant to changes, rendering higher elasticity properties.

3.2.3. Thermogravimetric Analysis (TGA)

It is important to determine the thermal properties of a substance, because these provide useful information for their identification and the characterization of materials. In Figure 4, thermograms of curcumin, CNp, M4, and CNp-M4 membranes are presented. For curcumin, mass loss was observed at 173°C by TGA (Figure 4a); due to the degradation of turmeric powder, water loss was not observed, possibly due to its high hydrophobicity [37]. The weight loss of CNp started at approximately 90°C , corresponding to dehydration, and there was a second plateau from 280 to 350°C , suggesting a better thermal stability for curcumin when it is inside PCL nanoparticles than when alone. However, CNp lost more weight in a smaller temperature range.

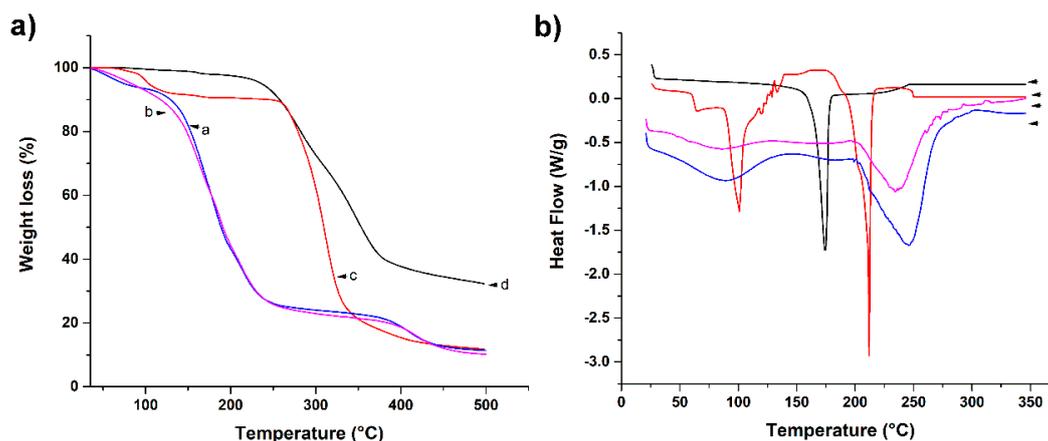


Figure 4. Thermal analysis of nanoparticle-coated alginate membrane using (a) thermogravimetric analysis (TGA) and (b) differential scanning calorimetry (DSC). The thermal properties of the M4 membrane, CNp-M4 membrane, CNp, and curcumin are represented as a, b, c, and d, respectively.

On the other hand, in the M4 membrane, the first mass loss occurred between 90 and 240 °C, whereas for the CNp-M4 sample, weight loss began between 100 and 240 °C. This could be due to the evaporation of water traces, the degradation of propylene glycol, PVP, glycerin (150–220 °C), and turmeric powder [38]. In the case of the CNp-M4 membrane, it presented a slighter weight loss compared to the M4 membrane. The second mass loss of both samples was between 270 and 425 °C; in this stage, the decomposition of the functional groups of SA polymer chains is presented. Finally, the last plateau in M4 and CNp-M4 membranes started at 425 °C, which corresponds to the degradation of the SA backbone [19]. In the same manner, the CNp-M4 membrane thermogram revealed a lower weight-loss temperature compared with that of CNp; this is probably because membrane formulation is a mixture that contains more substances than CNp. This is similar to the thermal behavior exhibited by curcumin and CNp.

3.2.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC is a technique used to determine the quantity of heat either absorbed or released when substances undergo physical or chemical changes [39]. In Figure 4b, DSC thermograms of curcumin, CNp, M4 membrane as vehicle, and CNp-M4 membrane are presented. The melting point of curcumin was found to be 174 °C (Table 2), which was expected with regard to the literature [40]. Furthermore, three thermal events were observed in the CNp: at 63.5; 101, and 212 °C. The first thermal event could correspond to the melting point of PCL (61 °C) [41], while events at 101 and 212 °C may indicate the presence of trehalose, which was employed as a cryoprotectant to lyophilize the CNp [42]. Interestingly, the melting point of curcumin was not detected in the CNp sample; this could be due to the high EE of curcumin inside PCL nanoparticles as a molecular dispersion.

Table 2. Thermal events of curcumin, CNp, and alginate membranes by DSC.

Sample	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m3} (°C)
Curcumin	174	—	—
CNp	63.5	101	212
M4	87	249	—
CNp-M4	87	233	—

On the other hand, both M4 and CNp-M4 membranes revealed two thermal events. The first peak was around 87 °C for both formulations, whereas the second peak was around 233 °C for the M4 membrane and 249 °C for the CNp-M4 membrane. The latter peaks were due to the presence of SA in

the formulation. A thermal peak prior to 100 °C was observed for both samples, possibly due to the presence of water in the membranes.

