The background of the entire page is a grayscale scanning electron micrograph (SEM) of a porous polymer membrane. The structure is highly porous and interconnected, with a complex network of fibers and large, irregular voids. The texture is fibrous and sponge-like, typical of membranes used in dialysis.

Estudio de membranas poliméricas para su potencial aplicación en hemodiálisis

J. Jazmín Muñoz Macías



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

Título de la Tesis

*Estudio de membranas poliméricas para su potencial
aplicación en hemodiálisis*

Tesis que presenta

Q. Jessica Jazmín Muñoz Macías

Para obtener el grado de

Maestra en Nanociencias y Materiales

Director de la Tesis

Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios

San Luis Potosí, S.L. P., mayo de 2025



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Estudio de membranas poliméricas para su potencial aplicación en hemodiálisis**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Jessica Jazmín Muñoz Macías** y aprobada el **19 de mayo de 2025** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana
Miembro del Comité Tutorial

Dra. María del Pilar González Muñoz
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios
Director de la tesis



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Polímeros de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.1241566).

Dedicatorias

To my parents, for their love and unconditional support.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios por su valiosa mentoría, guía y enseñanzas a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Extiendo también mi gratitud a la Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas en su laboratorio, así como por su generosidad y disposición para compartir su conocimiento. Gracias por todo lo enseñado. También agradezco a la Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva y Dra. María del Pilar González Muñoz por su participación y retroalimentación durante los periodos de evaluación, los cuales enriquecieron esta investigación.

Agradezco al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) por facilitar el acceso a sus equipos de caracterización y por el servicio brindado, los cuales fueron fundamentales para la obtención de los resultados presentados en esta tesis. También agradezco al laboratorio de polímeros por su disposición para compartir su conocimiento y por el apoyo brindado que contribuyó al éxito de esta investigación.

De igual forma, agradezco al Dr. Jaime Ruiz García, del Laboratorio de Coloides e Interfases de la UASLP, por permitir el uso del equipo AFM.

Agradezco a la estudiante de licenciatura Raquel Zárate Villalobos por su colaboración en la obtención de resultados para esta tesis durante su estancia de verano en la 26ª edición del Verano de la Ciencia Región Centro.

Finally, I would like to thank Dr. Amira Abdelrasoul for the opportunity to collaborate with her research group at the University of Saskatchewan, Canada. Thank you so much for all your support.

I would also like to dedicate a few heartfelt words to Dr. Marwa Al Hassan, who taught me everything in the lab, encouraged and inspired me. Thank you for sharing your knowledge, culture, and kindness with me; it truly felt like home.

Contenido

| | |
|--|-----|
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| Índice de tablas | xi |
| Índice de figuras | xii |
| Resumen | xv |
| Abstract..... | xvi |
| Introducción..... | 17 |
| Preguntas de investigación..... | 18 |
| Objetivo general | 18 |
| Objetivos específicos | 19 |
| Hipótesis..... | 19 |
| Marco Teórico | 20 |
| 2.1 Generalidades del riñón | 20 |
| 2.1.1 Anatomía del riñón | 20 |
| 2.1.2 Fisiología del riñón..... | 22 |
| 2.1.3 Enfermedades del riñón..... | 24 |
| 2.2 Terapias de reemplazo renal | 24 |
| 2.2.1 Diálisis peritoneal..... | 25 |
| 2.2.2 Hemodiálisis..... | 25 |
| 2.3 Toxinas urémicas | 27 |
| 2.4 Mecanismos de transporte | 28 |
| 2.4.1 Difusión | 28 |
| 2.4.2 Convección | 29 |
| 2.4.3 Adsorción | 29 |
| 2.5 Membranas para diálisis | 30 |
| 2.5.1 Clasificación..... | 30 |
| 2.5.2 Características | 30 |
| 2.5.3 Polímeros..... | 31 |
| 2.5.4 Métodos de fabricación de membranas | 34 |
| 2.5.5 Tendencias..... | 36 |
| 2.6 Sostenibilidad | 40 |

| | |
|---|----|
| Metodología..... | 41 |
| 3.1 Materiales | 41 |
| 3.2 Síntesis de PVOH esterificado..... | 41 |
| 3.3 Fabricación de membranas | 41 |
| 3.4 Técnicas de caracterización | 42 |
| Funcionalización del PVOH..... | 43 |
| 4.1 Antecedentes..... | 43 |
| 4.2 Metodología..... | 45 |
| 4.2.1 Funcionalización del PVOH..... | 45 |
| 4.2.2 Curva de calibración mediante FTIR | 46 |
| 4.2.3 Caracterizaciones fisicoquímicas | 46 |
| 4.3 Resultados y discusión..... | 46 |
| 4.3.1 Mecanismo de reacción de la funcionalización del PVOH con ácido cítrico..... | 46 |
| 4.3.2 Efecto de la funcionalización en la estructura química del PVOH | 47 |
| 4.4 Notas finales del capítulo..... | 50 |
| Entrecruzamiento del PVOH..... | 51 |
| 5.1 Antecedentes..... | 51 |
| 5.2 Metodología..... | 51 |
| 5.2.1 Entrecruzamiento del PVOH..... | 51 |
| 5.2.2 Caracterizaciones fisicoquímicas | 51 |
| 5.3 Resultados y discusión..... | 52 |
| 5.3.1 Mecanismo de reacción del entrecruzamiento del PVOH con ácido cítrico | 52 |
| 5.3.2 Efecto del entrecruzamiento en la estructura química del PVOH | 54 |
| 5.4 Notas finales del capítulo..... | 55 |
| Entrecruzamiento del PVOH-funcionalizado con glicerol..... | 56 |
| 6.1 Antecedentes..... | 56 |
| 6.2 Metodología..... | 57 |
| 6.2.1 Entrecruzamiento con glicerol..... | 57 |
| 6.2.2 Caracterizaciones fisicoquímicas | 58 |
| 6.3 Resultados y discusión..... | 58 |
| 6.3.1 Mecanismo de reacción del entrecruzamiento con glicerol del PVOH previamente funcionalizado con ácido cítrico | 58 |
| 6.3.2 Efecto del entrecruzamiento con glicerol en la estructura química del PVOH | 60 |
| 6.4 Notas finales del capítulo..... | 61 |

