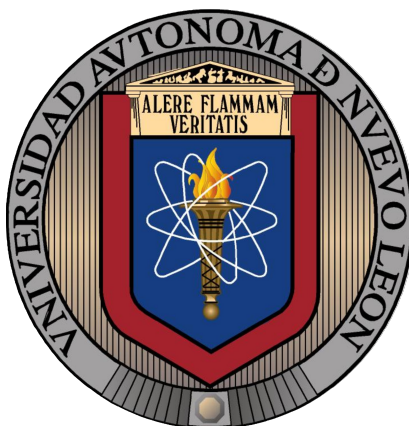


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



“EFECTO ANTIMICROBIANO EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE MEMBRANAS
A BASE DE POLIVINILPIRROLIDONA Y ACETATO DE CELULOSA
ELABORADAS POR ELECTROSPINNING Y ACTIVADAS CON NISINA”

PRESENTA:

LBG HÉCTOR DANIEL LÓPEZ CALDERÓN.

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Nombres y Firmas del Comité de Tesis

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Director de Tesis (Presidente)

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Secretario

Dra. Lila H. Morales Ramos
Vocal

Dra. María del Socorro Flores González
Vocal

Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal

Dra. Liliana Licea Jiménez
Asesor Externo

LBG Héctor Daniel López Calderón



“EFECTO ANTIMICROBIANO EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE MEMBRANAS
A BASE DE POLIVINILPIRROLIDONA Y ACETATO DE CELULOSA
ELABORADAS POR ELECTROSPINNING Y ACTIVADAS CON NISINA”

El presente trabajo se realizó en el laboratorio L1 del Instituto de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en conjunto con el Centro de Investigación en Materiales Avanzados. El proyecto fue dirigido por la Dra. Katiushka Arévalo Niño y se contó con el apoyo de los doctores que conforman el comité de tesis.

***Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano.
-Isaac Newton.***

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas de formas varias, opinando, corrigiendo teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en aquellos de felicidad. Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas, a quienes deseo agradecer en este apartado.

Primeramente a mi directora de tesis, la Dra. Katiushka Arévalo Niño, mi más enorme agradecimiento por haberme permitido realizar este trabajo. Muchas gracias por su paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y por su apoyo para poder realizar este trabajo.

A la Dra. Liliana Licea y la Dra. Adriana Rangel por otorgarme la oportunidad de aprender de ustedes. Gracias por sus consejos, su conocimiento y todo el apoyo que me brindaron para poder llevar a cabo este trabajo de investigación.

Mil gracias a todos los integrantes del L1, quienes durante estos años han estado para apoyarme en los momentos de dudas y haciendo de mi estancia en el instituto una maravillosa experiencia. Eugenia, Mayra, Julián, Omar y a todos aquellos con los que compartí los espacios y horas de trabajo, gracias por el espíritu de grupo. Les agradezco por toda su paciencia para resolver mis dudas cada vez que lo necesitaba, por sus ideas y aportaciones al proyecto, y por sobre todo, gracias por hacerme sentir bienvenido en el laboratorio.

A mis amigos con quienes he compartido mis dudas y quienes me han brindado su tiempo, especialmente a Noé, por las conversaciones científicas de las que he sacado provecho. A ustedes muchas gracias por su respaldo y su amistad.

Esto nunca hubiese sido posible sin el apoyo y el cariño otorgado por mi familia. A mi padre quien me ayudó en muchos aspectos, tanto personalmente como también el entender temas que se me dificultaban. A mi hermano Enrique, por todos esos momentos

de presión en los que siempre estaba para tranquilizarme y poder continuar. A mi hermosa madre, quien ha sido, es y será siempre mi modelo a seguir, quien me ha ayudado tanto para poder crecer y a quien jamás he de poder pagar todo lo que me ha dado, por su apoyo y guía en diversos aspectos que me han permitido llegar a este punto en mi vida. Estoy eternamente agradecido por tenerlos a ustedes.

Finalmente quiero agradecer a quien me ha aguantado durante estos años, en mis buenos y malos momentos, por estar ahí para escucharme y compartir frustraciones y alegrías. Siempre ha estado ahí en lo bueno y en lo malo, siempre para brindarme ánimos y la confianza para seguir trabajando. Muchas gracias Sofía.

A todos ustedes que de una u otra forma han formado parte de estos años, mi mayor reconocimiento.

Gracias.

ÍNDICE

1 RESUMEN	13
2 INTRODUCCIÓN	15
3 ANTECEDENTES	17
3.1 Historia Del Electrospinning	17
3.2 Principio Del Electrospinning	18
3.3 Parámetros	20
3.3.1 Parámetros de la solución	20
3.3.1.1 Peso Molecular del Polímero	20
3.3.1.2 Concentración	21
3.3.1.3 Viscosidad	21
3.3.1.4 Tensión Superficial	21
3.3.1.5 Conductividad	22
3.3.2 Parámetros del proceso	22
3.3.2.1 Voltaje Aplicado	22
3.3.2.2 Flujo	23
3.3.2.3 Distancia al colector	23
3.3.3 Parámetros Ambientales	23
3.4 Polímeros Empleados en Electrospinning	24
3.4.1 Polivinilpirrolidona (PVP)	25
3.4.2 Acetato De Celulosa (AC)	26
3.4.3 Mezcla De Polivinilpirrolidona y Acetato De Celulosa (PVP/AC)	27
3.5 Aplicaciones De Las Fibras Generadas Por Electrospinning	28
3.5.1 Ingeniería de tejidos	28
3.5.2 Tratamiento de infecciones epidérmicas	29
3.6 Bacteriocinas	33
3.7 Quemaduras En Piel	35
4 DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:	38
5 HIPOTESIS:	39
6 OBJETIVO GENERAL:	40
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES:	40
7 MATERIAL Y MÉTODOS:	41
7.1 Fabricación de las membranas.	41
7.1.1 Preparación de las soluciones.	41

7.1.2 Medición de parámetros.	42
7.1.3 Electrospinning.	42
7.2 Activación de la cepa bacteriana	43
7.3 Preparación de la solución de nisina	43
7.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	43
7.5 Activación de las membranas	43
7.5.1 Adición de la nisina la solución de PVP/AC	43
7.6 Pruebas antimicrobianas	44
7.7 Caracterización de las membranas.	44
7.7.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	44
7.7.2 Espectroscopia Infrarroja por la Transformada de Fourier (FT-IR)	44
7.7.3 TGA/DSC	45
7.7.4 Humectación y Solubilidad	45
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	46
8.1 Fabricación de las membranas.	46
8.1.1 Preparación de las soluciones.	46
8.1.2 Medición de parámetros.	46
8.1.3 Electrospinning.	47
8.2 Activación de la cepa bacteriana	49
8.3 Preparación de la solución de nisina	49
8.4 Activación de las membranas	50
8.5 Pruebas antimicrobianas	50
8.6 Caracterización de las membranas.	51
8.6.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	51
8.6.2 FT-IR	52
8.6.3 TGA/DSC	53
8.6.4 Humectación y Solubilidad	54
8.7 Identificación de la actividad antibacteriana	56
9 CONCLUSIONES	60
10 PERSPECTIVAS	61
11 BIBLIOGRAFÍA	62
12 RESUMEN BIOGRÁFICO	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de publicaciones concernientes a electrospinning reportadas en journals en la última década. Búsqueda realizada en las bases de datos de la UANL Error! Bookmark not defined.	
Tabla 2. Resumen general de los parámetros y sus aportaciones en las características de las fibras obtenidas mediante el proceso de electrospinning.	24
Tabla 3. Ejemplos de los parámetros involucrados en la obtención de diferentes morfologías en las fibras de electrospinning y aplicaciones en que se han implementado.	31
Tabla 4. Materiales empleados para la liberación de compuestos generados por electrospinning	32
Tabla 5. Sistema de Clasificación de las bacteriocinas	34
Tabla 6. Registro de parámetros de las diferentes concentraciones de las soluciones poliméricas bajo condiciones ambientales.	47
Tabla 7. Membranas obtenidas bajo distintas variaciones de voltaje y distancia con flujo de 5ml/h.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema básico de un equipo de electrospinning genérico utilizado en la actualidad.	18
Figura 2. Algunas de las diferentes formas de meniscos que se pueden apreciar en diferentes soluciones poliméricas. En la imagen se muestran meniscos formados en soluciones de polimetilmetacrilato con concentraciones de 10, 12 y 15% (p/v) sometidas a las mismas condiciones de flujo y voltaje. Fotografía tomada de Bhattacharjee y Rutledge, 2011.	19
Figura 3. Trayectoria del chorro de un fluido polimérico electrificado en el recorrido de la aguja hacia el colector. Modificada de Cui et al. 2011.	19
Figura. 4. Unidad monomérica de la PVP	26
Figura. 5. Unidad monomérica del AC	27
Figura 6. Ejemplos de aplicaciones en las que se han empleado fibras elaboradas mediante el proceso de electrospinning.	28
Figura 7. Estructura primaria de la nisina A. Ala-S-Ala representa al anillo de lantionina, Abu-S-Ala representa al anillo de β -metil-lantionina y los aminoácidos deshidratados: Dha (dehidroalanina) y Dhb (dehidrobutirina)	35
Figura 8. Resumen de la preparación de distintas soluciones con la finalidad de encontrar aquella con las mejores características para ser sometida al electrospinning.	41
Figura 9. Parámetros que se variaron con la finalidad de encontrar las mejores condiciones para el proceso de electrospinning.	42
Figura 10. Membrana a base de 4%PVP/4%AC elaborada mediante electrospinning. Aspecto conservado en las membranas obtenidas bajo las variaciones de voltaje y distancia mencionadas en las tabla 7.	48

- Figura 11.** Micrografías de las membranas obtenidas bajo los parámetros a) 9kV a 15cm; b) 12kV a 20cm y c) 15kV a 25cm, bajo un flujo de 5ml/h. **49**
- Figura 12.** Resultados de antibiograma. *S. aureus* inoculado en medio ICC incubado durante 24h a 37°C. A) Amikacina, B) Agua para solución de nisina, C) Mezcla de solventes 1:2 de EtOH: Ace, N) Solución de nisina, CN) Solventes+nisina, S) Solución polimérica, SN) Solución polimérica+nisina, M) Membrana 4%PVP/4%AC, MN) Membrana 4%PVP/4%AC+nisina. **51**
- Figura 13.** Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido en las que se aprecia la morfología de las fibras obtenidas en el presente trabajo previo a la adición de la nisina. **52**
- Figura 14.** Gráfico de los FT-IR obtenidos de la comparación de las membranas de PVP/AC elaboradas mediante electrospinning y los polímeros que las conforman. **53**
- Figura 15.** Análisis de estabilidad térmica de las membranas de 4%PVP:4%AC obtenidas mediante electrospinning. Se observa la transición vítrea a un temperatura de 65°C y un decaimiento de la masa de la muestra alrededor de los 350°C **54**
- Figura 16.** Comparativa entre membranas a base de PVP y las obtenidas en este trabajo con la adición de AC. Aún y cuando el tiempo de humectación es el mismo, la estabilidad de las que presentan AC es superior. **55**
- Figura 17.** Monitoreo en base a peso constante para evaluar el porcentaje de pérdida de material de las muestras de membranas al estar sumergidas en buffer a pH 5. **55**

- Figura 18.** Se puede observar la diferencia de los picos presentes entre las membranas poliméricas en presencia (PVP/AC+Nisina) y ausencia (PVP/AC) de nisina. **56**
- Figura 19.** Membrana de PVP/AC activada mediante la adición de amikacina a la solución polimérica y procesada mediante electrospinning. **58**
- Figura 20.** Membrana de PVP/AC activada con nisina mediante adsorción de la misma. Se puede apreciar que hay inhibición del crecimiento de *S. aureus*, por lo que la presencia de los polímeros por si solos no es el factor que ocasiona un atrapamiento del péptido evitando así su acción antibacteriana. **59**

1 RESUMEN

Aunque la técnica de electrospinning fue descrita hace varios años, ha sido en las últimas décadas que la atención por ésta se ha incrementado considerablemente, principalmente por el creciente interés en las propiedades de los materiales a escala nanométrica. Una de las áreas donde se han implementado con gran interés las técnicas del electrospinning es el área biomédica, teniendo como principales aplicaciones la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. El uso de membranas elaboradas por electrospinning, como sistemas de liberación de principios activos, ha resultado un sistema eficiente debido a las características estructurales de estas que permite una liberación adecuada del compuesto de interés generando un alto potencial de aplicación en diferentes tratamientos médicos. Diversos polímeros adicionados con una amplia gama de moléculas han sido estudiados con este fin. El control de patógenos oportunistas en procesos de infección mediante sistemas de liberación de agentes antimicrobianos es un campo de aplicación para membranas elaboradas mediante esta técnica. El objetivo del presente trabajo es la elaboración de membranas a base de poli-vinilpirrolidona (PVP) y acetato de celulosa (AC) activadas con nisina, por la técnica de electrospinning, y la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, patógeno oportunista en diversas infecciones principalmente de lesiones por quemaduras. Este trabajo forma parte de una línea de investigación enfocada a la obtención de biomateriales dentro de los cuales se encuentran membranas que funcionen como sistemas de liberación así como barreras protectoras contra la colonización microbiana.

ABSTRACT

Although the electrospinning technique was described several years ago, it has been through the last decades when the use of this technique had a considerable growth, mainly because interest in the properties of the materials that can be obtained by working at nanometric scale. An area where the electrospinning has been used is the in biomedic applications such as tissue engineering and regenerative medicine. The generation to membranes obtaining through electrospinning as liberation systems for active pharmaceutical ingredients has been proven to be efficient due to the structural

characteristics that allow an adequate release of the components of interest generating a high potential of applications for many health treatments. A wide range of polymers added with a vast number of molecules has been studied with this purpose. The pathogens control in numerous infections process trough the release of antimicrobial components is a field in which the matrix obtained by electrospinning is becoming relevant. The main objective of the present work is the elaboration of membranes based on polyvinylpirrolidone (PVP) and AC activated with nisin using the electrospinning process and the antimicrobial evaluation against *Staphylococcus aureus*, one of the most common opportunistic pathogens that infect skin burned wounds. This work is part of an investigation line focus in the elaboration of biomaterials that works as releasing systems of different kinds of actives and as physical barriers against the microbial colonization.

2 INTRODUCCIÓN

El proceso de electrospinning funciona por el principio electrostático. Aunque aparenta ser simple, una gran cantidad de parámetros de diferente naturaleza tienen influencia en el resultado del proceso de electrospinning (Wendorff et al. 2012). Entre las características importantes de la técnica de electrospinning está la producción de fibras de sólo algunos nanómetros y micrómetros de diámetro lo que brinda propiedades como una amplia superficie por unidad de área, áreas de gran porosidad que pueden imitar la estructura de la matriz extracelular en términos de dimensiones y propiedades químicas (Agarwal et al. 2009).

La técnica ha permitido procesar una gran variedad de polímeros, integrando en los últimos años otras clases de materiales, sin embargo durante el desarrollo del proceso existen una serie de variables que influyen en las características de los elementos obtenidos, ya sea porque están ligadas a las características del material base o porque su desempeño está relacionado con otros parámetros dentro del proceso (Duque-Sánchez et al. 2014).