3.2.5. pH Determination

The pH values of all the polymer gels were 5.78 ± 0.06 , 5.76 ± 0.03 , 5.65 ± 0.01 , 5.97 ± 0.05 and 5.68 ± 0.03 for M1, M2, M3, M4, and CNp-M4, respectively. All of these values are acceptable because pH wound dressings must be neither acid nor alkaline in order to avoid skin irritation. Moreover, membrane pH is important to regulate the wound-healing process. The natural pH of the skin is within a range of 5–6, depending on the person, while the pH of the chronic wound oscillates in an alkaline range between pH 7 and 8, which increases susceptibility to wound infection.

3.2.6. Structure and Morphology of M4 and CNp-M4 Membranes

An ideal scaffold is expected to have a suitable microstructure (number of pores and pore size controlled) in order to transport nutrients, cells, metabolites, gases, and signaling molecules [43]. In this respect, pores were observed in the top of the membrane structure, which did not span the membrane (Figure 5a). However, it should be expected that the addition of water to the membranes (for example, from the wound exudate) promotes the total formation of pores through these. This would allow skin transpiration and an optimal environment for the wound.

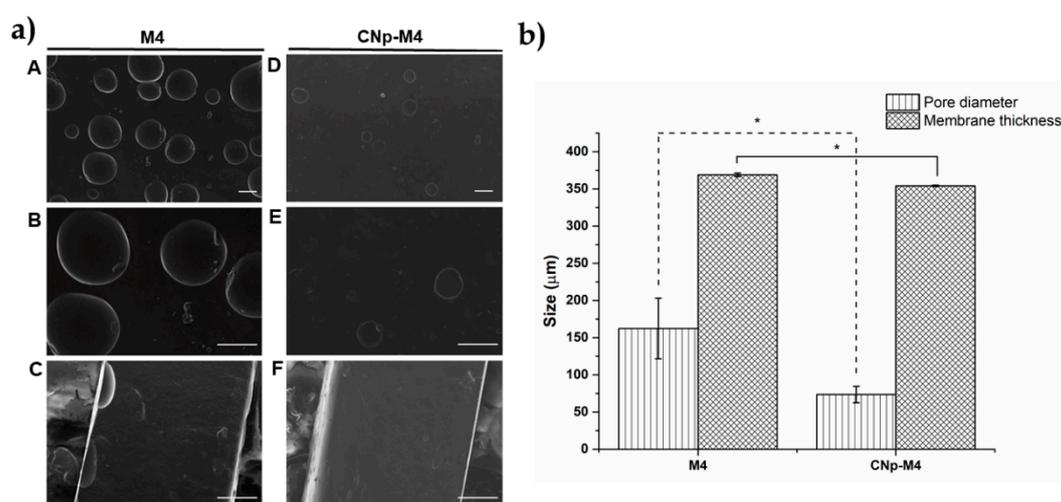


Figure 5. Morphology and porosity of alginate membranes. (a) Micrographs by scanning electronic microscopy of the alginate membrane surface (A, B, D, and E) and membrane thickness (C and F). Magnification of 100× for A, D; 220× in B, C, E and F; the scale bar is 100 μm; (b) pore diameter and membrane thickness of M4 and CNp-M4 membranes, mean ± SE, $n = 3$. * indicates that $p < 0.05$ is statistically significant.

On the other hand, the mean pore numbers in M4 and CNp-M4 membranes found in each 0.199 mm² were 4 and 2, respectively. The pore diameter in the M4 membrane was 162.25 ± 40.75 μm, while for CNp-M4 membranes, this was 73.43 ± 11.04 μm (Figure 5b). Moreover, M4 membranes were significantly thicker and more homogenous in structure than CNp-M4 membranes. These features could be due to the fact that CNp-M4 membranes have CNp dispersion in their formulation, which contains Pluronic® F-68, a nonionic surfactant used as a nanoparticle coating that decreases tensile surface in the polymer gel, thus reducing the number and size of the pores formed in the membranes [43].

Finally, transparency is an expected feature in our alginate membranes used as wound dressings, in order to observe the possible wound-healing process without removing the dressing. M4 and CNp-M4 membranes revealed a transparent feature prior to swelling, while CNp-M4 membranes

demonstrated a translucent feature during the swelling process (Figure 6). Although the latter was not completely transparent, it was possible to see through it.

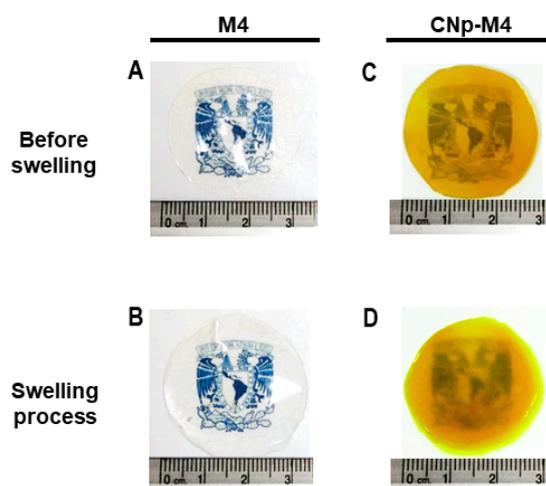


Figure 6. Alginate membranes (M4) before swelling and during the swelling process in PBS medium (A,B, respectively), and alginate membranes with curcumin nanoparticles (CNp-M4) before swelling and during the swelling process in PBS medium (C,D, respectively). Scale in centimeters.