| | |
|---|-----|
| Preparación de membranas..... | 63 |
| 7.1 Antecedentes..... | 63 |
| 7.2 Metodología..... | 63 |
| 7.2.1 Preparación de membrana densa | 63 |
| 7.2.2 Capa superior electrohilada | 64 |
| 7.2.3 Post-tratamiento térmico | 64 |
| 7.2.4 Caracterización biológica | 64 |
| 7.2.5 Caracterización térmica | 68 |
| 7.2.6 Caracterización superficial | 69 |
| 7.2.7 Caracterización de la hidrofiliidad..... | 70 |
| 7.2.8 Desempeño | 71 |
| 7.2.9 SEM: Caracterización de membranas empleadas en la evaluación de eficiencia con celda de Franz..... | 72 |
| 7.3 Resultados y discusión..... | 72 |
| 7.3.1 Preparación de membranas..... | 72 |
| 7.3.2 Citotoxicidad | 73 |
| 7.3.3 Hemólisis..... | 74 |
| 7.3.4 Coagulación..... | 76 |
| 7.3.5 Componente filtrante: Capa electrohilada | 78 |
| 7.3.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 80 |
| 7.3.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 85 |
| 7.3.8 Microscopía de fuerza atómica (AFM) | 89 |
| 7.3.9 Determinación de la porosidad..... | 93 |
| 7.3.10 Ángulo de contacto | 93 |
| 7.3.11 Porcentaje de absorción de agua | 96 |
| 7.3.12 Evaluación de la permeación de las membranas | 98 |
| 7.3.13 SEM: Caracterización de membranas empleadas en la evaluación de eficiencia con celda de Franz..... | 102 |
| 7.4 Notas finales del capítulo..... | 105 |
| Una mirada al futuro..... | 108 |
| Conclusiones generales..... | 109 |
| 9.1 Conclusiones generales..... | 109 |
| 9.2 Notas finales | 111 |
| 9.3 Retos y recomendaciones..... | 111 |
| 9.4 Productos científicos..... | 111 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 9.4.1 | Lista de publicaciones | 111 |
| 9.4.2 | Presentación oral en Congreso Internacional | 112 |
| 10.1 | Referencias | 113 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de toxinas urémicas según su tamaño molecular. Se detallan los grupos funcionales presentes en las toxinas de cada uno de los grupos [27]. | 27 |
| Tabla 2. Polímeros matriz más utilizados en la fabricación de membranas para hemodiálisis, no se consideran modificaciones del polímero. | 31 |
| Tabla 3. Secuencia de filtros aplicados y resultados de la estrategia de revisión correspondiente a la fase de identificación. | 36 |
| Tabla 4. Ocurrencia de palabras claves recuperadas de los 68 artículos seleccionados. | 36 |
| Tabla 5. Resultados del DOE factorial realizado para la cantidad de glicerol. | 57 |
| Tabla 6. Soluciones con glicerol que dieron a la formación de membranas | 61 |
| Tabla 7. Resultados del DOE factorial | 64 |
| Tabla 8. Imágenes 3D de AFM de ambos lados de las membranas de una sola capa, denominadas membranas densas (D). Los valores de la rugosidad cuadrática media (Sq) y la rugosidad promedio (Sa), se presentan debajo de cada imagen para cada lado. El lado A corresponde al lado más brillante, que está en contacto con el ambiente, mientras que el lado B es el lado opaco, que se encuentra en contacto con la placa de vidrio. | 90 |
| Tabla 9. Imágenes 3D de AFM de ambos lados de las membranas de dos capas, denominadas membranas densas y electrohiladas (DEH). Los valores de la rugosidad cuadrática media (Sq) y la rugosidad promedio (Sa), se muestran debajo de cada imagen para cada lado. En cada caso, el lado A corresponde a la capa electrohilada, mientras que el lado B representa la capa fabricada mediante inversión de fase. | 91 |
| Tabla 10. Parámetros de rugosidad reportados para membranas de Polietersulfona (PES) y Polisulfona (PSf). | 92 |
| Tabla 11. Resultados de porosidad para las membranas densas y densas con capa electrohilada. | 93 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Anatomía general del riñón (elaboración propia). | 21 |
| Figura 2. Anatomía general de las nefronas (elaboración propia)..... | 22 |
| Figura 3. Reabsorción de agua y solutos filtrados a través de células tubulares y su retorno a la sangre. Los solutos son transportados por transporte pasivo (difusión) o activo a través de las células. El transporte de los solutos entre las células se realiza mediante difusión. (elaboración propia)..... | 23 |
| Figura 4. Esquema del proceso de hemodiálisis (elaboración propia). | 26 |
| Figura 5. Red basada en las palabras claves de los artículos exportados de Scopus..... | 38 |
| Figura 6. Gráfica de los países que cuentan con patentes en materia de membranas para hemodiálisis obtenida de la base de datos LENS. | 39 |
| Figura 7. Esquema de las caracterizaciones realizadas durante el trabajo de investigación. Las caracterizaciones se agrupan en 5 secciones..... | 42 |
| Figura 8. a) Fórmula estructural del PVOH atáctico, b) así como su modelo molecular visto desde arriba y c) desde un costado. Se puede observar que los hidroxilos están posicionados de forma aleatoria. | 44 |
| Figura 9. a) Fórmula estructural del ácido cítrico, b) así como su modelo molecular. | 45 |
| Figura 10. Mecanismo de reacción de la esterificación entre el PVOH y ácido cítrico para favorecer la funcionalización..... | 47 |
| Figura 11. Espectros FTIR de PVOH, Ácido de cítrico, las soluciones de PVOH y AC en relación molar 1:1 y 1:4..... | 48 |
| Figura 12. Curva de calibración para la proporción de ácido cítrico vs. altura relativa para la señal de 1080 cm^{-1} | 49 |
| Figura 13. Mecanismo de reacción de la esterificación entre el PVOH y ácido cítrico donde se ve favorecido el entrecruzamiento de las cadenas. Los incisos son descritos a detalle en el Capítulo IV. | 53 |
| Figura 14. Espectros FTIR de PVOH, Ácido de cítrico, las soluciones de PVOH y AC en relación molar 1:0.02 y 1:0.08..... | 54 |
| Figura 15. a) Fórmula estructural del glicerol, b) así como su modelo molecular. | 57 |
| Figura 16. Mecanismo de reacción de la esterificación entre el PVOH y ácido cítrico, seguido de su entrecruzamiento con glicerol. Los incisos son descritos a detalle en el Capítulo IV..... | 59 |
| Figura 17. Espectros FTIR de PVOH, Ácido de cítrico, Glicerol, las soluciones de PVOH, AC y Glicerol en relación molar 1:1:1.5 y 1:3:3.5. | 60 |
| Figura 18. Ejecución de la prueba de citotoxicidad. Se procede a colocar medio celular en una placa de 96 pozos..... | 65 |
| Figura 19. Para la medición de las absorbancias se utilizó el fotómetro para microplacas Multiskan FC de la marca Thermo Scientific. La formación de formazán es debido a la reacción de oxidación que experimenta el MTT en la presencia de la reductasa mitocondrial que se encuentra en células metabólicamente vivas. | 66 |