Las características estructurales así como fisicoquímicas de las membranas obtenidas por electrospinning permiten obtener propiedades como son una excelente permeabilidad al oxígeno, mantenimiento de un ambiente húmedo, tamaño de poro que impide la penetración bacteriana generando una protección ante microorganismos, entre otras. Una ventaja particular de estos sistemas puede ser la posibilidad de liberación uniforme de agentes bioactivos en los sitios de las heridas (Liu et al. 2010).

Una de las consideraciones clave del proceso es la elección del material, lo cual depende de la aplicación que se esté buscando. Para propósitos relacionados con la biotecnología médica, son preferidos los polímeros biocompatibles y biodegradables. La elección está comúnmente basada en las propiedades del tejido cercano al cual se expondrá el polímero. Entre los materiales más utilizados se encuentran el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y la policaprolactona (PCL) por sus siglas en inglés. En algunas ocasiones se busca obtener materiales con propiedades de dos o más polímeros, casos en los que mezclas de polímeros son usadas para el electrospinning.

La polyvinylpirrolidona (PVP) también llamado comúnmente polividona o povidona, es un polímero soluble en agua que se obtiene a partir del monómero N-vinilpirrolidona. Es soluble en agua y en solventes polares y ha sido utilizado en aplicaciones médicas y técnicas (Knappe et al. 2010). Estudios previos han demostrado que la PVP es un polímero importante al incrementar la solubilidad de los fármacos y como un inhibidor de la recristalización (Dai et al. 2012).

Los antibióticos más comúnmente utilizados para combatir agentes infecciosos oportunistas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp*, entre otros), pertenecen principalmente a los grupos de los β -lactámicos y las cefalosporinas. Debido a la generación de cepas altamente resistente a estos productos, se ha incrementado la búsqueda de alternativas a los mismos. La nisina es producida por *Lactococcus lactis*, es la bacteriocina mejor estudiada y ha demostrado tener propiedades particulares: exhibe una fuerte actividad antimicrobiana contra estafilococos y estreptococos; y se encuentra en la lista de compuestos Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS por sus siglas en inglés) para su uso como un agente antimicrobiano en diferentes aplicaciones alimentarias. Estudios realizados hasta la fecha han establecido una ingesta diaria aceptable (ADI por sus siglas en inglés) entre 0.13mg/kg y 0.049mg/kg de peso corporal según la FDA y la EFSA, y la exposición a ésta no genera resistencia en los microorganismos (Fernández et al. 2008).

Entre las infecciones fortuitas más comunes en nuestro país se encuentran aquellas en las heridas generadas por diversos tipos de quemaduras, cuyas estadísticas arrojan más de 100,000 casos por año en nuestro país siendo una de las causas más frecuentes de atención médica en las salas de urgencias (Orozco-Valerio et al. 2012), por lo cual se requieren de terapias que puedan reducir las probabilidades de infección por la entrada de microorganismos mediante las heridas. En la búsqueda de nuevas formas para la prevención y tratamiento de infecciones, las membranas poliméricas construidas mediante electrospinning han surgido como una propuesta atractiva (Liu et al. 2010).

3 ANTECEDENTES

3.1 Historia Del Electrospinning

La primera cita detallada de la aplicación de altos potenciales eléctricos para generar aerosoles a partir de gotas de fluidos data de 1745, pero no fue hasta 1929 que la aplicación de campos eléctricos para producir seda artificial fue descrita (Braghirolli et al. 2014). De 1934 a 1944, Formhals publicó una serie de patentes, que describen un montaje experimental para la producción de filamentos de polímero utilizando una fuerza electrostática (Huang et al. 2003). El proceso de Formhals consta de un dispositivo móvil para recoger las fibras estirándolas, como en un tambor de hilatura en el hilado convencional (Subbiah et al. 2005). En 1952 Vonnegut y Newbauer inventaron un aparato simple para la atomización eléctrica y produjeron corrientes de gotas uniformes altamente electrificadas de alrededor de 0.1 mm de diámetro. Después en 1955 Drozin investigó la dispersión de una serie de líquidos en aerosoles bajo potenciales eléctricos altos y Simons en 1966 patentó un aparato para la producción de telas no tejidas que eran ultra finas y muy ligeras de peso con diferentes patrones usando hilatura eléctrica (Bhardwaj & Kundu 2010).

Desde la década de 1980 y especialmente en los últimos años, como muestra la tabla 1, el proceso de electrospinning ha recuperado más atención debido probablemente a un creciente interés en la nanotecnología, como fibras ultrafinas o estructuras fibrosas de diversos polímeros con diámetros desde unas pocas micras hasta unos cientos de nanómetros pueden ser fácilmente fabricados con este proceso (Huang et al. 2003). La popularidad del proceso de electrospinning se puede observar en el hecho que más de 200 universidades e institutos de investigación

Tabla 1. Número de publicaciones concernientes a electrospinning reportadas en journals en la última década. Búsqueda realizada en las bases de datos de la UANL

Año de Publicación	Artículos
1996/1997	2
1998/1999	7
2000/2001	24
2002/2003	101
2004/2005	387
2006/2007	814
2008/2009	1566
2010/2011	4217
2012/2013	6176
2014/2015	8372

de todo el mundo están estudiando diversos aspectos del proceso de electrospinning y la fibra que produce y también el número de patentes para aplicaciones basadas en electrospinning ha crecido en los últimos años. Algunas empresas como eSpin Technologies, NanoTechnics y KATO Tech participan activamente en cosechar los beneficios de las ventajas únicas que ofrece electrospinning, mientras que empresas como Donaldson Company y Freudenberg han estado utilizando este proceso para las dos últimas décadas en sus productos de filtración de aire (Ramakrishna et al. 2006).

3.2 Principio Del Electrospinning

En la actualidad el equipo que se utiliza para el proceso de electrospinning (Figura 1) consta de jeringas con agujas acopladas a una bomba que genera un flujo de la solución formando así una gota colgante en la punta de la aguja. La aguja es conectada a un electrodo proveniente de una fuente de poder, lo que genera una diferencia de potencial entre el electrodo conectado a la aguja y el colector, que se conecta a tierra. Mediante este proceso, el fluido polimérico es electrificado, generando así un campo de alto voltaje el que resulta en el estiramiento de las gotas del fluido, induciendo la formación del menisco cónico, comúnmente conocido como el “cono de Taylor”, sin embargo esta región no siempre presenta una aproximación de 49.3° al medio ángulo, lo cual se puede apreciar en la Figura 2. El estiramiento es resultado de la electrificación, la acumulación de carga en la superficie del fluido ocasiona una repulsión entre las cargas, lo que

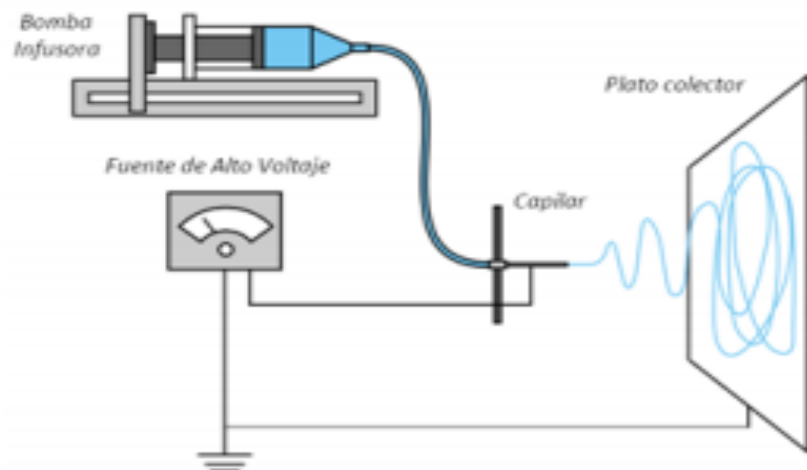


Figura 1. Esquema básico de un equipo de electrospinning genérico utilizado en la actualidad (Duque-Sánchez et al. 2014).

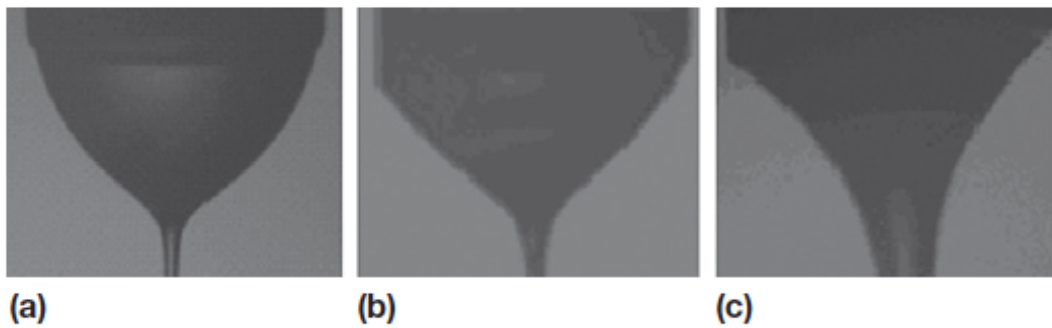


Figura 2. Algunas de las diferentes formas de meniscos que se pueden apreciar en diferentes soluciones poliméricas. En la imagen se muestran meniscos formados en soluciones de polimetilmetacrilato con concentraciones de 10, 12 y 15% (p/v) sometidas a las mismas condiciones de flujo y voltaje. Fotografía tomada de Bhattacharjee y Rutledge, 2011.

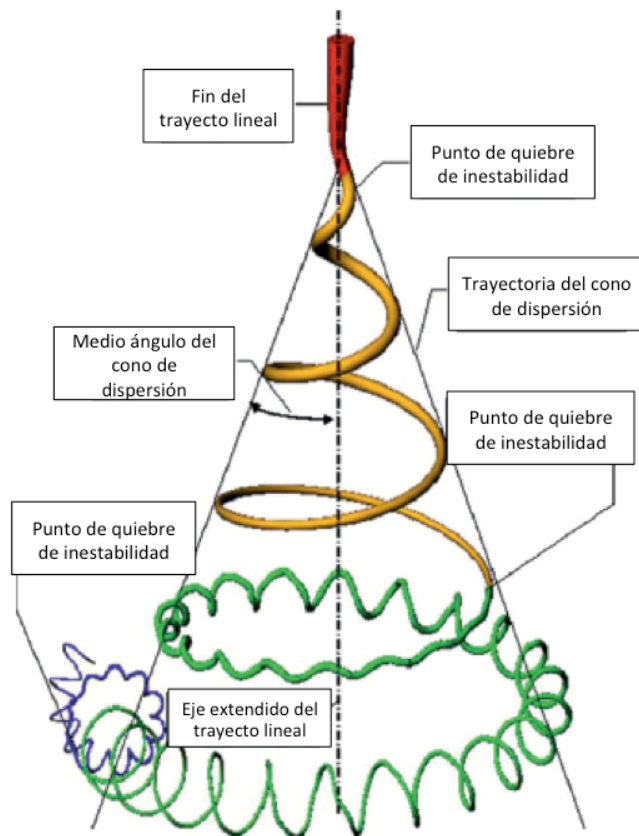


Figura 3. Trayectoria del chorro de un fluido polimérico electrificado en el recorrido de la aguja hacia el colector. Modificada de Cui et al. 2011.

conduce a una desestabilización del menisco y la formación del chorro. El chorro debido a la electrificación acelera normalmente de forma casi lineal en dirección al colector, pero eventualmente comienza a desestabilizarse mostrando un comportamiento similar a un látigo, razón por la que esto se conoce como la “inestabilidad de látigo”. Tal inestabilidad continua a lo largo del trayecto que el chorro recorre, durante lo cual se producen varios puntos de quiebre (Figura 3). Actualmente se considera a este comportamiento como el

responsable de la formación de las fibras en el electrospinning (Bhattacharjee & Rutledge

2011). Para el desarrollo del electrospinning normalmente se utilizan fluidos cuyos solventes son volátiles, esto con la finalidad de que el solvente se evapore durante el trayecto del chorro mientras éste recorre el camino entre la punta de la aguja hacia el colector, permitiendo así que cuando las fibras alcanzan finalmente el colector solidificadas formando así el entramado.

3.3 Parámetros

Una gran cantidad de parámetros de diferente naturaleza tienen influencia en el resultado del proceso de electrospinning. Entre estos parámetros se pueden considerar A) condiciones ambientales: temperatura, humedad, velocidad del aire; B) propiedades de la solución: elasticidad, viscosidad, conductividad, tensión superficial; C) condiciones físicas: distancia entre la boquilla y el colector, potencial eléctrico, flujo, peso molecular del polímero, geometría del colector, etc. A continuación se mencionan brevemente algunos de los parámetros que se han reportado como mayormente influyentes en la morfología de las fibras durante el proceso (Wendorff et al. 2012).

3.3.1 Parámetros de la solución

3.3.1.1 Peso Molecular del Polímero

El peso molecular del polímero tiene un efecto significativo sobre las propiedades reológicas y eléctricas tales como: viscosidad, tensión superficial, conductividad y resistencia dieléctrica (Haghi & Akbari 2007). Este es un parámetro importante de la solución que afecta la morfología de la fibra por lo que generalmente se usan soluciones con polímeros de alto peso molecular, ya que proporcionan la viscosidad deseada para la generación de la fibra. Por otro lado, se ha observado que una solución de bajo peso molecular tiende a formar cuentas en lugar de fibras y una solución de alto peso molecular tiende a formar fibras con diámetros grandes. (Bhardwaj & Kundu 2010). El peso molecular del polímero refleja el número de enredos de cadenas de polímero en una solución, por lo tanto la viscosidad de la solución y el enmarañamiento de la cadena juega un papel importante en el proceso de electrospinning (McKee et al. 2004).

3.3.1.2 Concentración

Para la formación de fibras, es necesario contar con una concentración mínima de la solución del polímero. Se ha observado que al emplear fluidos con bajas concentraciones se obtiene fibras con presencia de cuentas, y conforme la concentración de polímero en la solución incrementa, la forma de las cuentas va cambiando de redonda a ovalada hasta el punto en que desaparecen dejando fibras uniformes (Haghi & Akbari 2007). Los investigadores han intentado encontrar una relación entre la concentración de la solución y el diámetro de la fibra, obteniendo una relación de ley de potencia, en la cual al aumentar la concentración de la solución, aumenta el diámetro de la fibra (Ki et al. 2005).

3.3.1.3 Viscosidad

Este parámetro juega un papel importante en la determinación del tamaño y la morfología de la fibra. Ha sido encontrado que con muy baja viscosidad no hay una formación continua de la fibra, y que con una viscosidad muy alta hay dificultad en la eyección del jet de la solución del polímero, por lo tanto una viscosidad óptima es un principal requisito para el procesos de electrospinning (Kim et al. 2005). El rango de viscosidad en el cual una solución forma fibras mediante el electrospinning es diferente dependiendo de cada polímero. A lo largo del tiempo se ha observado la importancia que juega la viscosidad de la solución para determinar el rango de concentración en la que se podrán obtener fibras continuas (Son et al. 2004).

