

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE SALES DE AMONIO CUATERNARIO EN UN HIDROGEL

Velásquez, Ingrid¹; Camacaro, Rosa¹ y Dasniel Dayeili¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Maracay, Venezuela.

vvelasquez@uc.edu.ve

Resumen: Los geles comerciales basan su propiedad antimicrobiana en su contenido de alcohol; sin embargo, en esta investigación se propone la incorporación de compuestos a base sales de amonio cuaternario como agentes antimicrobianos incorporadas en un hidrogel. Se preparan tres geles dos con estas sales y uno a base alcohol. Se evalúa su acción sobre dos cepas microbianas certificadas (ATCC). Los geles también son sometidos a estímulos como variación de pH y temperatura del medio. Los resultados muestran que los geles se comportan como materiales inteligentes al responder favorablemente ante los estímulos probados, lo que se evidencio en su alta capacidad de hinchamiento. En general, todos los geles presentan un pH neutro, y buena consistencia, lo que permite su uso tópico sobre la piel. En cuanto a efecto antimicrobiano se probaron dos geles (A y B) con sales de amonio y se comparó contra un blanco a base de alcohol (Gel C), encontrándose una acción bacteriostática solo sobre la *S. aureus*, por parte del gel A que contenía Cloruro de benzalconio, mientras que para la *P. aeruginosa* ninguno de los geles tuvo un efecto sobre su crecimiento microbiano.

Palabras clave: Hidrogel, antimicrobianos, red polimérica, carboximetilcelulosa

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL CAPACITY OF QUATERNARY AMMONIUM SALTS IN A HYDROGEL

Abstract: Commercial gels base their antimicrobial property on their alcohol content; however, in this research we propose the incorporation of compounds based on quaternary ammonium salts as antimicrobial agents incorporated in a hydrogel. Three gels are prepared, two with these salts and one with an alcohol base. Its action on two certified microbial strains (ATCC) is evaluated. The gels are also subjected to stimuli such as variation in pH and medium temperature. The results show that the gels behave like intelligent materials when responding favorably to the stimuli tested, which was evidenced by their high swelling capacity. In general, all gels have a neutral pH, and good consistency, which allows their topical use on the skin. Regarding antimicrobial effect, two gels (A and B) were tested with ammonium salts and compared against an alcohol-based blank (Gel C), finding a bacteriostatic action only on *S. aureus*, by gel A that it contained benzalkonium chloride, while for *P. aeruginosa* none of the gels had an effect on its microbial growth

Keywords: Hydrogel, antimicrobials, polymeric network, carboxymethylcellulose

INTRODUCCIÓN

La capacidad de los hidrogeles de contener gran cantidad de agua y formar estructura entrecruzada, les permite tener muchas aplicaciones a nivel industrial como producto de uso personal, agricultura, sensores, sistemas de liberación de medicamentos, y sorbentes entre otros (Hoffman, 2012; Ullah et al., 2015). Un hidrogel se puede definir como un grupo de materiales poliméricos cuya estructura hidrófila los hace capaces de contener grandes cantidades de agua en sus redes tridimensionales (Omidian y Park, 2012). El líquido embebido sirve como un filtro selectivo que permite la difusión libre de algunas moléculas de soluto, mientras que la red de polímero sirve como una matriz para mantener el líquido. Los hidrogeles poseen propiedades mecánicas que pueden variar y adecuarse dependiendo del propósito del material. Es posible obtener un gel con mayor rigidez aumentando el grado de reticulación (Chirani et al., 2015), la reticulación restringe el movimiento de las cadenas y aumenta la resistencia del polímero cambiando algunas propiedades mecánicas como flexibilidad, rigidez y fluidez (Balani et al., 2015)

Los hidrogeles pueden clasificarse en sintéticos y naturales, dependiendo de la materia de donde se obtenga, entre los sintéticos se encuentran el polietilenglicol, poliácridamida, ácido poli láctico y el polivinil alcohol, dentro de los naturales se encuentra la celulosa, el quitosano, ácido hialurónico, etc. (Raia et al, 2017; Wang et al., 2017). La mayoría de los geles comerciales se elaboran a partir de polímeros sintéticos (polilácticos, poliácridamida) que le proporcionan una alta estabilidad al producto. Por otra parte, también son empleados polímeros

naturales como la carboximetilcelulosa, requiriendo el uso de un agente entrecruzante para aumentar su estabilidad en el tiempo.