| | |
|--|----|
| Figura 20. Ejecución de la prueba de hemólisis. Los tubos Falcon contienen la solución de eritrocitos en presencia de los materiales a evaluar..... | 67 |
| Figura 21. Ejecución de la prueba de coagulación. Tubos Falcón con las muestras de plasma rico en plaquetas (PRP) (tubo izquierdo) y plasma pobre en plaquetas (PPP) (tubo derecho). | 68 |
| Figura 22. Esquema de la celda de Franz (elaboración propia)..... | 71 |
| Figura 23. Fotografía de membranas densas del DOE mostrado en la Tabla 5. | 72 |
| Figura 24. La formación de formazán se debe a la reacción de oxidación que experimenta el MTT en presencia de la reductasa mitocondrial, presente en células metabólicamente activas (elaboración propia)..... | 73 |
| Figura 25. Absorbancias promedio con su desviación Estándar (SD, por sus siglas en inglés) (n=2). Significancia estadística: *P < 0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001. | 73 |
| Figura 26. Los datos son expresados como Promedio ± Desviación Estándar (SD) (n=2). Significancia estadística: *P < 0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001. a) Se muestra el porcentaje de hemólisis para todas las muestras; b) se hace un zoom a la gráfica para destacar aquellas que están por debajo del 5% de hemólisis de acuerdo con lo descrito por la norma ASTM F756-17. | 75 |
| Figura 27. Esquema donde la imagen de la izquierda ejemplifica la falta de transmisión de la luz a través de plasma sin agregación plaquetaria (turbio) y la imagen de la derecha, el caso donde se induce la agregación plaquetaria de grandes conglomerados, esto permite el paso de la luz y se considera como una disminución en la turbidez (elaboración propia). | 76 |
| Figura 28. a) Turbidez medida de la agregación plaquetaria de PRP y PPP cuando se exponen las membranas durante 30 minutos sin la presencia de agonista, b) Turbidez medida de la agregación plaquetaria de PRP y PPP cuando se exponen las membranas durante 30 minutos con colágena como agonista. | 78 |
| Figura 29. a) Membranas densas con capa de PA0.02 electrohilada; b) esquema ilustrativo del acomodo de las capas..... | 79 |
| Figura 30. a) Termograma del PVOH, donde se esquematiza lo que sucede con las cadenas poliméricas en cada una de las transiciones térmicas; b) Termograma del ácido cítrico monohidratado; c) Termograma del glicerol..... | 82 |
| Figura 31. Termogramas de las membranas densas PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5. Se esquematiza la disposición del polímero conforme se incrementa la cantidad de ácido cítrico, donde las líneas moradas corresponden a la cadena de PVOH y las líneas azules representan el entrecruzamiento de las mismas. Se puede notar la desaparición de la fracción cristalina conforme aumenta la cantidad de ácido cítrico. | 83 |
| Figura 32. Modificación de la Tg y la Tm con respecto al aumento del ácido cítrico en las membranas densas fabricadas..... | 84 |
| Figura 33. Termogramas de las membranas con una capa densa y otra electrohilada. Se presenta el esquema de la matriz polimérica entrecruzada, donde las líneas moradas corresponden a la cadena de PVOH y las líneas azules representan el entrecruzamiento de las mismas. Las esferas naranjas representan las moléculas de glicerol, que pueden funcionar | |