3.3.1.4 Tensión Superficial

La tensión superficial juega un papel crítico en el proceso de electrospinning ya que reduciendo la misma de una solución pueden obtenerse fibras sin cuentas (Pham et al. 2006). Diferentes disolventes pueden contribuir diferentes tensiones superficiales. Generalmente, la alta tensión superficial de una solución inhibe el proceso de electrospinning debido a la inestabilidad del jet y la generación de gotas pulverizadas (Haghi & Akbari 2007). Sin embargo, no necesariamente una baja tensión superficial puede ser benéfica para el proceso. Básicamente la tensión superficial determina los límites superior e inferior entre los que el electrospinning puede realizarse, si las otras variables se mantienen constantes (Pham et al. 2006).

3.3.1.5 Conductividad

Para el proceso de electrospinning los polímeros de alta densidad de carga en su mayoría son conductores, con algunas excepciones en materiales dieléctricos; a su vez los iones cargados en la solución del polímero son muy influyentes en la formación del chorro (Haghi & Akbari 2007). La conductividad de la solución está determinada principalmente por el tipo de polímero, el disolvente utilizado y la disponibilidad de sales ionizables. Se ha encontrado que con el aumento de la conductividad eléctrica de la solución, hay una disminución significativa en el diámetro de las fibras, mientras que con una baja conductividad de la solución resulta en una mayor fuerza eléctrica necesaria para producir fibras uniformes (Bhardwaj & Kundu 2010).

En ocasiones para incrementar las propiedades dieléctricas de la solución, algunos solventes con altas constantes dieléctricas son adicionados (Lee et al. 2003) favoreciendo la formación de fibras con menos estructuras defectuosas (las estructuras defectuosas conocidas como cuentas, decrecen la superficie por unidad de área del proceso) y con diámetros reducidos (Son et al. 2004a,b).

3.3.2 Parámetros del proceso

3.3.2.1 Voltaje Aplicado

En el proceso de electrospinning un elemento fundamental es el voltaje eléctrico aplicado a la solución; pues sólo después de alcanzar la tensión umbral ocurre la formación del chorro, esto es debido a la afinidad de la solución con el campo eléctrico e inicia el proceso de electrospinning. Éste parámetro se ve fuertemente afectado por los anteriormente mencionados (Bhardwaj & Kundu 2010). Algunos trabajos sugieren que hay una relación entre el voltaje aplicado y el diámetro de las fibras, alegando que a mayores voltajes, hay más eyección del fluido facilitando así la formación de fibras más gruesas (Zhang et al. 2002) mientras que otros han reportado lo contrario (Haghi & Akbari 2007), quienes también han reportado que con voltajes mayores aumenta la probabilidad de formación de cuentas en las fibras. Lo que si se puede establecer es que el voltaje influye el diámetro de las fibras obtenidas, pero el nivel de significancia en que influye varía según el polímero, la concentración de la solución y la distancia entre la aguja y el colector (Yördem et al. 2008).

3.3.2.2 Flujo

La velocidad de flujo de alimentación en la jeringa es importante pues influye en la velocidad de salida del chorro. Una menor velocidad de flujo es más deseable ya que el disolvente tendrá un tiempo suficiente para la evaporación. Siempre debe haber un flujo mínimo de salida para el fluido, ya que una alta velocidad da como resultado que las fibras no cuenten con el tiempo necesario para su secado o evaporación del disolvente antes de llegar al colector. Pocos estudios han investigado sistemáticamente la relación entre la solución de alimentación o en la velocidad de flujo en la morfología de la fibra y su tamaño (Bhardwaj & Kundu 2010).

3.3.2.3 Distancia al colector

La distancia entre la punta y el colector ha sido examinada como otro parámetro para controlar los diámetros de las fibras y su morfología. Se requiere una distancia máxima para dar a las fibras el tiempo suficiente para secarse antes de llegar al colector, sin embargo, si las distancias que son muy cercanas o demasiado lejanas, se ha observado la presencia de cuentas (Pham et al. 2006). El efecto de la distancia entre la punta y el colector en la morfología de fibra no es tan significativa como en otros parámetros; se ha informado que las fibras más planas pueden ser producidas a distancias más cercanas, pero con aumento de la distancia, fibras más redondas han sido observadas (Ki et al. 2005).

3.3.3 Parámetros Ambientales

Además de los parámetros de la solución y procesamiento, también hay parámetros ambientales que incluyen humedad y temperatura, se han realizado estudios para examinar los efectos de los parámetros ambientales en el proceso de electrospinning. Se han hecho investigaciones las cuales muestran el efecto de la temperatura sobre el electrospinning; determinando que con el aumento de temperatura, hay un rendimiento de las fibras acorde con la disminución del diámetro de las mismas; es decir la disminución del diámetro de las fibras se ve asociada a la disminución de la viscosidad de las soluciones del polímero al aumento de la temperatura (Zhang et al. 2002). Así como existe una relación inversa entre la viscosidad y la temperatura, se ha encontrado que a muy baja humedad, una solución volátil se puede secar rápidamente por la evaporación

del solvente. A veces la tasa de evaporación es tan rápida que en comparación con la eliminación del disolvente desde la punta de la aguja da como resultado, que el proceso de electrospinning sólo puede llevarse a cabo por unos pocos minutos antes de la punta de la aguja sea obstruida (Li et al. 2005).

Tabla 2. Resumen general de los parámetros y sus aportaciones en las características de las fibras obtenidas mediante el proceso de electrospinning.

Parámetro	Característica que aporta
Concentración de la solución	∧ Dificulta el paso de la solución por el capilar.
	∨ Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al colector.
Tensión superficial	∧ Presencia de cuentas en las fibras.
	∨ Se obtienen fibras lisas. Se pueden adicionar solventes con menor tensión como el etanol.
Conductividad de la solución	∧ Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución, fibras mas delgadas.
	∨ Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución, fibras mas gruesas.
Voltaje	∧ Fibras gruesas, aparición de cuentas.
	∨ Poco impulso para que la solución llegue al colector.
Flujo de salida	∧ Fibras mas gruesas, cuentas de mayor diámetro.
	∨ Mayor tiempo para evaporación del solvente. Sin Cuentas.
Distancia del colector	∧ Las fibras pueden romperse por su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, generando fibras delgadas.
	∨ Poco tiempo de evaporación del solvente, por lo que las fibras llegan húmedas.
Humedad relativa	∧ Aparición de poros en las nanofibras.
Temperatura	∧ Reducción del diámetro de las fibras.

3.4 Polímeros Empleados en Electrospinning

Los polímeros, palabra que proveniente del griego “*poli*” que significa “*muchos*” y “*mero*” “partes”, literalmente es la unión de estructuras repetitivas en cadena, cada estructura repetitiva se llama “monómero”, por lo que se puede considerar que un

material polimérico está formado por muchas partes químicamente enlazadas como unidades enlazadas entre sí para formar un sólido de cadena más larga (Smith & Hashemi 2006). Son compuestos dieléctricos, así que en presencia de un campo eléctrico pueden considerarse como un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos compuestos por cargas positivas y negativas cuyos centros no coinciden perfectamente (Duque-Sánchez et al. 2014), se mantienen en su lugar por acción de las fuerzas atómicas y moleculares, y solo cambian su posición ligeramente como respuesta a fuertes campos eléctricos externos.

Existe una enorme gama de polímeros que se utilizan en electrospinning y son capaces de formar nanofibras finas dentro de la gama submicrónica y se utiliza para aplicaciones variadas. Se han reportado diferentes polímeros sintéticos, polímeros naturales o mezclas de ambos, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos e incluso polisacáridos (Son et al. 2004). En los últimos años se ha logrado procesar mediante electrospinning más de 200 polímeros a partir de polímeros naturales, e incluso se han caracterizado con respecto a su aplicación (Bhardwaj & Kundu 2010). Las nanofibras de estas soluciones de polímero se han utilizado en diversas aplicaciones tales como, andamios de ingeniería de tejidos, membranas de filtración y en diversas aplicaciones biomédicas. Los polímeros naturales normalmente presentan una mejor biocompatibilidad y baja inmunogenicidad, en comparación con polímeros sintéticos, cuando se usan en aplicaciones biomédicas. Una razón de peso para el uso de polímeros naturales para electrospinning es su capacidad inherente para la unión de células (Huang et al. 2003).

3.4.1 Polivinilpirrolidona (PVP)

La PVP es un importante polímero sintético cuyo monómero consta de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Reportado por primera vez en una patente hace 60 años mencionando un conjunto de propiedades como buena adhesión, baja toxicidad, alta higroscopicidad, excelente compatibilidad fisiológica, alta solubilidad en agua y solventes orgánicos, etc. Debido al rango tan amplio de características que presenta este polímero, actualmente se utiliza en una gran cantidad de aplicaciones como adhesivos, pinturas, detergentes, electrónicos, bebidas, cosméticos, fármacos, materiales para ingeniería biológica, entre otras (Chuangchote et al. 2009).

Las características moleculares de PVP le valieron su uso temprano como extensor de plasma de la sangre. Actualmente el uso del complejo PVP-Yodo se ha convertido en universal para la desinfección de heridas ya que se ha encontrado que es menos tóxico que las tinturas de yodo. El PVP tiene un largo historial en las aplicaciones biomédicas y

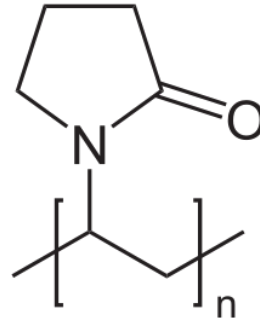


Fig. 4. Unidad monomérica de la PVP

farmacéuticas y en la actualidad los sistemas de administración de fármacos basados en PVP están bajo intensa investigación (Knappe et al. 2010).

Desde el primer reporte de fibras de PVP obtenidas mediante electrospinning, por Bognitzki et al. (2001), se ha usado ampliamente en la obtención de fibras junto con otros materiales como biopolímeros y otros compuestos mediante diversas mezclas con la finalidad de emplear las fibras en medicina y aplicaciones biológicas (Chuangchote et al. 2009).

3.4.2 Acetato De Celulosa (AC)

Es un éster de celulosa importante que se obtienen por reacción de la celulosa con anhídrido acético y ácido acético en presencia de ácido sulfúrico. La forma más común de fibra de acetato de celulosa tiene un grupo acetato en aproximadamente 2-2.5 de cada tres hidroxilos. Este diacetato de celulosa se conoce como acetato secundario o simplemente como “acetato” (Fischer et al. 2008).

El AC fue la primera membrana asimétrica de alto rendimiento, y tanto este polímero como sus derivados son adecuados como materiales de membrana, debido a las ventajas tales como flujo moderado, propiedades de rechazo de sal alta, la rentabilidad, la fabricación relativamente fácil, es un recurso de materias primas renovables, y presenta una muy baja toxicidad. Ha sido ampliamente utilizado para osmosis inversa, microfiltración y separación de gases (Kamal et al. 2014).

En años recientes el interés en la celulosa, polisacáridos relacionados y los derivados de éstos ha crecido considerablemente como materiales amigables con el medio ambiente. El AC es el derivado mas importante, usado para diversas aplicaciones industriales en forma de membranas y fibras debido a sus propiedades físicas, además de esto ha sido reportado

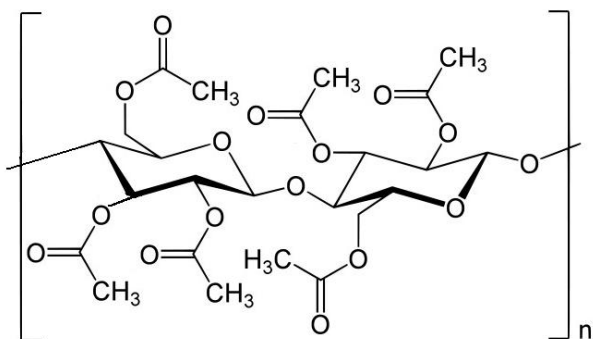


Fig. 5. Unidad monomérica del AC

como potencialmente biodegradable (Miyashita et al. 2002). El acetato de celulosa exhibe un amplio rango de propiedades entre los que está la biocompatibilidad de los materiales basados en éste polímero en términos de biodegradabilidad (Konwarh et al. 2013).

3.4.3 Mezcla De Polivinilpirrolidona y Acetato De Celulosa (PVP/AC)

Preparaciones de PVP/AC y sus compuestos en membranas mediante electrospinning se han reportado. La forma en que se han realizado es mediante la variación de coaxial en ambas configuraciones AC/PVP/AC y PVP/AC/PVP. Otra manera en que se han realizado membranas con ambos polímeros ha sido mediante el uso de sistemas de doble aguja independientes (Konwarh et al. 2013).

Recientes trabajos se han enfocado en el uso de matrices de AC elaboradas mediante electrospinning para la liberación de drogas de forma transdermal (TDD por sus siglas en inglés). TDD hace referencia a la administración de medicamentos en forma de parches que liberan las drogas con un efecto sintético a un ritmo determinado, mejora el cumplimiento del paciente y reduce la variabilidad en los pacientes. Entre los trabajos que se han realizado hasta ahora se encuentra el de Catillo-Ortega y colaboradores (Castillo-Ortega et al. 2011) en donde obtuvieron membranas mediante la variante coaxial en configuración AC/PVP/AC para la aplicación controlada de amoxicilina mediante aplicación gastrointestinal y parches transdermales.

3.5 Aplicaciones De Las Fibras Generadas Por Electrospinning

Las propiedades físicas y químicas de la materia a escala micro y nanométrica se comportan de forma diferente con respecto a como lo hacen a escala macrométrica. Debido a las propiedades únicas que son conferidas a las fibras de polímeros elaboradas mediante electrospinning, se han implementado en diversos campos científicos.



Figura 6. Ejemplos de aplicaciones en las que se han empleado fibras elaboradas mediante el proceso de electrospinning.

3.5.1 Ingeniería de tejidos

Una de las áreas con mayor interés que ha tenido importantes desarrollos, y para fines prácticos es más importante para este trabajo, es la relacionada a la ingeniería de tejidos. Es un área multidisciplinaria que combina los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos y también para la restauración, mantenimiento o la mejora de las funciones de tejidos. La investigación de biomateriales es un campo que juega un rol primordial en la ingeniería de tejidos al proveer de matrices

para el crecimiento celular, la proliferación y la formación tisular en tres dimensiones. Al ser comparado con otras técnicas como el autoensamble y la separación de fases, el electrospinning provee formas mas simples y con mejor aprovechamiento de costos para producir andamios moleculares que posean estructuras con poros interconectados y cuyas fibras tengan diámetros en rangos nanométricos (Bhardwaj & Kundu 2010).

Una de las consideraciones clave del proceso es la elección del material, lo cual depende de la aplicación que se esté buscando. Para propósitos relacionados con la biotecnología médica, son preferidos los polímeros biocompatibles y biodegradables. La elección está comúnmente basada en las propiedades del tejido cercano al cual se expondrá el polímero. Algunas veces se busca obtener materiales con propiedades de dos o más polímeros, casos en los que mezclas de polímeros son usadas para el electrospinning (Agarwal et al. 2008).