3.2.7. In Vitro Release Study of Drug Dispersion, CNp and CNp-M4

To analyze the mechanism of drug release from the nanoparticles (CNp) and from the nanoparticles inside the membrane (CNp-M4), an in vitro release study was performed via the dispersion method and is presented in Figure 7. The curcumin release from CNp (red line, circle symbol) showed a low burst effect at 2 h; this behavior could be related to the presence of the curcumin released from the nanoparticles, as well as to the curcumin outside the nanoparticle, inside the border-zone matrix-stabilizer. After that, the release profile exhibited a linear behavior, with nearly 60% of the curcumin released after 48 h of study. Interestingly, in the release profile for CNp-M4 (blue line, triangle symbol), the burst effect was not evident, and a faster release than CNp (80% of curcumin released at 48 h) was found. These behaviors may be due to the interaction among the membrane excipients, the solvents, and the nanoparticles. To elaborate the CNp-M4 membrane (Section 2.4.1), the nanoparticles are in contact with water, and the hydrolysis of CNp could be stimulated. In addition, some excipients, such as glycerin and propylene glycol, are co-solvents that could improve the prior solubilization of curcumin. As can be observed, the release from both the CNp and CNp-M4 membrane was considerably slower than the drug dispersion release (black line, square symbol).

In order to investigate the mechanism of curcumin release from CNp and CNp-M4, different mathematical models were applied (Table 3). The CNp data were fixed with the Higuchi model ($A = 0.0852$, $B = -0.0459$, $R^2 = 0.9551$), according to those previously reported [44]. This model describes the release of the drug by diffusion from the nanoparticle core into the external solution. On the other hand, the release from CNp-M4 could be explained with the Korsmeyer–Peppas model, due to the highest squared-correlation-coefficient value being obtained with this method ($A = 0.3119$, $B = -0.5609$, $R^2 = 0.9536$). This model combines the diffusion and erosion mechanisms of the nanoparticles as the explanation for drug release.

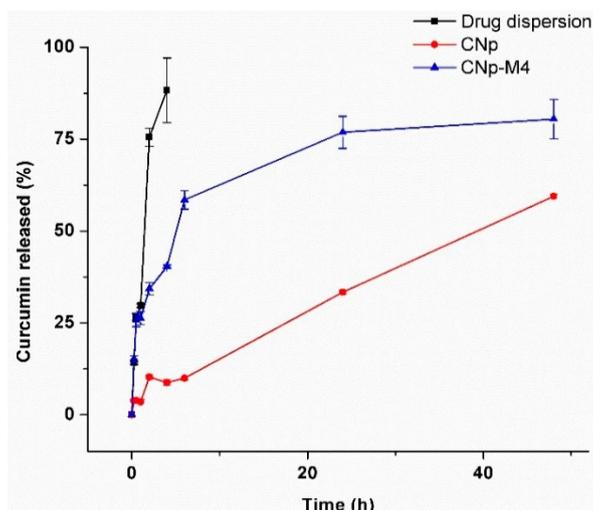


Figure 7. Release profile of curcumin from the drug dispersion, CNp and CNp-M4 membrane in PBS pH 7.4 (0.1 M, Pluronic® F-127 2% *w/v*) at 37 °C. Each point represents the mean \pm SE, $n = 3$.

Table 3. Squared of the correlation coefficient (R^2) and coefficients obtained after the linear regression of release data from CNp and CNP-M4 utilizing four mathematical models.

Mathematical Model	Equation	CNp			CNP-M4		
		R^2	A	B	R^2	A	B
Zero-order	$Q_t = Q_0 + K_0t$	0.842	0.5264	4.7385	0.7358	1.2362	31.432
First-order	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1t$	0.8436	-0.0066	-2.3991	0.8453	-0.0303	-3.1975
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$	0.9551	0.0852	-0.0459	0.8939	0.1017	0.194
Korsmeyer–Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_K t^n$	0.9037	0.5422	-1.2655	0.9536	0.3119	-0.5609

Q_t : amount of drug released in time t ; Q_0 : initial amount of drug in the dosage form; Q_∞ : total amount of drug dissolved when the dosage form is exhausted; K_0 , K_1 , K_H , K_K : release rate constants; R^2 : squared correlation coefficient. $y = ax \pm b$ is an equation obtained after regression: a , slope and b , linear coefficient.

3.3. Curcumin Permeation Assays

3.3.1. Ex Vivo Permeation

An ideal system for potential use in chronic diseases with a slow healing process, such as wounds or psoriasis, should exhibit sustained drug release in order to allow permeation through the skin [20,45]. In this regard, the alginate membranes developed in our study possess polymeric networks as a structure, as well as the curcumin encapsulated in PCL nanoparticles dispersed within these networks. These features will allow the slow release of curcumin.