| | |
|--|-----|
| como plastificante al acomodarse entre las cadenas y favorecer la formación de espacio libre. | 85 |
| Figura 34. Imágenes de SEM de las diferentes muestras, obtenidas por electrones secundarios y una magnificación de 20 000x. Los histogramas corresponden a las mediciones realizadas en dichas imágenes de SEM. | 86 |
| Figura 35. Imágenes de SEM, obtenidas por electrones secundarios, con una magnificación de 20 000x. Los histogramas corresponden a las mediciones realizadas en dichas imágenes de SEM. | 88 |
| Figura 36. Imágenes de SEM, obtenidas por electrones secundarios, con una magnificación de 600x. Los histogramas corresponden a las mediciones realizadas en dichas imágenes de SEM. | 89 |
| Figura 37. Esquema de una superficie con carácter hidrofílico o hidrofóbico (elaboración propia)..... | 94 |
| Figura 38. Fotografías de ángulo de contacto para las muestras: a) PA0.02D, b) PA0.02DEH, c) PA0.08D, d) PA0.08DEH, e) PA1G2.5D, f) PA1G2.5DEH. | 95 |
| Figura 39. Ángulo de contacto de las diferentes membranas de PVOH. Las barras presentan su respectiva desviación estándar para un n=10. | 95 |
| Figura 40. Esquema del hinchamiento de la matriz polimérica de PVOH entrecruzada (elaboración propia)..... | 96 |
| Figura 41. Gráficas de porcentaje de absorción de agua para a) las membranas densas, b) las membranas densas con una capa de electrohilado..... | 98 |
| Figura 42. Gráfica de la concentración de ácido úrico registrado en plazos de tiempo de 15 minutos. | 100 |
| Figura 43. Gráfica de la concentración de creatinina registrado en plazos de tiempo de 15 minutos | 101 |
| Figura 44. Gráfica de la concentración de urea registrado en plazos de tiempo de 15 minutos | 102 |
| Figura 45. Las imágenes obtenidas mediante SEM incluyen vistas generales capturadas con electrones secundarios. En cuanto a las imágenes con una ampliación de 10 000x, éstas fueron generadas por electrones retrodispersados para resaltar la presencia de composiciones diferentes a la matriz polimérica. | 103 |
| Figura 46. Imagen de la membrana PA0.02 obtenida por SEM mediante electrones retrodispersados con una magnificación de 10 000x en donde se señala la zona en donde se realizó el análisis EDS con los respectivos porcentajes atómicos..... | 104 |
| Figura 47. Imagen de la membrana PA1G2.5 obtenida por SEM mediante electrones retrodispersados con una magnificación de 10 000x en donde se señala la zona en donde se realizó el análisis EDS con los respectivos porcentajes atómicos..... | 105 |

Resumen

Estudio de membranas poliméricas para su potencial aplicación en hemodiálisis.

Palabras clave: éster, entrecruzamiento, PVOH, ácido cítrico, glicerol.

Durante el siglo XXI, una de las mayores problemáticas de salud pública en todo el mundo es el incremento de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) caracterizada por presentar fallo renal. En 2019 se estimaba que aproximadamente 850 millones de personas alrededor del mundo padecían de alguna enfermedad del riñón, y para la cual se requerían terapias de remplazo renal como la diálisis o el trasplante. En México, la enfermedad renal crónica (ERC) representa una preocupación alarmante ya que figura entre las diez principales causas de mortalidad en personas mayores de 25 años según el INEGI (2022), con 14,306 fallecimientos registrados ese año. Los pacientes que sufren de fallo renal tienen como opciones la diálisis o el trasplante de riñón, aunque esta última es menos probable debido a la disponibilidad de donadores. Por tal motivo, la diálisis es el tratamiento mayormente utilizado y ésta puede ser vía peritoneal (diálisis peritoneal) o sanguínea (hemodiálisis). La hemodiálisis es considerada un tratamiento altamente efectivo y a diferencia de la diálisis peritoneal, utiliza membranas poliméricas semipermeables en un sistema extracorporal para filtrar la sangre del paciente. Las membranas para la hemodiálisis son las responsables de remover las toxinas urémicas de la sangre entre otras sustancias de desecho por ello son un componente clave en las terapias de tratamiento renal [9]. En este trabajo se estudió la posibilidad de desarrollar una membrana biocompatible y hemocompatible, diseñada específicamente para su implementación en hemodiálisis. Para tal fin, se utilizó poli(alcohol vinílico) (PVOH) como material base, debido a su capacidad para ofrecer tanto inocuidad como resistencia mecánica. El PVOH fue funcionalizado con ácido cítrico (AC), que actúa como agente anticoagulante, y entrecruzado con glicerol para mejorar sus propiedades mecánicas; alternativamente, se empleó únicamente ácido cítrico como agente entrecruzante. Los resultados obtenidos mostraron que las formulaciones con una baja relación molar de ácido cítrico presentan una mayor citocompatibilidad, buena hemocompatibilidad y baja agregación plaquetaria. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas del material, se observó que la cantidad de ácido cítrico influye en las propiedades térmicas, como consecuencia del entrecruzamiento con los grupos $-OH$ del PVOH. Las membranas fabricadas son de naturaleza hidrofílica, lo cual resulta favorable para su aplicación en hemodiálisis. Asimismo, presentaron características particulares en términos de porosidad y capacidad de hinchamiento en agua, que las posicionan como candidatas adecuadas para su uso en este tipo de procedimientos.

Abstract

Study of Polymeric Membranes for their Potential Application in Hemodialysis.

Keywords: ester, crosslinking, PVOH, citric acid, glycerol.

During the 21st century, one of the most significant public health issues worldwide has been the increasing number of patients with chronic kidney disease (CKD), which is characterized by renal failure. In 2019, it was estimated that approximately 850 million people around the world were affected by some form of kidney disease, requiring renal replacement therapies such as dialysis or transplantation. In Mexico, CKD represents a major concern, ranking among the top ten causes of death in individuals over the age of 25, according to INEGI (2022), with 14,306 deaths recorded that year. Patients suffering from kidney failure have two main treatment options: dialysis or kidney transplantation. However, transplantation is less common due to the limited availability of donors. As a result, dialysis is the most used treatment and can be administered either through the peritoneum (peritoneal dialysis) or the bloodstream (hemodialysis). Hemodialysis is considered a highly effective treatment and, unlike peritoneal dialysis, uses semipermeable polymeric membranes in an extracorporeal system to filter the patient's blood. Hemodialysis membranes are responsible for removing uremic toxins and other waste substances from the blood, making them a key component in renal treatment therapies. In this study, the potential development of a biocompatible and hemocompatible membrane specifically designed for hemodialysis. For this purpose, poly(vinyl alcohol) (PVOH) was used as the base material due to its safety and mechanical strength. PVOH was functionalized with citric acid (CA), which acts as an anticoagulant agent, and crosslinked with glycerol to enhance its mechanical properties; alternatively, citric acid was used as the crosslinking agent. The results showed that formulations with a low molar ratio of citric acid exhibited higher cytocompatibility, good hemocompatibility, and low platelet aggregation. Regarding the physicochemical properties of the material, it was observed that the amount of citric acid influences the thermal properties due to the crosslinking with the –OH groups of PVOH. The fabricated membranes were hydrophilic in nature, which is favorable for hemodialysis applications. They also exhibited specific characteristics in terms of porosity and water swelling capacity, positioning them as suitable candidates for use in this type of procedure.