3.5.2 Tratamiento de infecciones epidérmicas

Distintos tratamientos han sido propuestos a la fecha. Sulfadiazina de plata, una combinación de nitrato de plata y sulfadiazina de sodio aunque se han aportado pruebas sugiriendo que con un prolongado uso, los iones de plata pueden ser tóxicos ya que se unen al DNA interfiriendo con la replicación, forman especies reactivas de Oxígeno, reducen el ATP y dañan la mitocondria (Heunis & Dicks 2010).

Así como se ha usado la plata, la mupirocina, el acetato de mafenida y el digluconato de clorhexidina han sido empleados en forma de cremas para su aplicación en infecciones por quemaduras (Altoparlak et al. 2004). La desventaja de estas cremas tópicas es que deben aplicarse al menos dos veces al día, y si se utilizan junto con vendajes, éstos deben ser cambiados al menos una vez al día, lo cual puede permitir la aparición de infecciones en las heridas (Heunis & Dicks 2010).

De las aplicaciones en las que el electrospinning ha demostrado resultados benéficos desde varios puntos como es la relación costo-beneficio y que, una vez estandarizados los procesos, se convierte en una técnica muy sencilla mediante la cual producir grandes volúmenes de fibras. Mediante el uso del electrospinning se han obtenido fibras cuyos diámetros se encuentran en el rango de nanómetros a micrómetros. A la fecha, numerosos

polímeros han logrado ser procesados mediante el electrospinning en nanofibras con aplicaciones para la liberación de diversos principios activos, y debido a que poseen propiedades benéficas como una excelente permeabilidad a oxígeno, mantenimiento de un ambiente húmedo, protección ante microorganismos, entre otras, hacen que las membranas generadas por éste proceso, tengan potencial como barreras para prevenir la penetración bacteriana en heridas (Agarwal et al. 2008). Una ventaja particular de este sistema es la liberación uniforme de estos agentes bioactivos en los sitios de las heridas, lo cual se basa en las propiedades físicas y estructurales únicas: A) la extraordinariamente alta superficie por unidad de masa de las fibras facilita la liberación rápida de los activos, B) las membranas tienen una alta porosidad y el activo puede mantenerse en las fibras en un estado amorfo o como nanocristales, que pueden ser muy útiles para aumentar tanto la solubilidad y la velocidad de disolución de agentes bioactivos poco solubles en agua (Liu et al. 2010). Los materiales más empleados en la liberación de compuestos activos se encuentran los mencionados en la Tabla 3, así como ejemplos de los principios que han sido adicionados a cada uno.

Tomando en cuenta los parámetros mencionados y algunas características del ambiente, se ha observado que la morfología de las fibras obtenidas mediante electrospinning puede variar (Duque-Sánchez et al. 2014), así como las posibles aplicaciones en las cuales se han utilizado.

Tabla 3. Ejemplos de los parámetros involucrados en la obtención de diferentes morfologías en las fibras de electrospinning y aplicaciones en que se han implementado.

Tipo de fibra	Parámetros Involucrados	Aplicaciones
Aplanadas o Cintas	Se atribuyen a la formación de una capa de polímero en la superficie de la fibra por la evaporación desigual del solvente. Puede influir mucho el tipo de solvente y la adición de sales a la solución.	Sistemas de biosensores, por la capacidad de transferir electrones y una actividad electroquímica.
Helicoidales	Se presentan por la deformación del jet debido al impacto con el plato colector. La concentración de la solución promueve esta morfología. El ángulo de incidencia del jet influye en la obtención de esta morfología.	Nano y microsistemas electromecánicos y electromagnéticos, componentes ópticos avanzados, sistemas de liberación de fármacos.
Ramificadas	Relacionadas con la aparición de jets secundarios en la superficie del primer jet. La inestabilidad entre las fuerzas eléctricas y la tensión superficial generan inestabilidad del jet.	En el caso de liberación de fármacos, puede promover la acumulación de medicamento en algunas regiones de la muestra.
Huecas	Obtenidas mediante electrospinning coaxial.	Nanodispositivos electrónicos y optoelectrónicos, conversión de energía, liberación de fármacos, protección ambiental, sensores, etc.
Fibras con poros	Aparecen por una humedad relativa y presión de vapor del solvente.	Ingeniería de tejidos, catálisis, sensores.

Tabla 4. Materiales empleados para la liberación de compuestos generados por electrospinning

Compuesto	Material
<i>Fármacos</i>	
Diclofenaco sódico	PCL
	PGDLLA
Clorhidrato de tetraciclina	PCL
	PLA
	PVA
	PLGA
	PEVA
Resveratrol	PCL
Sulfato de gentamicina	
Biteral	PLA
Mefoxina	
Salicilato de sodio	PVA
Naproxeno	
Indometacina	PLGA
Paclitaxel	
Vitamina A y E	AC
<i>Plásmidos de DNA</i>	
pCMVb codificando una β -Galactosidasa	PLGA
	PLA/PEG
<i>Factores de Crecimiento</i>	
Factor de crecimiento nervioso humano subunidad β (NGF)	PCLEEP
Factor neurotrófico derivado de células gliales humanas (GDNF)	
Proteína 2 morfogenética de hueso (BMP-2)	PLGA-Hap
<i>Compuestos antimicrobianos</i>	
Nanopartículas de plata	AC
	PCL
Iodina	PVP/PEO

Continuación Tabla 4

Compuesto	Material
<i>Proteínas</i>	
BSA	PEO
Lisozima	PCL/PEO
	PCL/PEG
Citocromo C	PLLA/PLL
<i>Bacterias</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus albus</i>	PVA
<i>Micrococcus luteus</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	PEO
<i>Bacteriófagos</i>	
T7	
T4	PVA
λ	
M13	PVP

AC: Acetato de celulosa; PCL: Policaprolactona; PGDLLA: Policaprolactona-D,L-láctida; PLA: Ácido Poliláctico; PVA: Polivinilalcohol; PLGA: Poliláctida-glicolida; PEVA: Polietilencovinilacetato; PVP: Polivinilpirrolidona; PEO: Óxido de polietileno; PEG: polietilenglicol; PLLA: Ácido poliláctico L; Poli L-Lisina (Modificado de Heunis y Dicks, 2010).

3.6 Bacteriocinas

Actualmente se buscan compuestos naturales alternativos a los antibióticos farmacéuticos, y uno de los grupos en que se ha comenzado a despertar el interés para tal aplicación son las bacteriocinas. Estos compuestos son producidos por organismos miembros del grupo de Bacterias Ácido-Lácticas (LAB). Las bacteriocinas tienen una red de carga positiva y son anfífilas o con carácter hidrofóbico. Tienen actividades bacteriostáticas o bactericidas contra otras especies. Su modo de acción es por intercalamiento en la membrana celular formando poros y eliminar la Fuerza Protón-Motriz (PMF) (Heunis et al. 2011).

Las bacteriocinas se clasifican en dos clases mayores. La Clase I contiene los Lantibióticos, pequeños péptidos que sufren modificaciones postraduccionales y tienen lantionina o residuos β -metillantonina, por ejemplo la nisina (Altena et al. 2000). La Clase II está formada por las bacteriocinas que no contienen lantionina, pesan menos de 10kDa y son péptidos que no sufren mayores modificaciones postraduccionales (Piper et al. 2009). Las clases y subclases de las bacteriocinas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Sistema de Clasificación de las bacteriocinas

Clase	Características
<i>Clase I</i>	<i>Lantibióticos</i>
Clase Ia	Pequeñas (19-38 aminoácidos), elongadas, péptidos con carga positiva que forman poros.
Clase Ib	Péptidos globulares que interfieren con enzimas esenciales.
<i>Clase II</i>	<i>No contienen lantionina</i>
Clase IIa	Péptidos tipo Pediocina que contienen la secuencia YGNGVXCXXXVXV en el extremo aminoterminal.
Clase IIb	Bacteriocinas de dos péptidos, se requieren ambos péptidos para su actividad.
Clase IIc	Péptidos cíclicos, los extremos amino y carboxilo están unidos covalentemente.
Clase IId	Péptidos sencillos diferentes de la pediocina.

Un número de lantibióticos se distinguen por tener un modo de acción dual, que involucra la unión al lípido II (intermediario esencial en la biosíntesis del peptidoglicano), seguido por la inserción a la membrana celular para formar poros (Piper et al. 2009). Entre tales péptidos se encuentra la nisina, formada por una secuencia de 34 aminoácidos, es producida por *Lactococcus lactis*, es la bacteriocina mejor estudiada y ha demostrado tener propiedades particulares: 1) exhibe una fuerte actividad antimicrobiana contra estafilococos y estreptococos pero se inactiva por concentraciones bajas de tripsina y pancreatina, por lo que no tiene efecto en el microbioma intestinal; 2) Los estudios realizados hasta la fecha de la toxicidad de nisina sugieren que puede ser

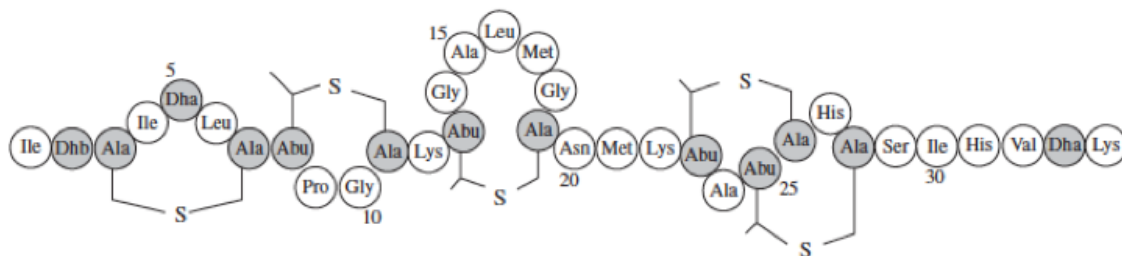


Figura 7. Estructura primaria de la nisina A. Ala-S-Ala representa al anillo de lantionina, Abu-S-Ala representa al anillo de β -metil-lantionina y los aminoácidos deshidratados: Dha (dehidroalanina) y Dhb (dehidrobutirina) (Piper et al. 2009).

utilizada de forma segura, un estudio reciente de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) concluyó que ha habido una exposición a la nisina por siglos y estableció que la ingesta diaria aceptable (ADI) de ésta es de 0.13mg/kg de peso corporal, mientras que por otro lado la FDA ha calculado la ADI en 0.049mg/kg de peso corporal además de añadir tal molécula a la lista de generalmente reconocidos como seguros (GRAS) para el uso de la nisina como un 17 agente antimicrobiano en diferentes aplicaciones alimentarias (Fernández et al. 2008). Además de ser una molécula reconocida, por su actividad y por la seguridad que ha demostrado, se ha reportado que la exposición a la nisina no genera resistencia transferible entre los microorganismos, y que en los esporádicos casos de resistencia, las mutantes no muestran resistencia a otros antibióticos terapéuticos. Por el contrario, cuando han sido generados bacterias resistentes a nisina en el laboratorio, se ha registrado un aumento en la sensibilidad a diferentes β -lactámicos y cefalosporinas lo que se atribuye al incremento en la expresión de proteínas de unión a antibióticos (Martínez & Rodríguez 2009).

3.7 Quemaduras En Piel

Entre los casos de infecciones fortuitas más comunes en nuestro país se encuentran aquellas en las heridas generadas por diversos tipos de quemaduras, cuyas estadísticas arrojan más de 100,000 casos por año en nuestro país siendo una de las causas más frecuentes de atención médica en las salas de urgencias (Orozco-Valerio et al. 2012).

Los casos de infecciones, principalmente aquellas causadas por microorganismos oportunistas en heridas como es el caso de las quemaduras, resultan en estadísticas que

impactan en los indicadores de salud pública y económica. Las afecciones por quemaduras presentan un 8.17% de mortalidad de la población general (Fraga-Sastrías et al. 2008) y es la segunda causa de muerte en niños de 0 a 14 años de edad en México, representando el 12% de todas las muertes en niños. Las lesiones por quemaduras, tan solo en niños, cuestan al año 492 millones de pesos en nuestro país, existiendo una estrecha relación entre la situación socioeconómica desventajosa y el hecho de que los niños sufran lesiones mortales y no mortales: el nivel de ingreso familiar, nivel educativo de la madre, madres solteras, hacinamiento y número de niños en el hogar (Forbes 2013).

En el comienzo, la herida es colonizada por bacterias grampositivas del tejido vecino, pero el número de ellas se multiplica rápidamente por debajo de la escara y alcanza, en promedio, 8.4~10³ unidades formadoras de colonias (UFC)/g al cuarto día posquemadura. La falta de riego de la escara, junto con la anulación de las respuestas inmunitarias locales, facilita la colonización y la proliferación ulterior de bacterias. Para el séptimo día, la herida está colonizada por otros microorganismos que incluyen bacterias grampositivas y gramnegativas y levaduras provenientes de la flora de las vías gastrointestinales y respiratorias en su porción superior. Cuando las bacterias mencionadas penetran en tejido viable se produce la infección masiva (localizada, sistémica o de ambos tipos). Además, se ha identificado en modelos experimentales de animales con infecciones de quemaduras la importancia de los biofilms (los biofilms son comunidades de bacterias propias de la superficie que a menudo están dentro de una matriz que les permite persistir y resistir los efectos de los componentes inmunitarios del hospedador y los agentes antimicrobianos). Antes de que se contara con antibióticos, los estreptococos y los estafilococos eran los microorganismos que predominaban en la infección de las quemaduras, aunque aún conservan su importancia (Guggenheim et al. 2009). Con el advenimiento de los antimicrobianos, entre los principales patógenos en el tratamiento de las quemaduras resultaron ser *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp* y *Acetivobacter spp* como principales exponentes de bacterias; *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Fusarium spp* como principales hongos (Rangel-Gaspar 2005; Branski et al. 2009; Capoor et al. 2010; Madoff & Pereyra 2012; Naqvi et al. 2014).

Según expertos, la cascada de hechos que surgen después de una quemadura grave y que culminan en insuficiencia de múltiples órganos y sistemas y la muerte, representa un proceso bifásico; es decir, la propia quemadura, que se acompaña de hipovolemia o hypoxia hística, seguida de la infección invasora que nace de la gran cantidad de tejido desvitalizado. La frecuencia de la infección guarda correspondencia con la magnitud y la gravedad de la quemadura. Las quemaduras graves inducen un estado de inmunodepresión que afecta por igual a las respuestas inmunitarias innatas y de adaptación. La trascendencia enorme de la inmunodeficiencia en la infección proviene de efectos en los componentes celular y humoral del sistema inmunitario (D'Avignon et al. 2010).

Aunado a lo mencionado antes, y recordando lo importante de la correcta selección del polímero a trabajar, por lo cual la PVP y el AC son polímeros atractivos ya que la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de los Estados Unidos de América (USA) ha aprobado tales compuestos para una amplia variedad de aplicaciones y son generalmente considerados como seguros (GRAS) (Dai et al. 2012). Tomando en cuenta las propiedades físico-químicas de los polímeros, se considera importante su aplicación para desarrollar un sistema para liberación de compuestos activos, tratándose en este caso de nisina , y evaluar su efectividad contra un microorganismo considerado oportunista recurrente en infecciones en heridas de distintas naturalezas, particularmente heridas por quemaduras.