Los geles de carboximetilcelulosa (CMC) pueden ser favorecidos para uso comercial debido a su bajo costo. La CMC es un derivado de polímero natural aniónico y soluble en agua que se usa ampliamente en detergentes, en las industrias de alimentos, papel y textiles debido a sus propiedades que permiten aumentar la viscosidad (Mohamed et al., 2017). La capacidad de absorción de agua se atribuye a la existencia de grupos químicos como ácidos carboxílicos, amina, hidroxilo, amida, y grupos sulfónicos.

La formulación de un gel, con propiedades antimicrobianas es una alternativa en la prevención de infecciones sobre la piel, formando películas que impidan que los microorganismos patógenos presentes en ambientes intrahospitalarios y extrahospitalarios causen infecciones bacterianas. Los geles comerciales contienen solo alcohol como agente bactericida. La finalidad de esta investigación es evaluar un gel antibacterial que contiene sales de amonio como agente antimicrobiano, y estudiar su comportamiento ante variaciones de pH y temperatura del medio. La importancia de estos dos últimos parámetros radica en la influencia de estos sobre los sistemas fisiológicos, biológicos y químicos

METODOLOGÍA

Preparación del gel

Se preparan tres geles empleando como polímero la carboximetilcelulosa. El primer gel contiene Cloruro de alquildimetil bencil amonio (Cloruro de benzalconio) (Gel A),

el segundo contiene Cloruro de diestearildimetil amonio (Gel B), y el último gel sin antimicrobiano (Gel C). Todos los geles se prepararon de la siguiente manera: se disolvieron 3g de carboximetilcelulosa (CMC, grado técnico) en agua destilada, luego se adicionan una mezcla cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de calcio (CaCl₂) al 1% (en una proporción de 2:1) por último se adicionó 1% de alcohol isopropílico (70%), a los geles A y B se le adicionó una disolución al 1% del compuesto de sal de amonio. Se homogenizó manualmente y se dejaron reposar por 24 h a temperatura ambiente.

Caracterización fisicoquímica del hidrogel

Densidad y pH

Se determinó la densidad del gel según COVENIN: 703- 2001, y el pH usando un medidor multiparámetros con electrodo (phmetro) de membrana de vidrio con compensación de temperatura y electrodo de conductividad, marca Corning modelo 240.

Viscosidad cinemática

Se determinó la viscosidad cinemática de acuerdo a la ley de Stoke. Este método establece que la fuerza de arrastre viscoso que se opone al movimiento de una esfera a través de un fluido, se calcula mediante la ecuación 1, la esfera empleada posee una masa de 1,2511g y un diámetro de 0,0368mm

$$\text{Viscosidad } (\eta) = \frac{2(\rho_{\text{esfera}} - \rho_{\text{hidrogel}}) * g * R^2}{9v_{\text{limite}}} \quad (1)$$

donde: ρ densidad, v_{limite} velocidad limite, g gravedad, R radio de la esfera.

Para determinar la velocidad limite se coloca una muestra del hidrogel en un cilindro graduado de 100mL, por la parte central del cilindro y en la superficie del gel se deja caer la esfera y se toma el tiempo que tarda en recorrer 70mL, la medición se realizó por triplicado.