CAPÍTULO I

Introducción

“The scientist is not a person who gives the right answers, he's one who asks the right questions.”

-Claude Lévi-Strauss

Durante el siglo XXI, una de las mayores problemáticas de salud pública en todo el mundo es el incremento de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) caracterizada por presentar fallo renal [1], [2]. En 2019 se estimaba que aproximadamente 850 millones de personas alrededor del mundo padecían de alguna enfermedad del riñón, y para la cual se requerían terapias de remplazo renal como la diálisis o el trasplante [3]. De acuerdo con el estudio de la carga mundial de enfermedades realizado por Foreman y colaboradores (2016), la ERC se encontraba en el 16° lugar en la lista de causas de muerte a escala mundial y, desafortunadamente, para el año 2040 se prevé que se encuentre en el 5° lugar [4]. La insuficiencia renal crónica es considerada una enfermedad emergente debido al aumento de casos, los altos costos asociados, la escasa atención médica, la elevada mortalidad y los recursos limitados disponibles [5]. En México, la enfermedad renal crónica (ERC) representa una preocupación alarmante ya que figura entre las diez principales causas de mortalidad en personas mayores de 25 años según el INEGI (2022), con 14,306 fallecimientos registrados ese año [6]. También se considera una de las principales causas de hospitalización ya que tan solo en el 2022 el número de pacientes atendidos en el IMSS por insuficiencia renal crónica fue de 79 mil, lo cual resultó en un gasto de 21,370 millones de pesos [7]. En el contexto de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), la ERC se relaciona estrechamente con el tercer objetivo: "Salud y Bienestar", el cual enfatiza la importancia de tomar medidas inmediatas y decisivas para prevenir y enfrentar desafíos en materia de salud, ya que personas saludables son fundamentales para economías con mayor desarrollo [8].

Como se mencionó, los pacientes que sufren de fallo renal tienen como opciones la diálisis o el trasplante de riñón, aunque esta última es menos probable debido a la disponibilidad de donadores [1]. Por tal motivo, la diálisis es el tratamiento mayormente utilizado y ésta puede ser vía peritoneal (diálisis peritoneal) o sanguínea (hemodiálisis). La hemodiálisis es considerada un tratamiento altamente efectivo y a diferencia de la diálisis peritoneal, utiliza membranas poliméricas semipermeables en un sistema extracorporal para filtrar la sangre del paciente [1]. Las membranas para la hemodiálisis son las responsables de remover las toxinas urémicas de la sangre entre otras sustancias de desecho por ello son un componente clave en las terapias de tratamiento renal [9].

Las primeras membranas para hemodiálisis tenían como elemento esencial la celulosa modificada, aunque con el fin de potenciar su biocompatibilidad y hemocompatibilidad se ha optado por utilizar membranas de polímeros sintéticos [9], [10]. Esencialmente, se busca que el polímero, o polímeros, contengan grupos funcionales con naturaleza hidrofílica y de carga negativa de modo que sean capaces de repeler las proteínas de la sangre [11], [12]. Algunos de los grupos funcionales que cumplen con estas características son el sulfónico (-SO₃H), el carboxílico (-COOH), el amino (-NH₂) y el hidroxilo (-OH) [13]. No obstante, se ha reportado ampliamente el uso de polisulfonas (PSU) y polietersulfonas (PES) en la fabricación de membranas para hemodiálisis, ya que presentan buenas propiedades mecánicas y térmicas, aunque su mayor desventaja es su naturaleza hidrofóbica que provoca una disminución de la hemocompatibilidad [13]. En este trabajo, se estudió la posibilidad de desarrollar una membrana biocompatible y hemocompatible diseñada específicamente para su implementación en hemodiálisis. Para tal fin, se utilizó poli(alcohol vinílico) (PVOH) como material base debido a su capacidad para ofrecer tanto inocuidad como resistencia mecánica. Además, el PVOH se funcionalizó con ácido cítrico (AC), que actúa como agente anticoagulante, y se entrecruzó con glicerol para mejorar sus propiedades mecánicas.

Preguntas de investigación

Las preguntas de investigación que son de interés para este trabajo de tesis son las siguientes.

1. ¿Qué polímeros, diferentes a las polisulfonas (PSU) y polietersulfonas (PES), presentan características prometedoras para la fabricación de membranas de hemodiálisis?
2. ¿Cómo influyen los grupos funcionales y el tamaño de poro en la eficiencia de las membranas de hemodiálisis?
3. ¿Qué métodos de fabricación de membranas permiten obtener membranas con un tamaño de poro adecuado?

Objetivo general

Desarrollar membranas biocompatibles y hemocompatibles con capacidad de separar selectivamente toxinas urémicas y proteínas, utilizando el poli(alcohol vinílico) (PVOH) como polímero base funcionalizado con ácido cítrico (AC) y entrecruzado con glicerol, o bien únicamente entrecruzado con ácido cítrico.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos que se plantean en la presente investigación son los siguientes.