4 DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:

La forma de administrar medicamentos, particularmente agentes antimicrobianos es de suma importancia para lograr su efectividad, ya sea local o sistémicamente. Los casos de infecciones, principalmente aquellas causadas por microorganismos oportunistas en heridas como es el caso de las quemaduras, resultan en estadísticas que impactan en los indicadores de salud pública y económica. Este tipo de afecciones presentan un 8.17% de mortalidad de la población general y es la segunda causa de muerte en niños de 0 a 14 años de edad en México, representando el 12% de todas las muertes en niños. Las lesiones por quemaduras, tan solo en niños, cuestan al año 492 millones de pesos en nuestro país, existiendo una estrecha relación entre la situación socioeconómica desventajosa y el hecho de que los niños sufran lesiones mortales y no mortales. El tratamiento de infecciones en heridas de esta naturaleza involucra el uso de antibióticos, dentro de los comúnmente utilizados se encuentran sulfadiazina de plata, amikacina, dicloxacilina, gentamicina y ketoconazol, sin embargo la efectividad de estos se ha visto disminuida por la aparición de microorganismos resistentes a estos compuestos. La elaboración de membranas por electrospinning, con propiedades fisicoquímicas que sean biocompatibles así como la activación de éstas mediante la adición bacteriocinas, como la nisina , que permita su uso como alternativa a la forma de suministrar los antibióticos tradicionales contra agentes patógenos oportunistas, resultaría en una alternativa biotecnológica para disminuir las estadísticas relacionadas con morbilidad o mortalidad, presentadas por este problema de salud.

5 HIPOTESIS:

Las membranas de PVP/AC obtenidas mediante la técnica de electrospinning y activadas con nisina presentan actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

6 OBJETIVO GENERAL:

Elaborar membranas a base de una mezcla de PVP y AC adicionadas con el péptido antimicrobiano nisina, mediante el proceso de electrospinning y evaluar su actividad antagonista contra el microorganismo *Staphylococcus aureus*, reportado como oportunista frecuente en heridas por quemadura.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Elaborar membranas de PVP/AC mediante el proceso de electrospinning.
- Caracterizar las membranas obtenidas mediante el proceso de electrospinning.
- Activar las membranas mediante la adición del péptido antimicrobiano nisina durante el proceso de elaboración éstas.
- Evaluar in vitro la acción antimicrobiana de las membranas de PVP/AC activadas con nisina contra el microorganismo oportunista *Staphylococcus aureus*.
- Comparar los posibles cambios físicos en las membranas posteriores a la activación con nisina.

7 MATERIAL Y MÉTODOS:

7.1 Fabricación de las membranas.

7.1.1 Preparación de las soluciones.

Los polímeros elegidos para la realización de este trabajo fueron adquiridos mediante la compañía Sigma-Aldrich. PVP (lote número WXBB5757V) con un peso molecular promedio de 360,000, y AC (lote número MKBM8033V) con peso molecular promedio de 30,000.



Figura 8. Resumen de la preparación de distintas soluciones con la finalidad de encontrar aquella con las mejores características para ser sometida al electrospinning.

Los solventes elegidos para la preparación de las soluciones fueron etanol (Jalmek, México) y acetona (Jalmek, México).

Inicialmente se prepararon soluciones con concentraciones de polímeros totales de 8, 12 y 16% (p/v) utilizando tres distintas proporciones de etanol (EtOH) y acetona (Ace), 1:1, 1:2 y 1:4. Hay que mencionar que en todas las formulaciones se utilizó una relación de polímeros 1:1. Para el pesado de los polímeros se utilizó una balanza semianalítica (Mettler Toledo PG4002-S) y para las mediciones de volumen se utilizaron pipetas KIMAX (No. 37035-K).

Se llevaron a cabo dos rutas para preparar la mezcla de la solución final: 1) por una parte se prepararon dos soluciones, cada una con un polímero, para después mezclar ambas soluciones en una misma; 2) por otro lado, ambos polímeros fueron agregados hasta que se diluían en un mismo volumen. Esto con la idea de observar cual de las dos formas resultaba en una mejor mezcla de ambos polímeros.

7.1.2 Medición de parámetros.

Una vez preparadas las soluciones y estandarizado el proceso de preparación de las mismas, se registraron los valores de conductividad con un conductímetro (Corning Pinnacle 542), viscosidad (Koehler K447-BR) y pH con un potenciómetro (Beckman 390pH). Las lecturas se llevaron a cabo bajo condiciones ambiente.

7.1.3 Electrospinning.

Basándose en lo reportado en la literatura, y en las propiedades fisicoquímicas de los polímeros utilizados, se variaron los parámetros necesarios para obtener membranas con la menor formación de cuentas y diámetro de fibras y poros adecuados para el desarrollo de este trabajo. Entre los parámetros que se variaron se encuentran:

- Voltaje. Se probaron valores de 9 a 15 kV.
- Distancia entre aguja y colector. Se probaron distancias de 15 a 25 cm.
- Flujo de alimentación. Se evaluó un rango de 1 a 5 ml/h.

Utilizando el equipo “Standard Unit NEU-01” (Shenzhen Tong Li Tech Co). Las membranas resultantes se observaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

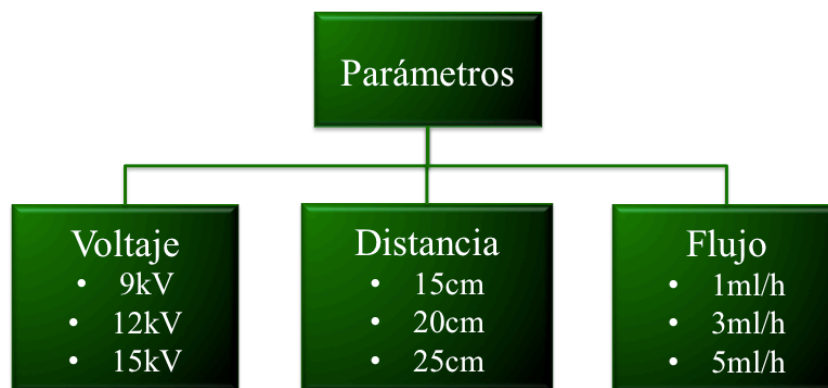


Figura 9. Parámetros que se variaron con la finalidad de encontrar las mejores condiciones para el proceso de electrospinning.

7.2 Activación de la cepa bacteriana

La cepa de *Staphylococcus aureus* obtenida para la realización del presente trabajo fue donada por el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la misma institución. Se prepararon 5ml caldo nutritivo (CN) para ser inoculados con la cepa. Se incubó el caldo por 48h a una temperatura de 37°C con agitación a 100 revoluciones por minuto.

Una vez reactivada la cepa, se procedió a inocularla en medio sólido Staphylococcus Agar (Sigma) a 37°C por 24h para asegurar la ausencia de contaminación por otros microorganismos.

7.3 Preparación de la solución de nisina

Se preparará una solución stock de nisina (25µg/ml) disolviendo 0.1g de nisina (Sigma) en 1ml de HCl 1M por 2h a temperatura ambiente. La solución se mantuvo a 4°C hasta su empleo.

7.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La determinación de las CMI y CMB se realizó mediante dilución 1:10 en tubos Ependorff usando 800µl de CN y agregando 100µl de la solución de nisina . Cada tubo se inoculó con 100µl de cultivo de *S. aureus* con una concentración celular de 1×10^5 cel/ml ajustado mediante la escala de McFarland. Una vez realizadas las diluciones se procedió a incubarlas bajo las mismas condiciones mencionadas previamente para la obtención del inóculo.

7.5 Activación de las membranas

7.5.1 Adición de la nisina la solución de PVP/AC

A la solución de PVP/AC estandarizada, se añadió el volumen de la solución de nisina para obtener la concentración final igual a la CMI determinada previamente.

Debido a la adición del lantibiótico, se evaluó si existía algún cambio en la formación de las membranas por electrospinning. Se ajustaron los parámetros previamente mencionados para la obtención de membranas adecuadas.

7.6 Pruebas antimicrobianas

- Antibiogramas

Se realizaron pruebas de la actividad antibacteriana de las membranas de PVP/AC activadas con nisina. Para lo cual se manejaron las siguientes muestras:

- Control positivo se utilizó amikacina.
- Prueba con la solución de PVP/AC preparada para someter a electrospinning.
- Membranas de PVP/AC recuperadas posteriormente de haber realizado electrospinning.
- Prueba con la solución de nisina.
- Prueba de la solución de PVP/AC activada con nisina.
- Prueba de las membranas de PVP/AC activadas con nisina elaboradas por electrospinning.
- Control negativo se utilizará la cepa de *S. aureus* inoculada en Agar Estafilococo.

7.7 Caracterización de las membranas.

7.7.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Con la finalidad de analizar la morfología de las membranas de PVP/AC se realizaron observaciones mediante SEM en las instalaciones del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV Monterrey) empleando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Nova NanoSEM 200, FEI). Las condiciones empleadas durante el procedimiento fueron adaptándose durante el transcurso del mismo en relación a las necesidades que la muestra fue requiriendo. Se empleó un detector de bajo voltaje utilizando 10kV. No fue necesario ningún tratamiento como preparación de la muestra.

7.7.2 Espectroscopia Infrarroja por la Transformada de Fourier (FT-IR)

Se realizaron lecturas por triplicado de los compuestos poliméricos para poder establecer lecturas comparativas de las membranas obtenidas. Posteriormente se realizaron de los polímeros de PVP y AC, y las membranas de PVP 4%/AC 4%(p/v) con la finalidad de monitorear la presencia de los grupos característicos de los compuestos y observar las interacciones en las membranas generadas.

7.7.3 TGA/DSC

Para los análisis térmicos se empleó el equipo SDT Q 600 (TA Instruments) con el que los procedimientos se realizaron de forma simultánea en muestras de $\approx 10\text{mg}$ un rango de 25 a 600°C con un aumento de 10° por minuto en atmósfera de nitrógeno.

7.7.4 Humectación y Solubilidad

Se realizaron pruebas de humectación colocando 2cm^2 de las membranas sobre una capa de papel absorbente de 10cm de diámetro empapados con 3ml de buffer de acetatos a pH 5.

Para la prueba de solubilidad se utilizaron muestras de las membranas similares a las mencionadas anteriormente y se sumergieron en 10ml de buffer de acetatos pH 5. Se aplicó agitación a 100RPM .

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

8.1 Fabricación de las membranas.

8.1.1 Preparación de las soluciones.

Las proporciones de los solventes probadas mostraron diferencia en su efectividad para la disolución de los polímeros. En una relación 1:1 de EtOH:Ace el AC no se solubiliza totalmente, quedando aglomerados del polímero en suspensión. A diferencia de la relación 1:1, las relaciones 1:2 y 1:4 de EtOH:Ace mostraron una disolución de los polímeros ideal. Tomando en cuenta que ambas proporciones funcionaban para preparar las soluciones de forma satisfactoria, se optó por utilizar la proporción 1:2 de EtOH:Ace siendo la proporción con mejores resultados al evaluar la solubilidad en las soluciones poliméricas.

Una vez determinada la proporción de solventes a utilizar, se procedió a determinar los valores de viscosidad, conductividad y pH de las soluciones con distintas concentraciones de polímeros.

Se probaron también dos formas de preparar la mezcla de la solución final: 1) por una parte se preparaban dos soluciones, cada una con un polímero, para después mezclar ambas soluciones en una misma; 2) por otro lado, ambos polímeros fueron agregados hasta que se diluían en un mismo volumen. Esto con la idea de observar cual de las dos formas resultaba en una mejor mezcla de ambos polímeros.

8.1.2 Medición de parámetros.

La caracterización de las soluciones obtenidas se realizó mediante el registro de tres parámetros: a) viscosidad, b) conductividad y c) pH. Estos parámetros se encuentran entre los principales a tener en cuenta para que se presente la formación de fibras mediante el proceso de electrospinning. El registro de los valores obtenidos para los tres parámetros se encuentra en la tabla 6, en la que se puede observar que el incremento de la viscosidad es proporcional al aumento de la concentración de los polímeros en la solución. En relación al pH de las soluciones se observó un comportamiento en el que aparentemente también hay una relación entre tal parámetro y el aumento de la concentración de los polímeros, comportamiento que se reporta asociado al PVP previamente (ISP 2012). En relación a la conductividad, no se observa un

comportamiento proporcional a la concentración polimérica como en los otros dos parámetros mencionados anteriormente.

Tabla 6. Registro de parámetros de las diferentes concentraciones de las soluciones poliméricas bajo condiciones ambiente.

Concentración	Viscosidad	pH	Conductividad
4%PVP/4%AC	200cP	5.1	4.1uS/cm
6%PVP/6%AC	950cP	6.4	4.67uS/cm
8%PVP/8%AC	4000cP	7.1	4.59uS/cm

La viscosidad aparente de las soluciones preparadas con 8%PVP/8%AC resultó ser demasiado alta como para poder ser inyectada al sistema de electrospinning, razón principal por la que tal concentración de polímeros fue descartada para continuar en el desarrollo del trabajo.

Tomando en cuenta que la nisina es en general más activa en medios ácidos presentando una máxima acción alrededor de un pH 5.5 (Sanjurjo et al. 2006) se eligió la solución de 4%PVP/4%AC como óptima para someter al proceso de electrospinning.

8.1.3 Electrospinning.

Una vez determinada la concentración de polímero a utilizar en solución, se procedió a la estandarización de los parámetros del proceso de electrospinning para la obtención de las fibras en las mejores condiciones posibles, teniendo como indicador principal la presencia o ausencia de cuentas en las fibras.

El primer parámetro que se evaluó fue la variación de voltaje, pues de este parámetro depende la formación del cono de Taylor, y por lo tanto la formación de las fibras y membranas (Bhattacharjee & Rutledge 2011). El rango evaluado fue desde los 9kV hasta los 15kV. Debido a que en ambos se obtuvo formación de fibras, se realizó una comparativa para registrar diferencias entre las fibras obtenidas a diferentes voltajes.

De la misma forma se varió la distancia entre la aguja y el colector, de acuerdo a la literatura este parámetro influye en la forma y diámetro de las fibras obtenidas (Pham et al. 2006). Las distancias a las que se generaron membranas fueron 15, 20 y 25 centímetros.

En relación al flujo de alimentación de la solución polimérica se probó un amplio rango, resultando que sólo a 5ml/h se mantenía una alimentación de la solución, lo suficientemente constante para evitar la interrupción de la formación del cono de Taylor y por lo tanto la obtención de la fibra.

En el caso de las combinaciones evaluadas en el presente trabajo se pudieron obtener fibras sin presencia de cuentas bajo casi todas las variaciones de parámetros y sin cambios entre las distintas fibras obtenidas (Tabla 7).

Tabla 7. Membranas obtenidas bajo distintas variaciones de voltaje y distancia con flujo de 5ml/h.