Capacidad de hinchamiento

Esta capacidad se determinó por gravimetría. El gel obtenido se secó a 100 °C durante 3 horas en una estufa marca Digiheat, hasta obtener un peso constante. El gel obtenido bajo estas condiciones se denomina, xerogel. De este se tomaron 2g y se colocaron en un recipiente con 20mL de agua destilada a temperatura ambiente por 3 horas, transcurrido este tiempo se elimina el exceso de agua en su superficie, y posteriormente se pesó para determinar la ganancia en agua. El procedimiento se realizó por triplicado, el agua absorbida por los geles se determinó según la ecuación 2:

$$\text{Capacidad de Hinchamiento } (W) = \frac{(W_s - W_d)}{W_d} * 100 \quad (2)$$

donde W_s es el peso del gel hinchado, y W_d el peso del gel seca (Orozco et al., 2011)

Efecto de variaciones de pH y temperatura del medio sobre el gel

El efecto del pH sobre la capacidad de hinchamiento del gel se determinó modificando el procedimiento propuesto por Akar et al., (2011).

Para ello se utilizaron tres soluciones buffer: acetato de sodio con ácido acético para un pH ácido (pH 5), fosfato de sodio monobásico y dibásico para un pH neutro (pH 7,4) y ácido bórico, hidróxido de sodio

y cloruro de potasio para un pH alcalino (pH 9.). Se procedió a tomar seis muestras del xerogel, cada muestra de 1g, estas se colocaron en recipientes no graduados por duplicado, con 10mL de las soluciones buffer ácido, neutro y alcalino respectivamente. Las muestras se dejaron reposar por 60 min a temperatura ambiente, para posteriormente determinar su capacidad de hinchamiento.

Para evaluar el efecto de la temperatura, sobre la capacidad de hinchamiento del gel, se consideró un rango entre 10°C y 80° C, con variaciones de temperatura (ΔT) de 10°C. Se tomó 1g del xerogel y se sumergió en 10mL de agua destilada a la temperatura de estudio, se midió su capacidad de hinchamiento cada 30 min hasta completar 90 min. Se construyó la gráfica del porcentaje de hinchamiento en el tiempo. (García et al., 2003)

Efecto antimicrobiano del gel

Para establecer el efecto antimicrobiano de los geles preparados se eligieron dos cepas certificadas, *Staphilococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853). Inicialmente las cepas son activadas al ser cultivadas a 37°C por 24 h, la *S. aureus* en agar sangre y *P. aeruginosa* en agar MacConkey. El método empleado se basó en el método de Kirby – Bauer, recomendado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, siglas en inglés).

Se preparó una suspensión bacteriana de 0,5 MacFarland, y se inoculó cada placa de agar Mueller – Hinton mediante hisopado, luego se embebieron discos de papel de filtro con los 2 modelos de geles previamente preparados, cada disco impregnado con un gel distinto A, B y usando el gel C como control negativo. Las

placas se incubaron a 37°C durante 24h. Se consideró que la formación de un halo se obtendrá cuando el microorganismo en estudio es sensible al gel y no se forma halo cuando este es resistente al gel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características fisicoquímicas

En la Tabla 1 se muestran algunas propiedades intensivas medida a los geles preparados (A, B, C), donde se encontró que todos los geles presentan un pH neutro y cercano al agua pura (pH 7), sin embargo, el pH de una piel normal es aproximadamente 5,5.

Para la aplicación de un producto cosmético se recomienda emplear productos con pH en un rango entre 6 y 8, para evitar daños en la estructura celular y se afecte la barrera protectora de la piel. Por lo que los geles obtenidos pueden ser aplicados sobre la piel.

En cuanto a la densidad los geles A y B, que poseen agente antimicrobiano, presentaron densidades menores a la del agua, mientras que el gel C es igual al del agua. Con respecto a la viscosidad cinemática de los geles A y B está entre 0.14 y 0.15 cP, es decir no hay una diferencia significativa entre sus viscosidades, mientras que para el gel C (solo carboximetilcelulosa) es la mitad (0.07 cP) siendo más líquida que los anteriores.