An ex vivo permeation study was conducted to determine the distribution of the drug and CNp throughout the stratum corneum, epidermis, and dermis, and to verify whether curcumin can pass through the skin and reach blood circulation after the administration of CNp-M4 and CNp formulations. With respect to the aqueous dispersion of curcumin (Figure 8), due to the high lipophilic character of the drug, a high accumulation was observed in some superficial layers of the stratum corneum ($10.04 \pm 1.73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Interestingly, permeation comprises a considerable amount, even from the application of a curcumin dispersion in water, which involves solid particle clusters. This means that the drug particles engage in a dissolution process with the oily components of the stratum corneum, leading to their brief permeation in the superficial region. Although the values are high, there is a higher efficiency of permeation with CNp ($14.80 \pm 1.61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). In the region of the dermis, with a hydrophilic character, the permeated amount of the drug dispersion decreases considerably due to its

highly limited solubility in aqueous media ($2.40 \pm 0.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$); this is nearly one third in relation to the CNp value ($6.99 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). No detection was recorded for the dispersion of the drug that could completely permeate the skin. According to Figure 8, a significant difference was observed between CNp dispersion and CNp-M4 membrane treatments, with the highest permeation values observed for CNp. The CNp-M4 membrane treatment revealed the highest amount of curcumin retained in the epidermis and dermis—that is, $5.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($1.620 \pm 0.051\%$ of the total concentration of curcumin)—and the lowest concentration was found in the stratum corneum (SC), at $0.65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($0.140 \pm 0.006\%$). On the other hand, in the CNp dispersion treatment, curcumin was found mostly in the SC; that is, $14.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($2.62 \pm 0.49\%$) [26], the highest curcumin value in the entire assay.

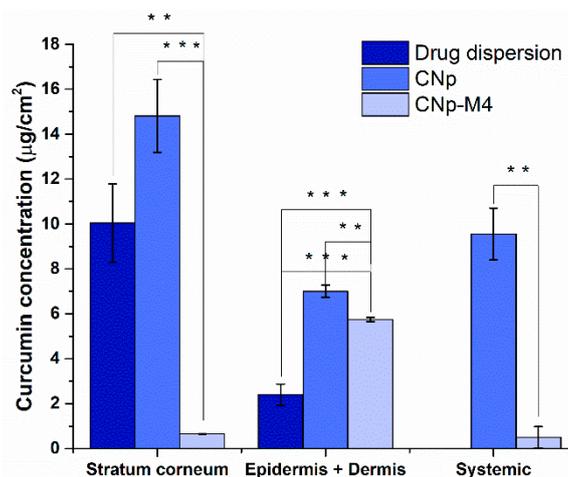


Figure 8. Ex vivo permeation of curcumin after 30 h of treatment with drug dispersion, CNp dispersion, or CNp-M4 membrane. Stratum corneum-bound particles (obtained from 15 tape strips), epidermis + dermis (surface on which dosed skin was handled after 30 h), and systemic (receptor compartment), mean \pm SE, $n = 4$; ** indicates $p < 0.01$ and *** indicates $p < 0.001$ as statistically significant.

There was also a significant difference in the amount of curcumin that crossed through the skin (which, in an in vivo model, means reaching the systemic circulation), since the concentration derived from the CNp-M4 membrane was significantly lower than CNp (0.32% and 2.04% respectively; p -value = 0.0019).

The aqueous system of CNp dispersion permitted the curcumin to permeate through the dermis and completely cross the skin. Moreover, CNPs have a negative charge; negatively charged nanoparticles permeate the skin more rapidly than positively charged nanoparticles. The skin is predominately negatively charged, and the electrostatic interaction of positive particles with the negatively charged molecules in the skin matrix slows particle diffusion [26]. However, curcumin from CNp-M4 membranes diffuses more slowly through the skin than that from CNp. These observations may be due to the fact that, in the CNp dispersion, water was used as the medium. Water affects the absorption rates of different substances through the stratum corneum, which is in a constant state of partial hydration under normal conditions. Thus, when immersed in water, dead keratinocytes quickly absorb it, resulting in the pruning effect of the skin [45]. Furthermore, water in contact with skin creates a flow gradient toward the skin's inner layers, since the inside of the stratum corneum is more hydrated than the surface [46]. On the other hand, the CNp-M4 membrane does not have a liquid medium in the interface that allows the nanoparticles to flow easily into the deep layers, such as water in the case of the CNp dispersion. Despite this, for the CNp-M4 membrane, a modulated release is expected because of the degree of swelling of the membrane in response to the presence of exudate. The swelling would permit the relaxation of the polymer chains and the release from the CNp. Otherwise, diffusion from a solid state (CNp-M4) into a semi-solid state (the skin) would be expected. Therefore, the CNp-M4 membrane represents a prolonged release system.