Distancia	Voltaje		
	9kV	12kV	15kV
15cm	+	+	+
20cm	+	+	+
25cm	-	+	+

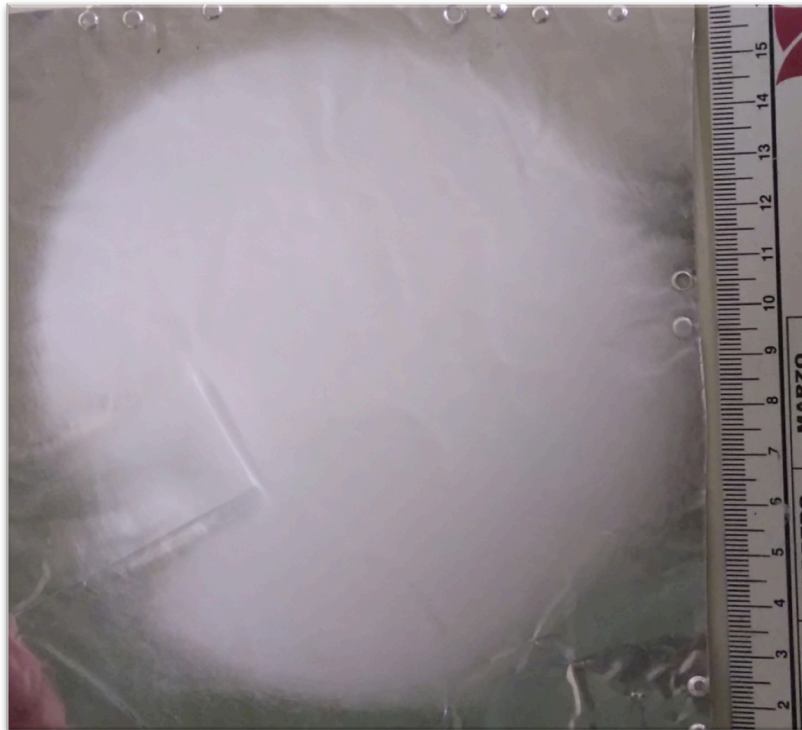


Figura 10. Membrana a base de 4%PVP/4%AC elaborada mediante electrospinning. Aspecto conservado en las membranas obtenidas bajo las variaciones de voltaje y distancia mencionadas en la tabla 7.

Las membranas obtenidas bajo las distintas variaciones mantuvieron las siguientes características: 1) color blanco brillante, 2) textura sedosa, 3) aparente flexibilidad.

Una vez obtenidas las membranas bajo las distintas variaciones de los parámetros antes mencionados se realizaron observaciones por microscopía óptica para realizar una búsqueda inicial de presencia de cuentas en las fibras, las cuales se consideran como deformaciones significando por lo tanto que las condiciones bajo las cuales fueron obtenidas no eran las ideales. En la figura 11 se puede apreciar que las observaciones de microscopía óptica no mostraron presencia de cuentas en ninguno de los casos manejados en este trabajo. Debido a la ausencia de cuentas en las distintas variaciones de los parámetros se eligió como parámetros ideales 9kV a una distancia de 15cm.

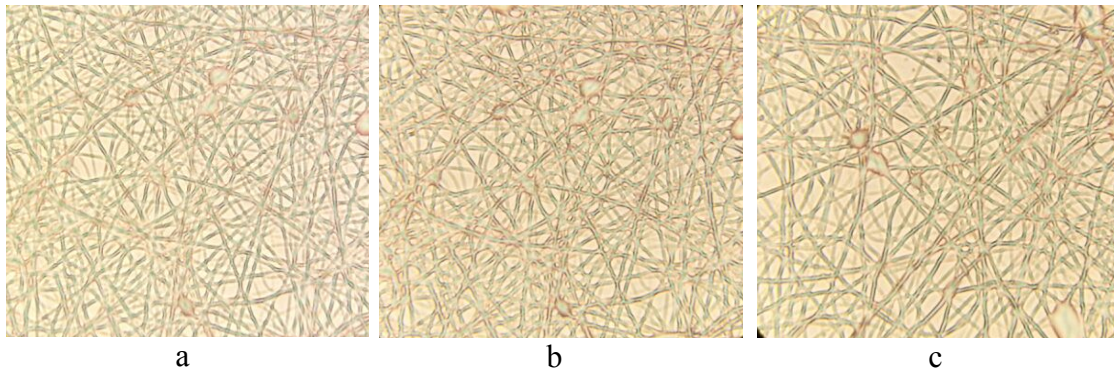


Figura 11. Micrografías de las membranas obtenidas bajo los parámetros a) 9kV a 15cm; b) 12kV a 20cm y c) 15kV a 25cm, bajo un flujo de 5ml/h. Observaciones realizadas a 400X

8.2 Activación de la cepa bacteriana

Posterior a la incubación en CN se logró inocular la cepa en agar Staphylococcus para asegurar la inocuidad de la bacteria de interés. Una vez con la cepa aislada y pura se procedió a la determinación de la CMI de nisina contra este microorganismo.

8.3 Preparación de la solución de nisina

Se encontraron algunos protocolos para la preparación de una solución de nisina a partir de un producto comercial como el empleado en este trabajo (Brumfitt et al. 2002; Cha et al. 2003; Sanjurjo et al. 2006; Guiga et al. 2009; Piper et al. 2009). Después de analizar algunos protocolos se eligieron los de Brumfitt et al. (2002) y Piper et al. (2009) como adecuados para la preparación de las soluciones de trabajo.

Una vez preparadas las soluciones de nisina según los dos protocolos antes mencionados, se procedió a realizar la determinación de la CMI mediante diluciones en tubo. Se utilizó CN como medio, el cual fue inoculado con 1×10^5 cel/ml. Después de 24h de incubación a 37°C con 100RPM se determinó que la CMI se encontraba en 6µg/ml utilizando la solución preparada mediante el protocolo de Piper et al. (2009), mientras que la solución preparada según el protocolo de Brumfitt et al. (2002) arrojó resultados positivos para la inhibición del crecimiento de *S. aureus* en una concentración de 60µg/ml, razón por la que el uso de tal solución para la activación de las membranas quedó descartado.

8.4 Activación de las membranas

La forma para la activación de las membranas fue mediante la adición de la solución de nisina a la solución polimérica durante la preparación de la última. La cantidad de nisina que colocada inicialmente fue la necesaria para poder obtener la CMI previamente determinada. Posterior a la preparación de la solución se realizó el proceso de electrospinning bajo las condiciones previamente estandarizadas. En este punto se realizó un ajuste en el flujo de alimentación de la solución polimérica hacia el sistema, puesto que los 5ml/h antes utilizados mostraron ser demasiado para que el cono de Taylor formara las fibras al ritmo que la solución era liberada mediante la aguja. Por tal motivo se redujó el flujo hasta 2.5ml/h, punto en el que se alcanzó el equilibrio entre la alimentación de la solución y el consumo de la misma mediante la formación de fibras. Esto puede haberse debido a la disminución del pH de la solución al añadir la solución de nisina, lo cual también aumentó la conductividad de la solución teniendo como valores 2.4 y 21.9µS/cm, respectivamente.

8.5 Pruebas antimicrobianas

Las pruebas fueron realizadas en medio ICC como se puede apreciar en la figura 12. La nisina no es afectada por la presencia de los solventes, lo cual fue important, dado que se comprueba que es posible la adición del péptido directamente a la solución polimérica sin riesgo de desnaturalización. Por otro lado, la solución polimérica adicionada con nisina no arrojó resultados positivos para la inhibición del crecimiento de *S. aureus*, esto puede deberse a que la incubación a 37°C ocasionó una evaporación de los solventes de la solución derivando en la formación de una membrana por casting, impidiendo así la

difusión de la nisina a través del agar. En relación a la membrana activada, no se observó halo de inhibición. Tal resultado puede deberse a dos posibilidades, en primer lugar está la reducción de la concentración de nisina en la membrana obtenida debido al proceso de electrospinning, como ha sido sugerido en trabajos reportados previamente (Sanjurjo et al. 2006). Por otro lado se encuentra la posibilidad de una fuerte unión entre el péptido y las fibras poliméricas, así como también un atrapamiento por parte de la matriz polimérica de la nisina, por lo que su liberación necesita de algún cambio en el medio que propicie la liberación de la bacteriocina, esta idea se ve apoyada por lo reportado por Bastarrachea et al. (2010).

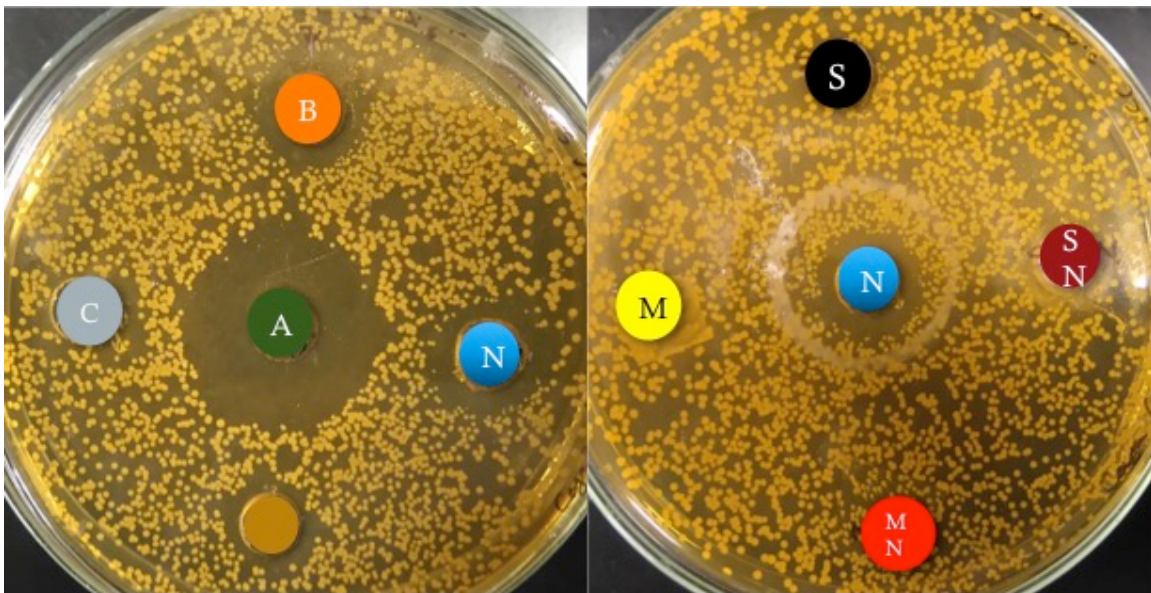


Figura 12. Resultados de antibiograma. *S. aureus* inoculado en medio ICC incubado durante 24h a 37°C. A) Amikacina, B) Agua para solución de nisina, C) Mezcla de solventes 1:2 de EtOH: Ace, N) Solución de nisina, CN) Solventes+nisina, S) Solución polimérica, SN) Solución polimérica+nisina, M) Membrana 4%PVP/4%AC, MN) Membrana 4%PVP/4%AC+nisina.

8.6 Caracterización de las membranas.

8.6.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En la Figura 13 se muestran las imágenes obtenidas por SEM. En ellas se puede apreciar una morfología uniforme de las fibras con ausencia de cuentas dentro de las mismas, lo cual corrobora las observaciones iniciales mediante la microscopía óptica mediante las que presuntamente se sugería tal característica de las fibras. Mediante esta prueba se

logró estimar el diámetro aproximado de las fibras que componen las membranas alrededor de $1.24 \pm 0.25 \mu\text{m}$, medida que se encuentra ligeramente por encima de trabajos reportados en relación a fibras obtenidas por electrospinning de PVP únicamente (Chen et al. 2012). Sin embargo el diámetro reportado para fibras elaboradas por electrospinning de una mezcla de PVP/AC se encuentra por encima de los valores obtenidos en nuestras fibras (Kendouli et al. 2014), así que aunque las fibras obtenidas no se encuentran en el rango nanométrico, se encuentran en un rango aceptable.

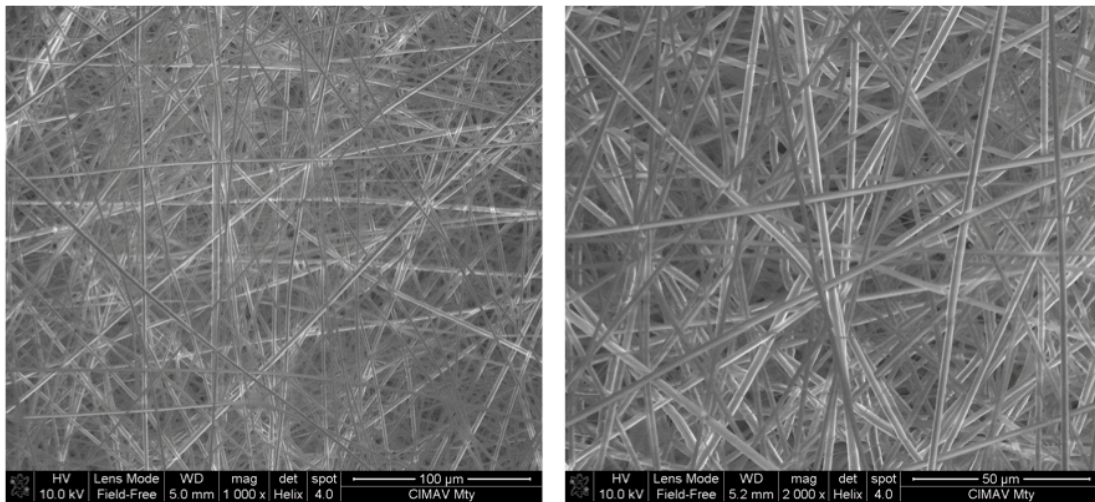


Figura 13. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido a dos magnificaciones 1kX y 2kX en las que se aprecia la morfología de las fibras obtenidas en el presente trabajo previo a la adición de la nisina.

8.6.2 FT-IR

El análisis de FT-IR realizado a diversas muestras de las membranas obtenidas mostró que los compuestos poliméricos utilizados para la elaboración de las mismas se mantienen presentes sin modificaciones al presentarse las señales características de los polímeros. En la Figura 14 se puede apreciar el grupo carbonil amida en 1670cm^{-1} de PVP y del AC se presentan picos 1020cm^{-1} y 1230cm^{-1} correspondientes a los C-O de enlace sencillo, 1700cm^{-1} del grupo carbonil y bandas en 2850^{-1} a 2950cm^{-1} de los grupos CH_3 .