1. Determinar las proporciones de PVOH:AC que permitan obtener una membrana con las mejores características fisicoquímicas.
2. Evaluar el efecto del contenido de glicerol en el entrecruzamiento de la solución de PVOH funcionalizado.
3. Preparar membranas con las soluciones fabricadas mediante las técnicas de inversión de fase y electrohilado.
4. Determinar la citotoxicidad, hemocompatibilidad, porosidad, tamaño de poro, hidrofiliicidad, carga superficial y morfología.
5. Evaluar el desempeño de las membranas mediante pruebas de flujo.

Hipótesis

La funcionalización del PVOH es posible mediante la adición de ácido cítrico en relación molar de al menos 2, lo cual promoverá la formación de enlaces éster, sin ir en detrimento del entrecruzamiento con glicerol. Esto dará lugar a la creación de una membrana que sea biocompatible para su uso en hemodiálisis.

Marco Teórico

“If you’re going to change the world, you’ve got to be fearless.”

-Frances Arnold

2.1 Generalidades del riñón

Los riñones son órganos en forma de alubia con un peso entre 150 a 200 g en hombres y de 120 a 135 g en mujeres [14]. Se localizan en el retroperitoneo, que corresponde a la cavidad abdominal posterior al peritoneo, entre la última vertebra torácica y la tercera vertebra lumbar donde se protegen de forma parcial por las costillas [14][15]. Los riñones son los que realizan las principales actividades en el aparato urinario pues regulan la composición iónica, el pH, la cantidad de agua y la tensión arterial en la sangre. También producen hormonas y contribuyen a la excreción de desechos y sustancias extrañas [15][16]. En los apartados siguientes se hace la descripción anatómica y fisiológica de los riñones.

2.1.1 Anatomía del riñón

De forma externa, el riñón se encuentra cubierto por tres capas de tejido. La más profunda se denomina cápsula renal cuya función es ser una defensa contra traumatismos y mantener la forma del riñón. La siguiente capa es la cápsula adiposa que permite que el riñón se sostenga firmemente. Finalmente, la capa más superficial corresponde a la llamada fascia renal que permite mantener unido el riñón a la pared abdominal y a los órganos en los alrededores [15].

En cuanto a la anatomía interna del riñón se pueden distinguir dos regiones. La más superficial corresponde a la corteza renal cuya textura es lisa. La región dentro de la corteza renal corresponde a la médula renal que contiene entre 8 y 18 pirámides renales. Tanto la corteza renal en conjunto con las pirámides renales se le denomina parénquima, lugar donde se ubican las nefronas. Las nefronas pueden definirse como unidades microscópicas que realizan el filtrado de la sangre. Este filtrado es drenado mediante los conductos papilares que desembocan en una estructura en forma de copa denominada cáliz menor para posteriormente llega al cáliz mayor. El filtrado una vez que se encuentra en los cálices se considera orina porque ya no se experimenta mayor reabsorción [15]. A continuación, en la Figura 1, se muestra gráficamente lo descrito.

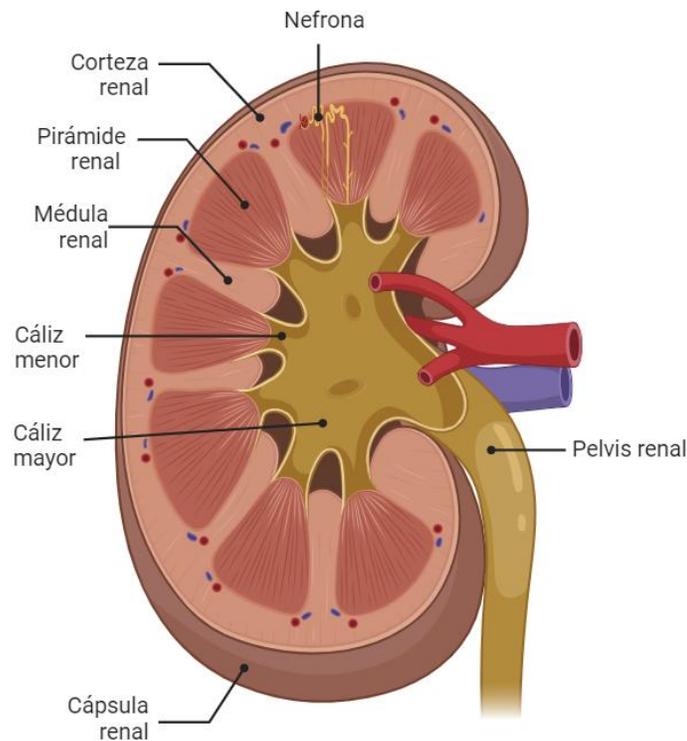


Figura 1. Anatomía general del riñón (elaboración propia).

2.1.1.1 La nefrona

Como se mencionó, las nefronas corresponden a las unidades funcionales del riñón estimándose cerca de 800,000 a 1 millón por cada riñón [15], [16]. Anatómicamente, la nefrona se puede dividir en el corpúsculo y túbulos renales [15].

El corpúsculo renal tiene como tarea la filtración del plasma sanguíneo y sus componentes son el glomérulo, que básicamente es una red de capilares que tienen una alta presión hidrostática con respecto a otros procesos corporales (≈ 60 mmHg) y la cápsula glomerular de Bowman que es el conjunto de células epiteliales que cubren el glomérulo [15], [16]. Una vez que se filtra el plasma sanguíneo, se genera un filtrado que ingresa en el túbulo renal, primero por el túbulo contorneado proximal, seguido del asa de Henle, y concluyendo en el túbulo contorneado distal. Los túbulos contorneados distales de otras nefronas convergen en un túbulo colector que finalmente desembocan en la pelvis renal mediante las puntas de las papilas renales [15], [16]. Se estima que hay cerca de 250 tubos colectores por cada riñón [16]. En la Figura 2 se ilustran las partes de la nefrona.