Por lo que se presume un entrecruzamiento o formación de red entre las sales de amonio cuaternario (Cloruro de alquildimetil bencil amonio y Cloruro de diestearildimetil amonio) y la carboximetilcelulosa.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los geles obtenidos

Gel	pH±0.01	Densidad ±0.01 (g/cm ³)	Viscosidad ±0.05 (cP)
A ¹	7,43	0.82	0.15
B ²	7,58	0.88	0.14
C ³	7,36	1.03	0.07

¹cloruro de benzil alquildimetil amonio, ²Cloruro de diestearil dimetil amonio, ³solo carboximetilcelulosa

Los geles elaborados a partir de la carboximetilcelulosa pueden entrecruzarse físicamente empleando mezcla de sales de cloruro de sodio y cloruro de calcio, obteniéndose un gel transparente con un aspecto de solido elástico. Las sales mono y divalentes inducen cambios en la estructura y presión osmótica del gel. (Horkay et al., 2001).

Sin embargo, el entrecruzamiento químico también puede ocurrir por la formación de uniones covalentes, o por fuerzas intermoleculares como las de Van der Waals y tipo puente de hidrogeno. Un gel muy entrecruzado tiene una estructura muy compacta, y esto determina su solubilidad, porosidad del material, área superficial, grado de hinchamiento y la resistencia mecánica del material (Ahmed, 2015).

Efecto de variaciones de pH y temperatura, del medio, sobre el gel

La capacidad de hinchamiento es la principal propiedad que poseen los geles, puesto que está relacionada con la capacidad de absorber grandes cantidades de líquido. Esta propiedad resulta de un balance entre las fuerzas osmóticas que causan que el agua penetre entre las cadenas del polímero hidrófilo y las fuerzas cohesivas existentes entre estas cadenas que oponen resistencia a la expansión

(Soto y Oliva, 2012). En este trabajo se determinó el efecto de los cambios del pH y temperatura del medio sobre los geles A y B. No se considera el gel C dado está conformado solo por CMC.

Efecto del cambio de pH del medio sobre el gel

En la figura 1 se muestra la influencia del pH del medio sobre la capacidad de hinchamiento del gel A y B, encontrándose que a pH ácido el gel A (2000%) es capaz de absorber más agua que el gel B (500%). Los hidrogeles sensibles al pH están compuestos por polímeros que contienen en su cadena macromolecular, grupos ácidos (ácido carboxílico o sulfónico) o básicos (aminas presentes en las sales de amonio) capaces a aceptar o liberar protones en presencia de las variaciones del pH del medio circundante. La ionización de estos grupos deja redes poliméricas cargadas, generándose interacciones electrostáticas que producen un hinchamiento o deshinchamiento en el hidrogel.

En el caso del gel B luego del entrecruzamiento químico predominan los grupos carboxílicos, por lo que a pH bajo aceptan protones y casi no hinchan, mientras que en el caso del gel A predomina la amina de la sal de amonio, por lo que se hincha con facilidad a estos valores de pH.

Para pH neutro ambos geles (A y B) presentan su mayor porcentaje de hinchamiento, ya que a este pH los grupos se encuentran completamente disociados, y se incrementa su afinidad por el agua. Para los grupos carboxílicos (pKa = 4,6) la ionización ocurre cuando el pH del medio está por encima de su pKa, mientras que para los grupos amino (pKb = 9,2) se

ionizan por debajo de su pKa. Al cambiar el pH del medio a alcalino el gel A se hincha menos por la falta de disociación, y ahora el gel B presenta un hinchamiento parecido al encontrado a pH neutro. En este último gel, con el incremento del pH se producen repulsiones electrostáticas de los grupos carboxilatos (COO-) provocándose el hinchamiento del hidrogel.