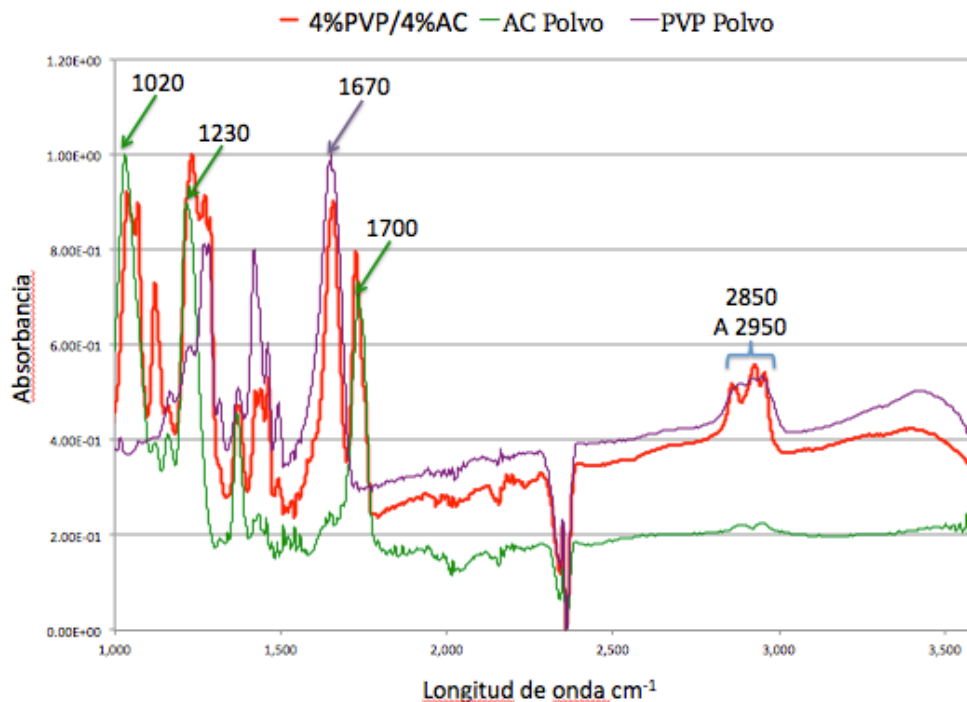


Figura 14. Gráfico de los FT-IR obtenidos de la comparación de las membranas de PVP/AC elaboradas mediante electrospinning y los polímeros que las conforman.

Debido a los resultados en los que no se obtuvo actividad inhibitoria contra *S. aureus*, se procedió a evaluar la presencia de la nisina en las membranas obtenidas. Mediante FT-IR se evaluó si existía diferencia entre las membranas “inactivas” y las que se obtuvieron después de la adición de la nisina a la solución polimérica. En la figura 18 se puede apreciar que en efecto si se presenta una variación de los picos provenientes de las membranas inactivas y las que presuntamente tienen nisina, por lo que se podemos suponer que en efecto, en las membranas hay presencia de nisina aún y cuando no presenten actividad antibacteriana.

8.6.3 TGA/DSC

Los análisis térmicos mostraron como resultado una estabilidad térmica por parte de las membranas por encima de los 350°C (Figura 15), temperatura que se encuentra por encima de lo que se esperaba. Sin embargo, el punto de transición vítrea se encuentra a una temperatura de 65°C, que aunque está por encima de los valores a los que

probablemente se expondrían las membranas, nos indica que la temperatura de integridad de las membranas es menor a la que se había estimado.

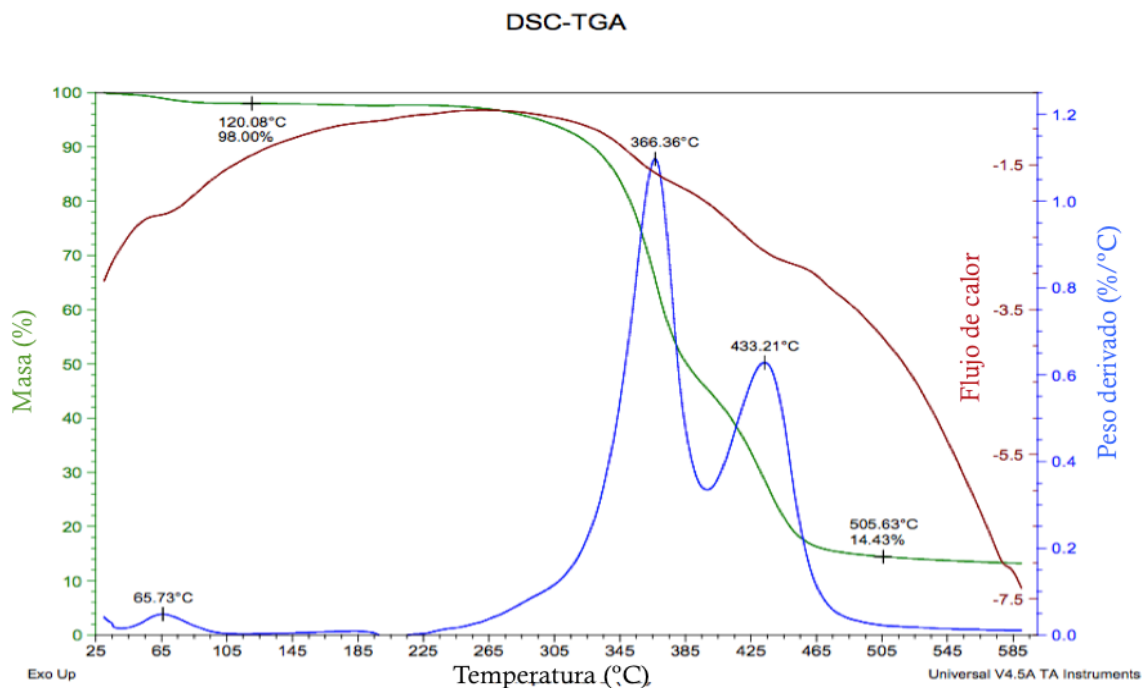


Figura 15. Análisis de estabilidad térmica de las membranas de 4%PVP:4%AC obtenidas mediante electrospinning. Se observa la transición vítrea a un temperatura de 65°C y un decaimiento de la masa de la muestra alrededor de los 350°C

8.6.4 Humectación y Solubilidad

En las pruebas de humectación y solubilidad, se obtuvo un tiempo de humectación máxima de 5s para las muestras de las membranas. Para poder realizar una comparativa de la estabilidad estructural que la mezcla de ambos polímeros aporta, se realizaron comparaciones con membranas obtenidas mediante electrospinning a base únicamente de PVP(4%p/v). Cabe mencionar que las membranas adicionadas con AC son más estables en presencia de líquidos en comparación con las formuladas únicamente con PVP, las cuales mantienen su estructura solamente durante el periodo que les toma humectarse, tiempo después del cual pierden su estructura (Figura 16).



Figura 16. Fotografías en las que se muestra una comparativa entre membranas a base de PVP y las obtenidas en este trabajo con la adición de AC. Aún y cuando el tiempo de humectación es el mismo, la estabilidad de las que presentan AC es superior.

Para la evaluación de la solubilidad de las membranas se realizó un monitoreo de peso constante de muestras de las membranas después de diversos lavados durante 2h. En la Figura 17 se puede apreciar que durante la primer hora hay una pérdida del 50% de la masa de las muestras. Aún y cuando esto puede parecer un período corto, para el uso que se propone de las membranas obtenidas en este trabajo no presentaría condiciones de humedad alta como las que se manejaron en la prueba, por lo que consideramos que los resultados obtenidos son aceptables.

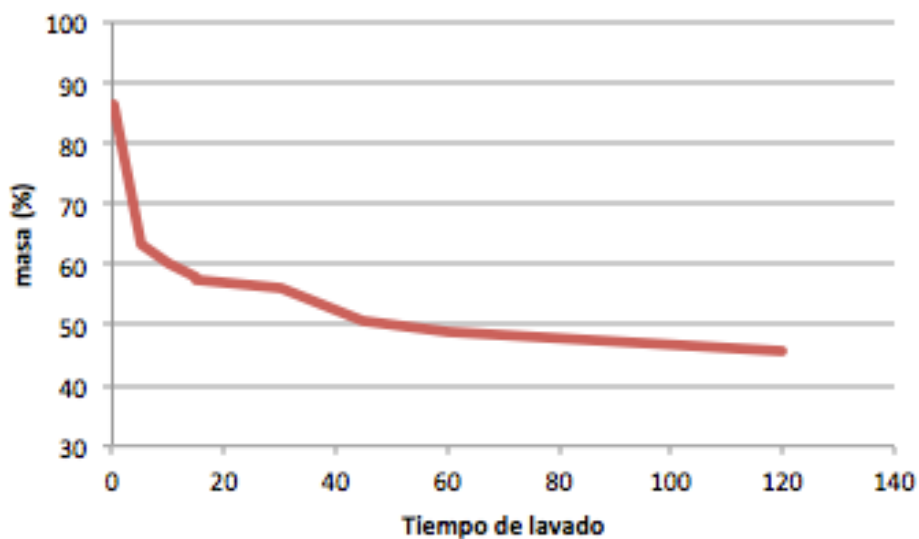


Figura 17. Monitoreo en base a peso constante para evaluar el porcentaje de pérdida de material de las muestras de membranas al estar sumergidas en buffer a pH 5

8.7 Identificación de actividad antibacteriana

Como se puede observar, aún y cuando las pruebas de caracterización de la matriz polimérica establecen que la misma es estable desde distintos puntos de vista, es importante el recordar que la principal finalidad de las mismas, la cual es que presenten actividad inhibitoria ante el crecimiento de *S. aureus*, resultó negativa.

Debido a la falta de actividad antibacteriana por parte de las membranas posterior a la activación mediante la adición de la nisina a la solución polimérica y su posterior procesamiento mediante electrospinning, se procedió a realizar una serie de pruebas y modificaciones para el entendimiento e identificación de la o las razones debido a las que no se presentó inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de las membranas activadas.

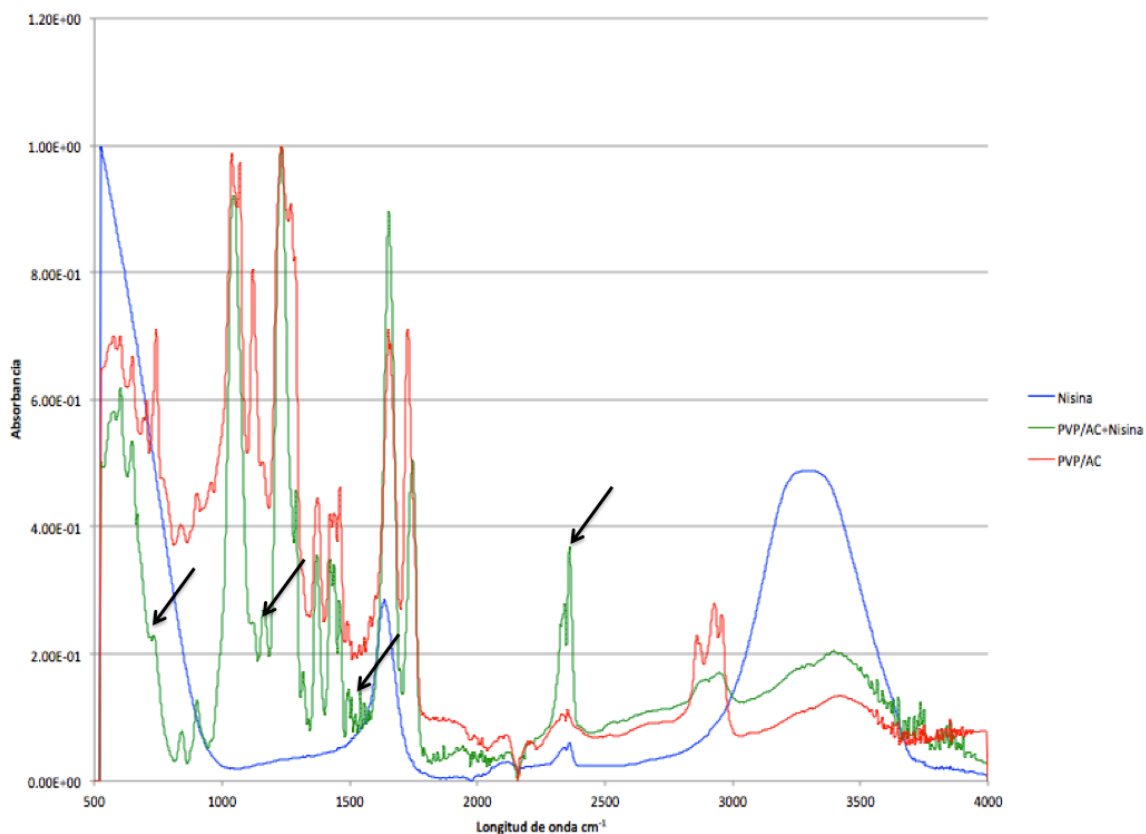


Figura 18. Se puede observar la diferencia de los picos presentes entre las membranas poliméricas en presencia (PVP/AC+Nisina) y ausencia (PVP/AC) de nisina.

Primeramente, se realizaron lecturas de las membranas activadas con nisina mediante FT-IR, con la finalidad de evaluar cambios en los picos de las señales obtenidas de las muestras de las membranas activadas en relación a las membranas en ausencia de nisina.

Los resultados de las lecturas de FT-IR de las membranas activadas se pueden apreciar en la figura 18, la cual muestra presencia de variaciones en los picos de las señales al ser comparada con las señales provenientes de las membranas en ausencia de nisina. Esto sugiere que existe una interacción entre el péptido antimicrobiano y los polímeros que componen la membrana. Esta interacción podría estar impidiendo la liberación de la nisina al agar. Lo anterior debido a la posible formación de interacciones entre la nisina y los polímeros conformantes de la matriz, que en conjunto a la presencia de los solventes y el procesamiento por electrospinning, hayan propiciado una adsorción del péptido dentro de la matriz. Éste tipo de comportamiento se ha mantenido en discusión hasta la fecha, pues existen trabajos que sugieren que la nisina adsorbida en superficies hidrofílicas se ve afectada con una disminución de la actividad antibacteriana, mientras que otros estudios sugieren que en efecto son las superficies hidrofóbicas las que mantienen atrapada la molécula peptídica y por lo tanto su liberación y actividad se ven menguadas (Karam et al. 2013).

Teniendo en cuenta que dentro de la matriz polimérica se tienen presentes elementos altamente hidrofílicos, como el PVP, y altamente hidrofóbicos, como lo es el AC, se puede decir que la combinación de este factor en presencia del proceso de electrospinning ocasionan un atrapamiento de la nisina desde el punto de vista de interacciones por cargas. De estar ocurriendo tal situación, una opción es modificar el pH del medio en el que se aplique la membrana activa para permitir la liberación de la nisina, pero como se ha reportado en otros trabajos (Del Prado et al. 2014) el aumento en el pH puede propiciar una liberación del principio activo en presencia de PVP, la cuestión es que de ser el caso, el pH del medio para que la nisina fuese liberada deberá de estar por encima de 7, lo cual no es factible para el presente trabajo pues la nisina sufre una desnaturalización a niveles de pH cercanos a 7 teniendo una disminución de su actividad desde pH superiores a 5 (Davies et al. 1998), debido a lo cual el aumento en el pH para buscar una liberación de la nisina desde la membrana no es una posibilidad bajo las condiciones que se manejaron en este trabajo.

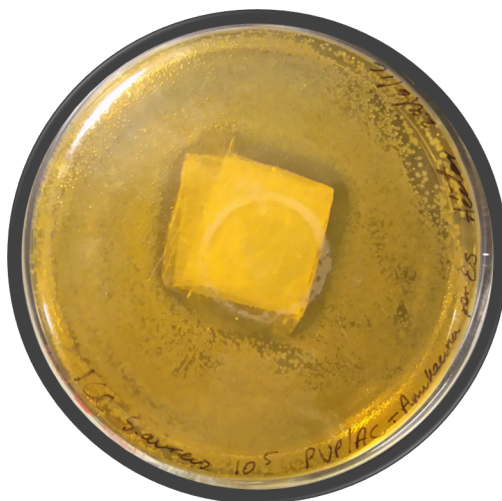


Figura 19. Membrana de PVP/AC activada mediante la adición de amikacina a la solución polimérica y procesada mediante electrospinning.