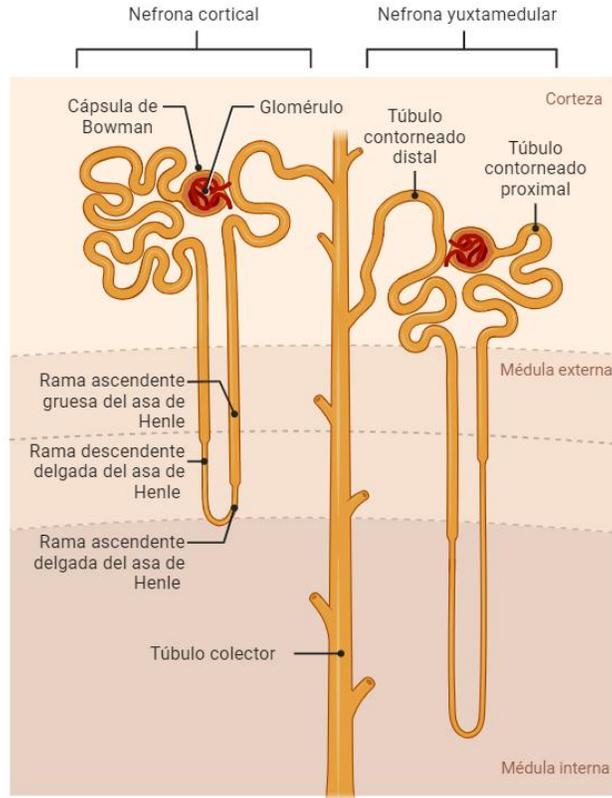


Figura 2. Anatomía general de las nefronas (elaboración propia).

2.1.2 Fisiología del riñón

Como se mencionó previamente, son los riñones los que realizan las actividades que permiten mantener estable el ambiente interno del cuerpo, es decir, tienen funciones homeostáticas [16]. Los procesos llevados a cabo por el riñón se pueden dividir en filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular.

2.1.2.1 Filtración glomerular

La filtración glomerular se considera como el primer paso para la producción de orina. Este paso consiste en la filtración de casi 180 L al día a través de los capilares glomerulares que se encuentran dentro de la cápsula de Bowman [16].

Los capilares glomerulares filtran la sangre, obteniéndose un fluido libre de proteínas y desprovisto de células sanguíneas, llamado filtrado glomerular. Este filtrado contiene componentes y concentraciones similares al plasma sanguíneo [16].

La membrana capilar glomerular está compuesta de tres capas, la primera es el endotelio capilar, seguido de una membrana basal y, por último, una capa de células epiteliales alrededor de la superficie exterior de la membrana basal y las cuales se denominan particularmente como podocitos. La membrana glomerular tiene una alta tasa de filtración

gracias a la presencia de perforaciones denominadas fenestraciones (diámetro molecular cerca de 8 nm) en el endotelio capilar, y de proteínas cargadas negativamente que impiden el paso de las proteínas plasmáticas. Lo anterior implica que la membrana es selectiva con base en el tamaño y la carga eléctrica de las moléculas. La membrana basal cuenta con una malla de fibras de colágeno y proteoglicanos lo cual aporta una fuerte carga eléctrica negativa ayudando también al impedimento de la filtración de proteínas plasmáticas. Respecto a la capa de podocitos que presentan prolongaciones designadas como pedicelos cuyas separaciones llamadas poros de hendiduras, y que, al igual que las demás capas, tiene carga negativa [16].

2.1.2.2 Reabsorción y secreción tubular

La reabsorción tubular juega un papel importante en la determinación de la tasa de excreción urinaria final, mientras que, la secreción tubular da paso a la aparición de cantidades significativas de iones potasio, hidrógeno y de otras sustancias que aparecen en la orina [16].

La reabsorción tubular es altamente selectiva. La glucosa y aminoácidos son completamente reabsorbidos por los túbulos, en cambio, la reabsorción de los iones depende básicamente de las necesidades del cuerpo[16].

En la Figura 3 se representa cómo las sustancias que se pretenden reabsorber son transportadas a través del epitelio tubular en donde el transporte puede ser activo o pasivo para luego regresar a la sangre mediante la membrana capilar tubular por ultrafiltración donde dominan fuerzas hidrostáticas y coloidosmóticas [16].

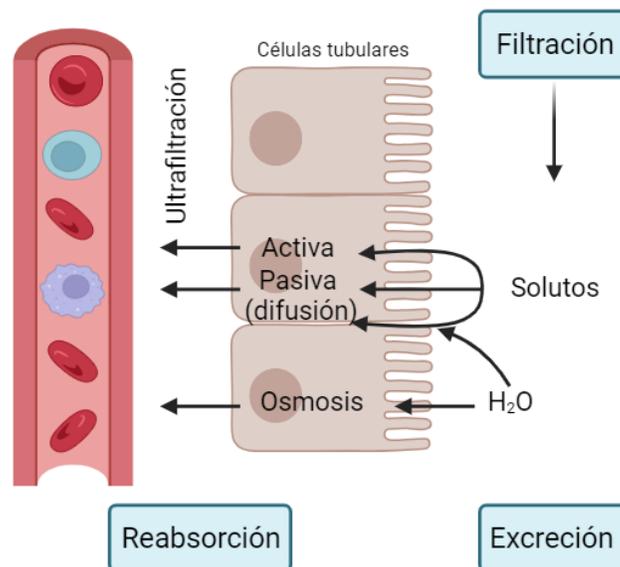


Figura 3. Reabsorción de agua y solutos filtrados a través de células tubulares y su retorno a la sangre. Los solutos son transportados por transporte pasivo (difusión) o activo a través de las células. El transporte de los solutos entre las células se realiza mediante difusión. (elaboración propia).