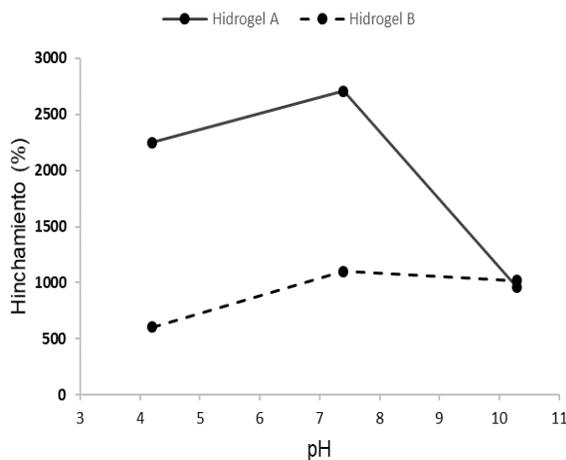


Figura 1. Efecto de la variación de pH del medio sobre Gel A y Gel B

Los geles A y B son denominados geles inteligentes, ya que responden a cambios de pH del medio circundante, la cantidad de agua absorbida depende del carácter hidrofílico de los polímeros empleados y del grado de entrecruzamiento, que permite tener una red más abierta y un potencial hinchamiento (Ahmed, 2015).

Efecto del cambio de temperatura, del medio, sobre el gel

En la Figura 2 se observa como la temperatura del medio afecta la capacidad de hinchamiento del gel A en el tiempo, para el rango de temperatura entre 10 y 40°C se encontró que el porcentaje de hinchamiento aumenta en el tiempo,

encontrándose un máximo de absorción del agua a 30°C, en los otros casos la temperatura causa una reducción de las fuerzas intermoleculares por lo que la capacidad de retención se ve afectada.

Al aumentar la temperatura entre 50 y 80°C, el gel A se sigue hinchando, pero al cabo de una hora hay una caída del porcentaje de retención de agua, esta disminución de la capacidad de hinchamiento puede atribuirse a la ruptura de los puentes de hidrogeno formados durante el entrecruzamiento entre las sales y el polímero debido a las elevadas temperaturas. Dependiendo de la temperatura el colapso de la red polimérica es más evidente, como por ejemplo a los 80°C.

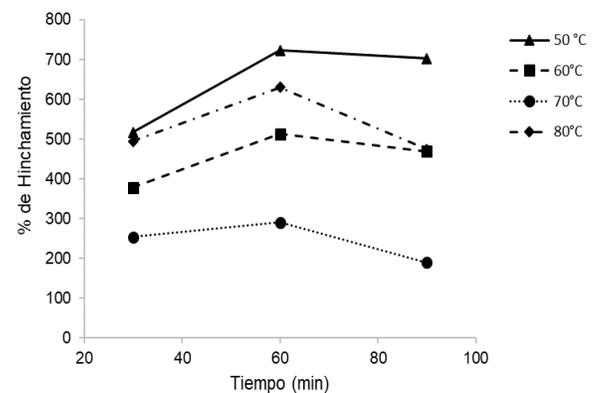
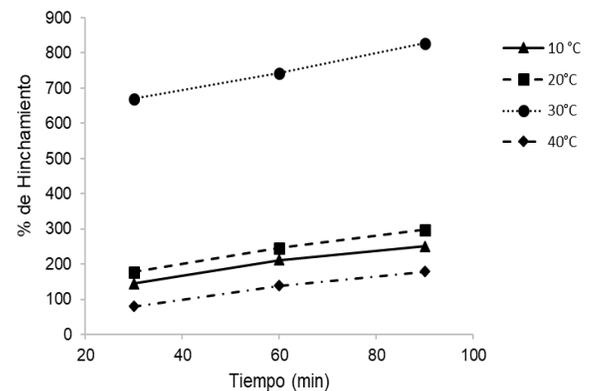


Figura 2. Efecto temperaturas del medio sobre el Gel A

Para el Gel B el comportamiento ante los cambios de temperatura es diferente (Figura 3), experimentando un aumento del porcentaje de hinchamiento a bajas temperaturas (10 y 20 °C) en el tiempo. Para 30 y 40 °C, se observa un quiebre al transcurrir una hora y en consecuencia una disminución de su capacidad de retener agua.