Teniendo en cuenta que se descartó modificar el pH para buscar una liberación de la nisina de los polímeros, se realizaron pruebas para determinar cual de los polímeros y/o solventes estaba generando la inactivación de la nisina en las membranas posterior al electrospinning.

Se realizaron pruebas para descartar que el mismo proceso de electrospinning estuviese inactivando el principio activo, para lo cual se activaron membranas con amikacina, el control positivo comercial que se manejó en las pruebas antimicrobianas previamente realizadas. Las condiciones bajo las cuales se obtuvieron estas membranas fueron las mismas bajo las que se obtuvieron las membranas PVP/AC+Nisina. En la figura 19 se puede observar que las membranas activadas con amikacina si presentan actividad inhibitoria ante el crecimiento de *S. aureus* por lo que se descartó que el proceso de electrospinning por si solo estuviese inactivando la nisina.

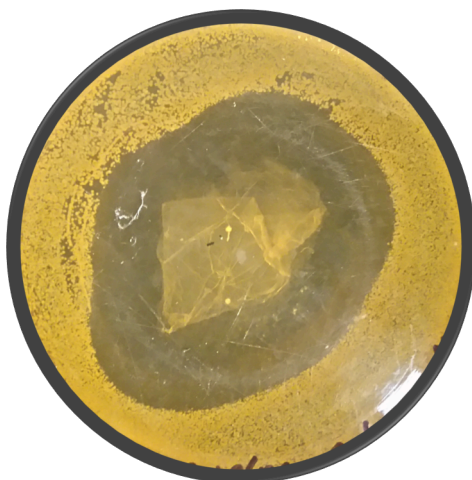


Figura 20. Membrana de PVP/AC activada con nisina mediante adsorción de la misma. Se puede apreciar que hay inhibición del crecimiento de *S. aureus*, por lo que la presencia de los polímeros por sí solos no es el factor que ocasiona un atrapamiento del péptido evitando así su acción antibacteriana.

De la prueba anteriormente realizada, se sugirió que posiblemente la presencia de alguno de los polímeros atrapara la nisina dentro de la membrana, por lo que se realizaron pruebas antibacterianas activando la membrana de PVP/AC mediante adsorción de la solución de nisina. En la figura 20 se puede apreciar que la presencia de ambos polímeros no es la razón a la que se deba el posible atrapamiento de la nisina, puesto que las pruebas mostraron resultados positivos para la inhibición del crecimiento de *S. aureus*.

Teniendo en cuenta que el proceso de electrospinning por sí sólo permite la activación de las membranas con otro principio activo y que las membranas se pueden activar en la presencia de ambos polímeros, se puede suponer que es en realidad un conjunto de parámetros los que en suma propician la inactivación de la nisina en las membranas.

9 CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos planteado, y como fruto de la discusión de los resultados obtenidos, se llega a las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que es posible obtener membranas poliméricas a base de una mezcla de PVP y AC mediante el proceso de electrospinning.
2. Las membranas obtenidas están formadas por fibras uniformes y no presentan cuentas, sin embargo el diámetro es mayor al reportado en literatura referente a la técnica de electrospinning.
3. La presencia de AC en las membranas confiere una mayor estabilidad a condiciones de almacenamiento y resistencia a la humectación y la solubilidad en contraste a las membranas compuestas solo de PVP.
4. Se puede apreciar que existe una interacción entre los compuestos poliméricos presentes en las membranas así como también entre los polímeros y la nisina.
5. Se logró conferir actividad antibacteriana contra *S. aureus* al activar las membranas mediante electrospinning con amikacina, sin embargo no fue así al añadir nisina.
6. Es posible activar las membranas posterior a su obtención por electrospinning al añadir la solución de nisina obteniendo actividad antibacteriana contra *S. aureus* por parte de las membranas.
7. Es posible que la suma de los solventes, los polímeros y el proceso de electrospinning propicien, en conjunto, que la nisina se vea afectada debido a lo cual no presenta actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

10 PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta que la presente línea de investigación se encuentra en una etapa temprana, se plantean algunas perspectivas a partir de los resultados obtenidos durante la realización del presente trabajo de investigación, principalmente orientándose en dos direcciones.

Por un lado se tiene el hecho de buscar la actividad antimicrobiana al añadir otros principios activos a la solución polimérica y ser procesadas por electrospinning con la idea de obtener membranas cuya actividad antimicrobiana sea efectiva. La opción más plausible, basándose en los resultados obtenidos, es la activación mediante la adición de fármacos comerciales, sin embargo no se descarta la idea de lograr adicionar moléculas alternativas a tales compuestos con la finalidad de generar propuestas alternativas para el tratamiento de microorganismos patógenos que sirvan como una posible respuesta ante casos de cepas resistentes a fármacos.

Por otro lado se encuentra el aspecto del desarrollo de los materiales. Las fibras resultantes de las membranas obtenidas tienen un diámetro en el rango micrométrico. Aún y cuando se encuentran en un rango que ha sido reportado anteriormente, sería interesante buscar reducir el diámetro lo más que se pueda, apuntando a lograr obtener fibras con diámetros en el rango nanométrico. Bajo esta misma línea, se propone la completa caracterización de las membranas obtenidas en relación a las propiedades físico-mecánicas.

Finalmente sería de gran interés el poder generar un protocolo para poder ser probado en modelos animales con la idea de evaluar los probables beneficios en la recuperación tisular en heridas epidérmicas por parte de la membranas elaboradas mediante electrospinning.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, S., Wendorff, J.H. & Greiner, A., 2009. Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Advanced Materials*, 21(32-33), pp.3343–3351. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200803092>.
- Agarwal, S., Wendorff, J.H. & Greiner, A., 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49(26), pp.5603–5621. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.014>.
- Altena, K. et al., 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: Organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), pp.2565–2571.
- Altoparlak, U. et al., 2004. The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. *Burns*, 30(7), pp.660–664.
- Bastarrachea, L. et al., 2010. Release kinetics of nisin from biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) films into water. *Journal of Food Engineering*, 100(1), pp.93–101.
- Bhardwaj, N. & Kundu, S.C., 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), pp.325–347.
- Bhattacharjee, P.K. & Rutledge, G.C., 2011. Electrospinning and Polymer Nanofibers: Process Fundamentals. In *Comprehensive Biomaterials*. pp. 497–512. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00039-8>.
- Bognitzki, M. et al., 2001. Preparation of fibers with nanoscaled morphologies: electrospinning of polymer blends. *Polymer Engineering and Science*, 41(6), pp.982–989.
- Braghirolli, D.I., Steffens, D. & Pranke, P., 2014. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discovery Today*, 19(6), pp.743–753. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644614001184>.

- Branski, L.K. et al., 2009. Emerging Infections in Burns. *Surgical Infections*, 10(5), pp.389–397. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2956561/>.
- Brumfitt, W., Salton, M.R.J. & Hamilton-Miller, J.M.T., 2002. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), pp.731–734. Available at: <http://jac.oxfordjournals.org/content/50/5/731> <http://jac.oxfordjournals.org/content/50/5/731.full> <http://jac.oxfordjournals.org/content/50/5/731.full.pdf> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407132>.
- Capoor, M.R. et al., 2010. Fungal infections in burns: Diagnosis and management. *Indian J Plast Surg*, 43(Suppl), pp.S37–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3038393&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Castillo-Ortega, M.M. et al., 2011. Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes. *Materials Science and Engineering C*, 31(8), pp.1772–1778. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.08.009>.
- Cha, D.S. et al., 2003. Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), pp.209–213.
- Chen, M. et al., 2012. Magnetic electrospun fluorescent polyvinylpyrrolidone nanocomposite fibers. *Polymer (United Kingdom)*, 53(20), pp.4501–4511. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2012.07.046>.
- Chuangchote, S., Sagawa, T. & Yoshikawa, S., 2009. Electrospinning of Poly(vinyl pyrrolidone): Effects of Solvents on Electrospinnability for the Fabrication of Poly(p-phenylene vinylene) and TiO₂ Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 114, pp.2777–2791.
- Cui, W., Chang, J. & Dalton, P.D., 2011. Electrospun Fibers for Drug Delivery. In *Comprehensive Biomaterials*. pp. 445–462. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552941001513>.

- D'Avignon, L.C. et al., 2010. Contribution of bacterial and viral infections to attributable mortality in patients with severe burns: An autopsy series. *Burns*, 36(6), pp.773–779. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417909005592>.
- Dai, M., Jin, S. & Nugen, S.R., 2012. Water-soluble electrospun nanofibers as a method for on-chip reagent storage. *Biosensors*, 2(4), pp.388–395.
- Davies, E.A. et al., 1998. Research note: The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. *Letters in Applied Microbiology*, 27(3), pp.186–187. Available at: <Go to ISI>://000075899100013.
- Del Prado, A., Navarro, R., Gallardo, A., Elvira, C., &Reinecke H. 2014. Synthesis of randomly aminated polyvinylpyrrolidone and its use in the preparation of hydrolyzable conjugates. *RSC Advances*, 68.
- Duque-Sánchez, L.M., Rodríguez, L. & López, M., 2014. Electrospinning : La Era De Las Nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(1), pp.10–27.
- Fernández, L. et al., 2008. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association*, 24(3), pp.311–316.
- Fischer, S. et al., 2008. Properties and Applications of Cellulose Acetate. *Macromolecular Symposia*, 262(1), pp.89–96. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/masy.200850210>.
- Forbes, 2013. Quemaduras infantiles, costos y retos en salud pública. *Forbes Mexico*. Available at: <http://www.forbes.com.mx/los-ninos-quemados-en-mexico-un-problema-desatendido/> [Accessed January 18, 2016].
- Fraga-Sastrías, M.J., González-Rodríguez, I. & Quillo-Olvera, D., 2008. Fundación Michou y Mau : Experiencia de 10 años en el traslado de pacientes quemados. *Trauma*, 11(1), pp.16–20.

- Guggenheim, M. et al., 2009. Changes in bacterial isolates from burn wounds and their antibiograms: A 20-year study (1986-2005). *Burns*, 35, pp.553–560.
- Guiga, W. et al., 2009. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2), pp.203–207.
- Haghi, a. K. & Akbari, M., 2007. Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, 204(6), pp.1830–1834.
- Heunis, T. et al., 2011. Release of bacteriocins from nanofibers prepared with combinations of poly(D,L-lactide) (PDLLA) and poly(ethylene oxide) (PEO). *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), pp.2158–2173.
- Heunis, T.D.J. & Dicks, L.M.T., 2010. Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, pp.1–10.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2926677&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Huang, Z.M. et al., 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), pp.2223–2253.
- ISP, 2012. Polyvinylpyrrolidone Polymers. *Performance-Enhancing Products*.
- Kamal, H., Abd-Elrahim, F.M. & Lotfy, S., 2014. Characterization and some properties of cellulose acetate-co-polyethylene oxide blends prepared by the use of gamma irradiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), pp.146–153.
Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687850714000089>.
- Karam, L. et al., 2013. Study of surface interactions between peptides, materials and bacteria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. *Journal of Materials and Environmental Science*, 4(5), pp.798–821.
- Kendouli, S. et al., 2014. Materials Science in Semiconductor Processing Modification of

cellulose acetate nanofibers with PVP / Ag addition. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 28, pp.13–19. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mssp.2014.03.010>.

Ki, C.S. et al., 2005. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer*, 46(14), pp.5094–5102. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386105004763>.

Kim, B. et al., 2005. Poly(acrylic acid) nanofibers by electrospinning. *Materials Letters*, 59(7), pp.829–832. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X0400878X>.

Knappe, P. et al., 2010. Characterization of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)s with broad size distributions. *Polymer*, 51, pp.1723–1727.

Konwarh, R., Karak, N. & Misra, M., 2013. Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 31(4), pp.421–437. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013000049>.

Lee, K.H. et al., 2003. Characterization of nano-structured poly(E-caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer*, 44, pp.1287–1294.

Li, M. et al., 2005. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(30), pp.5999–6008.

Liu, W. et al., 2010. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*, 467(7314), pp.420–425. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1038/nature09442>.

Madoff, L.C. & Pereyra, F., 2012. Infectious Complications of Burns. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*.

Martínez, B. & Rodríguez, A., 2009. Nisina y otros lantibióticos. In G. Pérez Martínez, ed. *Fundamentos biológicos, procesos y biotecnología de Bacterias Lácticas*. Asturias, España: CSIC, pp. 1–46.

- McKee, M.G. et al., 2004. Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters. *Macromolecules*, 37(5), pp.1760–1767.
- Miyashita, Y., Suzuki, T. & Nishio, Y., 2002. Miscibility of cellulose acetate with vinyl polymers. *Cellulose*, 9(3-4), pp.215–223.
- Naqvi, S.Z.A. et al., 2014. Burn wound infection; significance of rule of nine in microbial surveillance. *The Professional Medical Journal*, 21(5), pp.869–874.
- Orozco-Valerio, M. de J. et al., 2012. Tendencia de mortalidad por quemaduras en México. *Gaceta Médica de México*, 148, pp.349–357.
- Pham, Q.P., Sharma, U. & Mikos, A.G., 2006. Electrospun poly (??-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*, 7(10), pp.2796–2805.
- Piper, C. et al., 2009. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(June), pp.546–551.
- Ramakrishna, S. et al., 2006. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials Today*, 9(3), pp.40–50.
- Rangel-Gaspar, H., 2005. Infección en quemaduras. *Cirugía Plástica*, 15(2), pp.111–117. Available at: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cplast/cp-2005/cp052h.pdf>.
- Sanjurjo, K. et al., 2006. Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 39(6), pp.749–754.
- Smith, W.F. & Hashemi, J., 2006. *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales* 4ta ed., McGraw-Hill.
- Son, W.K. et al., 2004. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 45(9), pp.2959–

2966.

Subbiah, T. et al., 2005. Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96(2), pp.557–569. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.21481>.

Wendorff, J.H., Agarwal, S. & Greiner, A., 2012. *Electrospinning Materials, Processing, and Applications*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.

Yördem, O., Papila, M. & Menciloğlu, Y., 2008. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: an investigation by response surface methodology. *Materials & Design*, 29, pp.34–44.

Zhang, Y. et al., 2002. Viscometric study of poly (vinyl chloride)/poly(vinyl acetate) blends in various solvents. *European Polymer Journal*, 38, pp.333–337.

12 RESUMEN BIOGRÁFICO

Héctor Daniel López Calderón

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: EFECTO ANTIMICROBIANO EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE MEMBRANAS A BASE DE POLIVINILPIRROLIDONA Y ACETATO DE CELULOSA ELABORADAS POR ELECTROSPINNING Y ACTIVADAS CON NISINA

Campo de estudio: Biotecnología

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 22 de Noviembre de 1988, hijo de Celia Calderón y Héctor López.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en el 2013.