In addition, the skin possesses furrows, in which a considerable amount of curcumin is retained, which could not be extracted with the application of adhesive tapes [47]. This curcumin was quantified until mechanical disaggregation. This could explain why the epidermis and dermis had the highest concentration of the drug.

On the other hand, particle size is an important factor in obtaining the desired therapeutic effect, because nanoparticles with a small size can more easily permeate the physiological barriers; moreover, due to their greater surface, release of the drug is favored [48]. Thus, it should be expected that CNps, with their small size (148.3 nm), and the surfactant effect of Pluronic® F-68 can permeate intercellularly and through hair follicles, favoring accumulation for several hours. In the same way, due to the contact of nanoparticles with the corneocytes of the skin, as well as the prolonged release thereof, a large amount of curcumin was found to be retained in the dermis [24,27]. Although after 30 h the majority of curcumin remained in the stratum corneum when CNp dispersion was applied, the monitoring of the permeation at longer times could allow the observation of a prolonged release system [49]. Therefore, the CNp-M4 membrane is proposed as a functional prolonged release system for drug delivery in chronic diseases; however, it would be necessary to perform a more prolonged test to observe the diffusion of the drug at a greater proportion.

3.3.2. Permeation Assay in Vivo

In order to evaluate the in vivo skin permeation of curcumin from the CNp-M4 membrane, CNp dispersion [20], and drug dispersion, a quantification of the curcumin deposited in the stratum corneum by UV-Vis spectrophotometry was performed. The results are presented in Figure 9, according to the work of Goto et al. [50].

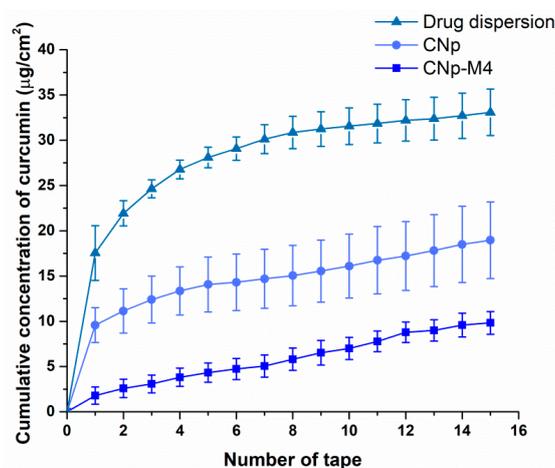


Figure 9. Cumulative concentration of curcumin quantified in the stratum corneum of healthy volunteers. Drug extraction from 15 adhesive tapes applied to the treatment site after placing a CNp-M4 membrane, CNp dispersion, or drug dispersion for 6 h (mean \pm SE; $n = 4$).

Higher permeation values were observed for the drug dispersion in water compared to the CNp and CNp-M4 membrane, at least in the superficial layers of the stratum corneum, where the tape stripping technique is applied. The higher values of drug permeation could correspond to the high lipophilicity value of the drug, structural symmetry, and low molecular weight. These values coincide with Figure 8: greater drug deposition on the stratum corneum surface, a lower proportion in the dermis due to an inadequate hydrophilic–lipophilic balance, and no recorded quantity that completely permeates the skin. At 6 h after the application of the drug dispersion, CNp-M4 membrane, and CNp dispersion, the curcumin measured in the stratum corneum reached 33.08 ± 2.57 , 9.82 ± 4.23 , and 18.96 ± 1.25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively [25]. CNp-M4 remained well adhered during the study, even up to 48 h in other volunteers (data not shown). As can be noted, a greater amount of curcumin was observed in the stratum corneum when the CNp dispersion treatment was applied, compared with the

CNp-M4 membrane. This is because, in the CNp-M4 membrane, the nanoparticles must be released from the polymeric matrix. This result suggests our formulation as a system of prolonged release that may be useful for long treatments, such as that for a wound (for example, for 7–14 days of application until closure of the lesion). It is noteworthy that the smallest variation observed in permeation values with the CNp-M4 treatment reveals a system that allows better gradual control release. Moreover, these nanoparticles also possess a stabilizer on the outside, Pluronic® F-68, which interacts through hydrogen bonds with the -OH groups of plasticizers and polymers used in the formulation. Thus, when the water makes contact with the membrane, the external part of the polymers swells and promotes the drug—in this case, CNp—to flow outward, permitting its release [51].

With respect to the CNp dispersion, the nanoparticles are free in the medium; thus, they interact more easily with the stratum corneum. Curcumin is encapsulated and uniformly distributed in the PCL nanoparticles, forming nanospheres [52]. The release of curcumin from these latter will depend on the solubility of the drug, the diffusion of curcumin through the matrix of the nanoparticles, the desorption of curcumin from PCL, the erosion or degradation of the matrix of the nanoparticles, and on the combination of the erosion and diffusion processes [23]. It is also known that, under physiological conditions, a random cleavage of PCL ester bonds occurs, which produces a destabilization of the polymer matrix of the CNp, inducing the release of curcumin [25].