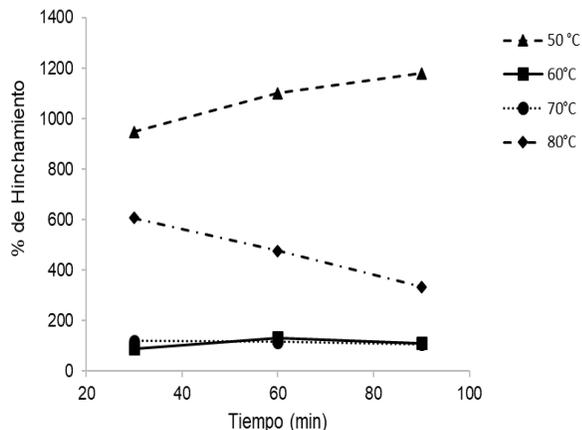
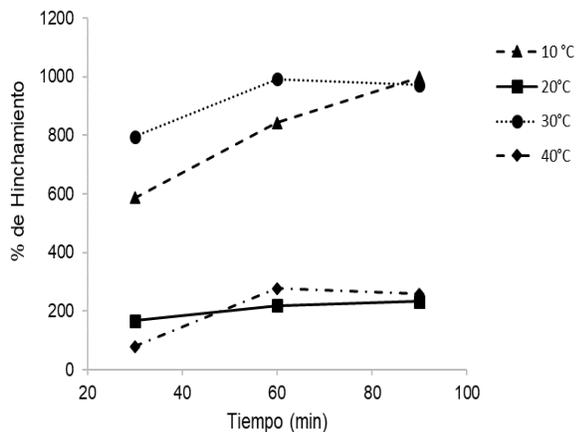


Figura 3. Efecto temperaturas del medio sobre el Gel B

Al aumentar la temperatura entre 50 y 70°C hay un aumento del porcentaje de hinchamiento en el tiempo, sin embargo, para 60 y 70 °C el porcentaje es cercano al 100%. El gel colapsa a los 80°C

observándose una caída de su capacidad de retención luego de 30 min, es decir, hay una ruptura de la red polimérica, mucho más severa que la mostrada por el gel A.

Los geles A y B son considerados termosensibles ya que presentan respuestas distintas ante cambios de temperatura. El cambio del volumen de un gel termosensible viene caracterizado por la temperatura de miscibilidad crítica inferior (TMCI) de la cadena del polímero, la TMCI es la temperatura por debajo de la cual los componentes de una mezcla son miscibles para todas las composiciones, es el límite inferior a un intervalo de temperatura de miscibilidad parcial (Said et al., 2004). En este estudio se encontró que la TMCI para el gel A es 50°C, ya que hasta esa temperatura la red polimérica del gel permanece estable. En el caso de gel B el comportamiento encontrado no es concluyente para establecer su TMCI.

Por debajo de la TMCI, el término de entalpía, relacionado con el enlace de hidrógeno entre el polímero y las moléculas de agua, es responsable de la hinchazón del polímero. Cuando la temperatura se eleva por encima de la TMCI, el término de entropía (interacciones hidrofóbicas) domina, lo que conduce a la contracción del polímero. (Ilić-Stojanović et al., 2011).

Efecto antimicrobiano del gel

Los geles A, B y C fueron evaluados sobre dos cepas certificadas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* (bacteria gramnegativa) y *Staphylococcus aureus* (bacteria grampositiva). El gel C posee solo alcohol y representó el control.