Finally, many studies have reported an accumulation of nanoparticles in hair follicles and the pilosebaceous glands in *ex vivo* skin experiments [49]. In the same manner, it has been reported that there is better permeation of the drug into the skin, as well as greater absorption in areas with high hair-follicle density. The hair follicle can become a reservoir of substances comparable to the stratum corneum [53]. This means that drugs will penetrate better through the skin of a person with greater amounts of hair follicles. This may explain slight variations in the results obtained, together with variability among individuals (age, body mass, color, and skin moisturization).

4. Conclusions

In this study, the development of a new wound dressing for possible application in wound healing was demonstrated. The wound dressing comprises an alginate membrane and PCL nanoparticles stabilized with Pluronic® F-68 with curcumin inside. This new system was designed with a mixture of aqueous plasticizers to confer high-strength mechanical properties. The characterization of the formulation exhibited that it possesses a high absorbency capacity for the removal of possible exudates, transparency for monitoring the wound bed, the presence of pores with controlled dimensions that could facilitate the transpiration of the wound as a synthetic skin substitute, and the gradual release of the drug according to the *ex vivo* and *in vivo* studies. In addition, the high adherence of the wound dressing should be noted even in dry skin, as well as its degradation at later times. Therefore, all of these advantages reveal our wound dressing as a good option for wound healing without the need for its removal from the patient.

Author Contributions: Conceptualization, G.L.-G.; methodology, M.C.G.-A., R.A.M.-F., and M.L.D.P.-A.; validation, I.H.C.-F., C.D.F.-H., and B.F.; formal analysis, M.C.G.-A., R.A.M.-F., M.L.D.P.-A., and G.L.-G.; investigation, M.C.G.-A., R.A.M.-F., and G.L.-G.; resources, M.C.G.-A., R.A.M.-F., M.L.D.P.-A., and G.L.-G.; data curation, M.C.G.-A., R.A.M.-F., M.L.D.P.-A., Z.U.-M., H.C., and G.L.-G.; writing—original draft preparation, M.C.G.-A., R.A.M.-F., M.L.D.P.-A., Z.U.-M., H.C., and G.L.-G.; writing—review and editing, M.C.G.-A., R.A.M.-F., Z.U.-M., D.M.G.-G., J.J.M., M.G.-T., O.D.R.-H., G.F.-G., I.H.C.-F., C.D.F.-H., B.F., H.C., and G.L.-G.; visualization, G.L.-G.; supervision, M.L.D.P.-A., Z.U.-M., H.C., and G.L.-G.; project administration, M.L.D.P.-A. and G.L.-G.; funding acquisition, G.L.-G.

Funding: This research was funded by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (Becas Posdoctorales, PAPIIT TA 200318) and CONACYT A1-S-15759.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Eming, S.A.; Brachvogel, B.; Odorisio, T.; Koch, M. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Prog. Histochem. Cytochem.* **2007**, *42*, 115–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Demidova-Rice, T.N.; Hamblin, M.R.; Herman, I.M. Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. *Adv. Skin Wound Care* **2013**, *25*, 304–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Axibal, E.; Brown, M. Surgical Dressings and Novel Skin Substitutes. *Dermatol. Clin.* **2019**, *37*, 349–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Aderibigbe, B.A.; Buyana, B. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Morgado, P.I.; Aguiar-Ricardo, A.; Correia, I.J. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship. *J. Memb. Sci.* **2015**, *490*, 139–151. [[CrossRef](#)]
6. Mi, F.L.; Wu, Y.B.; Shyu, S.S.; Chao, A.C.; Lai, J.Y.; Su, C.C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: A new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *J. Memb. Sci.* **2003**, *212*, 237–254. [[CrossRef](#)]
7. Priya, S.G.; Gupta, A.; Jain, E.; Sarkar, J.; Damania, A.; Jagdale, P.R.; Chaudhari, B.P.; Gupta, K.C.; Kumar, A. Bilayer Cryogel Wound Dressing and Skin Regeneration Grafts for the Treatment of Acute Skin Wounds. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 15145–15159. [[CrossRef](#)]
8. Miguel, S.P.; Moreira, A.F.; Correia, I.J. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *127*, 460–475. [[CrossRef](#)]
9. Sood, A.; Granick, M.S.; Tomaselli, N.L. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Adv. Wound Care* **2014**, *3*, 511–529. [[CrossRef](#)]
10. Aggarwal, B.B.; Harikumar, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 40–59. [[CrossRef](#)]
11. Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Čipak, A.; Duburs, G.; Horáková, L.; Łuczaj, W.; Majekova, M.; Odysseos, A.D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E.; et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 1216–1262. [[CrossRef](#)]
12. Del Prado-Audelo, M.L.; Caballero-Florán, I.H.; Meza-Toledo, J.A.; Mendoza-Muñoz, N.; González-Torres, M.; Florán, B.; Cortés, H.; Leyva-Gómez, G. Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. *Biomolecules* **2019**, *9*, 56. [[CrossRef](#)]
13. Sidhu, G.S.; Singh, A.K.; Thaloor, D.; Banaudha, K.K.; Patnaik, G.K.; Srimal, R.C.; Maheshwari, R.K. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen.* **1998**, *6*, 167–177. [[CrossRef](#)]
14. Thangapazham, R.L.; Sharad, S.; Maheshwari, R.K. Skin regenerative potentials of curcumin. *Biofactors* **2013**, *39*, 141–149. [[CrossRef](#)]
15. Yallapu, M.M.; Jaggi, M.; Chauhan, S.C. Curcumin nanoformulations: A future nanomedicine for cancer. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 71–80. [[CrossRef](#)]
16. Quintanar-guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113–1128. [[CrossRef](#)]
17. Karki, S.; Kim, H.; Na, S.; Shin, D.; Jo, K.; Lee, J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **2016**, *11*, 559–574. [[CrossRef](#)]
18. Golafshan, N.; RezaHasani, R.; Tarkesh Esfahani, M.; Kharaziha, M.; Khorasani, S.N. Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *176*, 392–401. [[CrossRef](#)]
19. Song, Y.; Jiang, Z.; Gao, B.; Wang, H.; Wang, M.; He, Z.; Cao, X.; Pan, F. Embedding hydrophobic MoS₂nanosheets within hydrophilic sodium alginate membrane for enhanced ethanol dehydration. *Chem. Eng. Sci.* **2018**, *185*, 231–242. [[CrossRef](#)]
20. Mao, K.; Fan, Z.; Yuan, J.; Chen, P.; Yang, J.; Xu, J. Skin-penetrating polymeric nanoparticles incorporated in silk fibroin hydrogel for topical delivery of curcumin to improve its therapeutic effect on psoriasis mouse model. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *160*, 704–714. [[CrossRef](#)]

21. Kamar, S.S.; Abdel-Kader, D.H.; Rashed, L.A. Beneficial effect of Curcumin Nanoparticles-Hydrogel on excisional skin wound healing in type-I diabetic rat: Histological and immunohistochemical studies. *Ann. Anat.* **2019**, *222*, 94–102. [[CrossRef](#)]
22. Clayton, K.N.; Salameh, J.W.; Wereley, S.T.; Kinzer-Ursem, T.L. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics* **2016**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)]
23. Singh, R.; Lillard, J.W., Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, *86*, 215–223. [[CrossRef](#)]
24. Moghimi, S.M.; Hunter, A.C. Good Review on Poloxamers and Poloxamines in Pharma. *Elsevier* **2000**, *18*, 412–420.
25. Ramanujam, R.; Sundaram, B.; Janarthanan, G.; Devendran, E.; Venkadasalam, M.; John Milton, M.C. Biodegradable Polycaprolactone Nanoparticles Based Drug Delivery Systems: A Short Review. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* **2018**, *15*, 679–685. [[CrossRef](#)]
26. Kraeling, M.E.K.; Topping, V.D.; Keltner, Z.M.; Belgrave, K.R.; Bailey, K.D.; Gao, X.; Yourick, J. In vitro percutaneous penetration of silver nanoparticles in pig and human skin. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *95*, 314–322. [[CrossRef](#)]
27. Quintanar-Guerrero, D.; de la Luz Zambrano-Zaragoza, M.; Gutierrez-Cortez, E.; Mendoza-Munoz, N. Impact of the emulsification-diffusion method on the development of pharmaceutical nanoparticles. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6*, 184–194. [[CrossRef](#)]
28. Pinto Reis, C.; Neufeld, R.J.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F.; Nanoencapsulation, I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2006**, *2*, 8–21. [[CrossRef](#)]
29. Judefeind, A.; de Villiers, M.M. *Nanotechnology in Drug Delivery*; de Villiers, M.M., Aramwit, P.S., Kwon, G., Eds.; Springer US: New York, NY, USA, 2009; ISBN 9780387776675.
30. Singh, B.; Pal, L. Radiation crosslinking polymerization of sterculia polysaccharide-PVA-PVP for making hydrogel wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48*, 501–510. [[CrossRef](#)]
31. Göpferich, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **1996**, *17*, 103–114. [[CrossRef](#)]
32. GD, M. Quantifying wound fluids for the clinician and researcher. *Ostomy Wound Manag.* **1994**, *40*, 66–69.
33. Parikh, D.V.; Fink, T.; Delucca, A.J.; Parikh, A.D. Absorption and swelling characteristics of silver (I) antimicrobial wound dressings. *Text. Res. J.* **2011**, *81*, 494–503. [[CrossRef](#)]
34. Kamoun, E.A.; Kenawy, E.S.; Chen, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J. Adv. Res.* **2017**, *8*, 217–233. [[CrossRef](#)]
35. Shi, S.; Peng, X.; Liu, T.; Chen, Y.N.; He, C.; Wang, H. Facile preparation of hydrogen-bonded supramolecular polyvinyl alcohol-glycerol gels with excellent thermoplasticity and mechanical properties. *Polymer* **2017**, *111*, 168–176. [[CrossRef](#)]
36. Wang, R.-M.; Zheng, S.-R.; Zheng, Y.-P. Matrix materials. In *Polymer Matrix Composites and Technology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 101–548.
37. Sun, B.; Tian, Y.; Chen, L.; Jin, Z. Food Hydrocolloids Linear dextrin as curcumin delivery system: Effect of degree of polymerization on the functional stability of curcumin. *Food Hydrocoll.* **2018**, *77*, 911–920. [[CrossRef](#)]
38. Campus, K.; Kanchanaburi, M.L.; Road, S. Nanocomposites Based on Cassava Starch and Chitosan-Modified Clay: Physico-Mechanical Properties and Biodegradability in Simulated Compost Soil. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *28*, 649–658.
39. Aghazadeh, M.; Karim, R.; Abdul Rahman, R.; Sultan, M.T.; Johnson, S.K.; Paykary, M. Effect of Glycerol on the Physicochemical Properties of Cereal Starch Films. *Food Technol. Econ. Eng. Phys. Prop.* **2018**, *36*, 403–409. [[CrossRef](#)]
40. Shrotriya, S.; Ranpise, N.; Satpute, P.; Vidhate, B. Skin targeting of curcumin solid lipid nanoparticles-engrossed topical gel for the treatment of pigmentation and irritant contact dermatitis. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, 1471–1482. [[CrossRef](#)]
41. Kossack, W.; Kremer, F. Banded spherulites and twisting lamellae in poly- ϵ -caprolactone. *Colloid Polym. Sci.* **2019**, *297*, 771–779. [[CrossRef](#)]
42. Verhoeven, N.; Neoh, T.L.; Furuta, T.; Yamamoto, C.; Ohashi, T.; Yoshii, H. Characteristics of dehydration kinetics of dihydrate trehalose to its anhydrous form in ethanol by DSC. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1638–1643. [[CrossRef](#)]