Los resultados muestran que para la cepa de *P. aeruginosa*, no hubo formación de

halos de inhibición (Figura 4), es decir, los compuestos activos presentes tanto en gel A y B (sales de amino), así como en gel C (alcohol) no lograron penetrar la membrana que cubre la bacteria y causar un efecto bactericida. La *Pseudomonas* son bacilos gramnegativos, estas bacterias son resistentes a la mayoría de los antibióticos y desinfectantes, Una característica de las bacterias gram

negativo es que poseen una membrana que forma un saco rígido alrededor de la bacteria, y adicionalmente poseen un espacio periplasmático entre la membrana citoplasmática y la membrana externa (Jawetz et al., 1985), por tanto, un agente antimicrobiano debe ser capaz de difundirse a través de esta membrana para inhibir el crecimiento microbiano

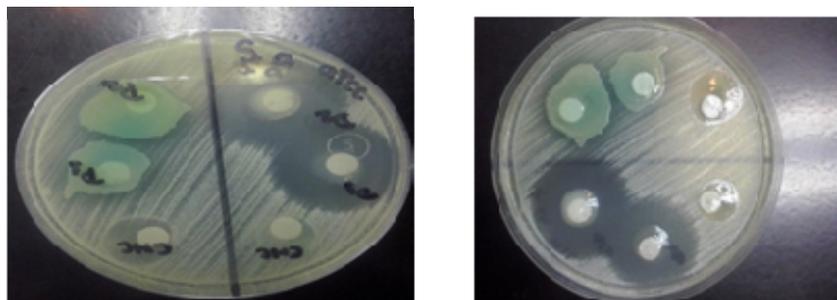


***P. aeruginosa* ATCC 27853**

Figura 4. Efecto antimicrobiano de los geles sobre *P. aeruginosa*

Para la cepa de *Staphylococcus aureus*, se evidenció la formación de halos de 30mm y 28mm al usar el Gel A, sin embargo, para los geles B y C no hubo un efecto inhibitorio sobre esta cepa (Figura 5). La formación de este tipo de halos indica un efecto antimicrobiano, del tipo bacteriostático, en este caso el compuesto

activo (Cloruro de benzalconio) penetra la pared celular de esta bacteria, desintegrando las proteínas y ácidos nucleicos que la conforman, y ocasiona la fuga del material intracelular y en consecuencia su capacidad de reproducirse.



***S. aureus* ATCC 25923**

Figura 5. Efecto antimicrobiano de los geles sobre *S. aureus*

Es necesario señalar que los bacilos gramnegativos como las *Pseudomona* poseen más mecanismos de resistencia que los grampositivos, por lo que son capaces de presentar dos o más mecanismos de resistencia simultáneamente (Ebrahimi, et al., 2017), lo que les confiere mayor posibilidad de sobrevivir cuando se enfrenta a compuestos biocidas como los evaluados en este estudio.

Por otra parte, el uso de concentraciones de biocidas inferiores a las requeridas para detener el crecimiento microbiano, puede inducir la resistencia de las cepas a estos compuestos. Para lograr una efectividad de los agentes antimicrobianos debe ajustarse la concentración de aplicación partiendo de la concentración mínima inhibitoria del biocida para el tipo de cepa bajo estudio.

CONCLUSIÓN

Los geles formulados tienen como agente bactericida sales de amonio cuaternario, y presentan un pH neutro y buena viscosidad. El pH muestra que los geles pueden ser utilizados de forma tópica sobre la piel. Dependiendo del compuesto activo utilizado el gel puede verse afectado por cambios de pH y temperatura.

En esta investigación se encontró que el Gel A, cuyo compuesto activo es Cloruro de alquildimetil bencil amonio, se comporta mejor ante cambios de pH y temperatura, que el gel B (Cloruro de diestearildimetil amonio), sin embargo, ambos geles (A y B) se comportan como materiales inteligentes al responder ante los estímulos propuestos.