43. Bueno, C.Z.; Moraes, Â.M. Development of Porous Lamellar Chitosa-Alginate Membranes: Effect of Different Surfactants on Biomaterial Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *122*, 624–631. [[CrossRef](#)]
44. Del Prado-Audelo, M.L.; Magaña, J.J.; Mejía-Contreras, B.A.; Borbolla-Jiménez, F.V.; Giraldo-Gomez, D.M.; Piña-Barba, M.C.; Quintanar-Guerrero, D.; Leyva-Gómez, G. In vitro cell uptake evaluation of curcumin-loaded PCL/F68 nanoparticles for potential application in neuronal diseases. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *52*, 905–914. [[CrossRef](#)]
45. Blattner, C.M.; Coman, G.; Blickenstaff, N.R.; Maibach, H.I. Percutaneous absorption of water in skin: A review. *Rev. Environ. Health* **2014**, *29*, 175–180. [[CrossRef](#)]
46. Tagami, H.; Kanamaru, Y.; Inoue, K.; Suehisa, S.; Iwatsuki, K.; Yoshikuni, K.; Yamada, M. Water sorption-desorption test of the skin in vivo for functional assessment of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 425–428. [[CrossRef](#)]
47. Van der Molen, R.; Spies, F.; van't Noordende, J.M.; Boelsma, E.; Mommaas, A.M.; Koerten, H.K. Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin. *Arch. Dermatol. Res.* **1997**, *289*, 514–518. [[CrossRef](#)]
48. Kucukturmen, B.; Oz, U.C.; Bozkir, A. In Situ Hydrogel Formulation for Intra-Articular Application of Diclofenac Sodium-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Turk. J. Pharm. Sci.* **2017**, *14*, 56–64. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, N.; Said, A.; Wischke, C.; Kral, V.; Brodewolf, R.; Volz, P.; Boreham, A.; Gerecke, C.; Li, W.; Neffe, A.T.; et al. Poly[acrylonitrile-co-(N-vinyl pyrrolidone)] nanoparticles—Composition-dependent skin penetration enhancement of a dye probe and biocompatibility. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 66–75. [[CrossRef](#)]
50. Goto, N.; Morita, Y.; Terada, K. Deposits from Creams Containing 20% (w/w) Urea and Suppression of Crystallization (Part 2): Novel Analytical Methods of Urea Accumulated in the Stratum Corneum by Tape stripping and Colorimetry. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 1092–1098. [[CrossRef](#)]
51. Langer, R. New Methods of Drug Delivery. *Science* **1990**, *249*, 1527–1533. [[CrossRef](#)]
52. Urrejola, M.C.; Soto, L.V.; Zumarán, C.; Peñaloza, P.; Álvarez, B.; Fuentesvilla, I.; Haidar, Z.S. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *Int. J. Morphol.* **2018**, *36*, 1463–1471. [[CrossRef](#)]
53. Lademann, J.; Richter, H.; Teichmann, A.; Otberg, N.; Blume-Peytavi, U.; Luengo, J.; Weiß, B.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.M.; Wepf, R.; et al. Nanoparticles—An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 159–164. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).