En cuanto a su actividad antimicrobiana, se encontró que solo el gel A logra inhibir

el crecimiento (efecto bacteriostático) del *S. aureus*. Para la cepa *P. aeruginosa* ninguno de los geles logra un efecto inhibitorio.

REFERENCIAS.

Ahmed. E. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* 6: 105–121

Akalin G. y Pulat M. (2018). Preparation and Characterization of Nanoporous Sodium Carboxymethyl Cellulose Hydrogel Beads. *Journal of Nanomaterials* Article ID 9676949.

Akar E., Altinisik A. y Seki Y. (2012) Preparation of pH- and ionic-strength responsive biodegradable fumaric acid crosslinked carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers* 90:1634–1641.

Balani K., Verma V., Agarwal A. y Narayan R. (2015), Physical, thermal, and mechanical properties of polymers. *Biosurfaces: A Materials Science and Engineering Perspective*, 1era Edición. Editorial: John Wiley Sons Inc; 329-344.

Chirani N., Yahia L.H., Gritsch L., Motta F., Chirani S., y Faré S. (2015). History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Science*, 4(2):13

Ebrahimi A., Arvaneh Z., Mahzounieh M. y Lotfalian S. (2017). Antibiotic resistance induction by benzalkonium chloride exposure in nosocomial pathogens. *IntJ Infect.*4(2) :e40296.

García D., Escobar J.L, Bada N. y Casquero J. (2003). Estudio de la transición crítica a temperaturas bajas

(LCST) en hidrogeles termosensibles de poli (N-Isopropilacrilamida-co-N,N-dimetilacrilamida). Sociedad cubana de bioingeniería.

Hoffman A.S., (2012) Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 64:18–23.

Horkay F., Tasaki I. y Basser P. (2001). Efect of monovalent-divalent cation exchange on the swelling of polyacrylate hydrogel in physiological salt solutions-*Biomacromolecules*, 2 (1):195-199.

Ilić-Stojanović S., Nikolić L., Nikolić V., Petrović S., Stanković M., Mladenović-Ranisavljević I. (2011). Stimuli-sensitive hydrogels for pharmaceutical and medical applications. *Physics, Chemistry and Technology*, 9 (1): 37 – 56.

Jawetz E., Melnick J., Adelberg E. (1985). *Microbiología médica*. 11a Edición. Mexico. Editorial Manual moderno S.A.

Mohamed MA, Mutalib A., Mohd A., Za H., Zain M, Mohamad AB, Minggu J., Awang NA y Salleh WN. (2017) An overview on cellulose-based material in tailoring bio-hybrid nanostructured photocatalysts for water treatment and renewable energy applications. *Int J Biol Macromol* 103:1232–1256

Omidian H. y Park K. (2012). *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*: 75-106.

Orozco E, Hernández S., Gómez E., Katime, I. (2011) Estudio del hinchamiento de hidrogeles acrílicos terpoliméricos en agua y en soluciones acuosas de Ión Plumboso. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2011; 10(3): 465-470

Raia N, Partlow B, McGill M, Kimmerling E, Ghezzi C y Kaplan D. (2017) Enzymatically crosslinked silk-hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials* 131: 58–67.

Said, H. M., Alla, G. A. y El-Naggar, A. W. (2004) Synthesis and characterization of novel gels based on carboxymethyl cellulose/acrylic acid prepared by electron beam irradiation. *Reactive & Functional Polymers* 61: 397–404.

Soto D., y Oliva H. (2012). Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: una revisión. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* (2): 154-175.

Ullah F, Othman M.B., Javed F, Ahmad Z. y Akil H.M. (2015) Classification, processing and application of hydrogels: a review. *Mater Sci Eng C* 57:414–433

Wang Y., Yuan Y., Bae H., Dixon B. y Chen P. (2017) Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 35(5): 530–544

Fecha de recepción: 01 de junio de 2018

Fecha de aceptación: 30 de noviembre de 2018