2.1.3 Enfermedades del riñón

El funcionamiento de los riñones puede verse comprometido por desbalances homeostáticos, lo que puede dar lugar a varios trastornos. Uno de los problemas más comunes es la formación de cálculos renales, que son sales presentes en la orina que precipitan y solidifican formando piedras insolubles. Estas piedras suelen estar compuestas de cristales de oxalato de calcio, ácido úrico o fosfato de calcio. La ingesta excesiva de calcio, la baja ingesta de agua, la hiperactividad de las glándulas paratiroides y la acidez o alcalinidad de la orina pueden ser algunas de las causas subyacentes [15].

Los glomérulos renales también pueden verse dañados, donde de manera general, la membrana de filtración aumenta su permeabilidad. La glomerulonefritis es un ejemplo de esta afección, caracterizada por la inflamación de los glomérulos. Generalmente es provocada por la reacción alérgica a las toxinas producidas por las bacterias estreptocócicas causando que los glomérulos se inflamen y permitan el paso de células sanguíneas y proteínas plasmáticas [15].

El síndrome nefrótico es una condición caracterizada por la presencia de proteínas, altos niveles de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos en la orina. Esta enfermedad puede estar asociada con diversas condiciones, como la diabetes mellitus, el lupus eritematoso sistémico, algunos cánceres y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida [15].

Otro padecimiento de los riñones es lo que se conoce como fallo renal y sucede cuando hay una disminución de la filtración glomerular. Cuando los riñones dejan de funcionar se le conoce como fallo renal agudo lo cual se caracteriza por la oliguria (la cantidad desecheda de orina es entre 50 mL y 250 mL), o bien, por la anuria (la cantidad desecheda de orina es de menos de 50 mL). Cuando hay una disminución gradual del funcionamiento en la tasa de filtración se le conoce como fallo renal crónico que puede ser resultado de glomeronefritis crónica, pielonefritis, enfermedad del riñón poliquístico o pérdida traumática del tejido renal [15].

2.2 Terapias de reemplazo renal

Los pacientes que presentan fallo renal con pérdida del 90% de las nefronas comienzan a presentar oliguria y un incremento en la cantidad de sustancias de desecho en la sangre. Es en estos casos donde se requieren terapias de diálisis y se vuelven candidatos para un trasplante de riñón [15], [17].

Como definición, diálisis es el transporte de moléculas en solución, por difusión, a través de una membrana semipermeable [18], [19]. Los elementos esenciales del proceso es un solvente que contiene solutos y una membrana porosa a través de la cual algunos o todos los solutos se mueven por difusión [19]. Las técnicas de purificación de sangre que usan membranas artificiales son la hemodiálisis cuyo mecanismo de transporte de solutos es principalmente la difusión, la hemofiltración cuyo transporte predominante es la convección y la hemoadsorción donde la adsorción es el principal mecanismo de separación [20], [21].

2.2.1 Diálisis peritoneal

La diálisis peritoneal consiste en el uso de la barrera peritoneal y de un líquido de diálisis dentro de la cavidad peritoneal. La barrera peritoneal varía entre pacientes lo cual afecta la eficiencia de la diálisis [19].

La diálisis peritoneal ofrece diversas ventajas, tales como requerir una infraestructura mínima, ser más rentable, ser adecuada para pacientes con dificultad para acceder a sus vasos sanguíneos, causar pérdida mínima de sangre, ser biocompatible y ser beneficioso para ciertos grupos de pacientes, como niños, aquellos con cirrosis o tendencia a hemorragias. Sin embargo, también conlleva algunos problemas, que van desde el alto riesgo de infección (peritonitis) hasta la pérdida de proteínas, hiperglucemia e hipernatremia [22].

La existencia de otras terapias de mayor tecnología como la hemofiltración y la hemodiálisis ha provocado que el uso y las investigaciones en diálisis peritoneal disminuyan. Por lo regular, la diálisis peritoneal es predominantemente practicada en países en desarrollo [22].

2.2.2 Hemodiálisis

La hemodiálisis consiste en una técnica de diálisis extracorporal, donde básicamente se limpia la sangre de toxinas urémicas, se elimina el exceso de agua y se equilibra los electrolitos [19], [23], [24]. Dentro de los pioneros que establecieron los fundamentos de esta técnica, fue el profesor de química escocés Graham, quien inventó el proceso de separación de solutos usando membranas semipermeables y acuñó el término “diálisis” [19]. Más tarde, en 1913 John Jacob Abel, en los Estados Unidos, fue el primero en aplicar el proceso de diálisis a organismos vivos y utilizó el término “riñón artificial” [18], [19]. En 1924, Georg Haas en Alemania fue el primero en usar el “riñón artificial” en un humano cuyo intento no fue del todo un éxito dada la toxicidad del anticoagulante crudo que limitó la fluidez en el circuito [19]. Posteriormente, en 1945 Willem Kolff utilizó con éxito la diálisis como tratamiento para salvar la vida de pacientes con falla renal utilizando su invento de riñón artificial de tambor rotatorio de Kolff [19], [25]. Este invento fue posible debido a avances como la invención del celofán, el descubrimiento de antibióticos y la disponibilidad de la heparina como anticoagulante. Kolff es llamado frecuentemente como el “padre de la hemodiálisis” debido a que su método fue aceptado como estándar para remplazo temporal en pacientes con falla renal aguda de corta duración [19]. En 1960, Belding Scribner desarrolló un dispositivo para realizar diálisis de forma reiterativa que accedía a la sangre usando tubos de plástico insertados en la arteria y vena [18], [19].

Actualmente, el tratamiento de hemodiálisis se lleva a cabo conectando al paciente en una máquina de diálisis y la sangre es bombeada a través de un acceso vascular y filtrada usando un dializador, el cual es llamado “riñón artificial” (Ver Figura 4). La sangre filtrada es bombeada de regreso dentro del cuerpo del paciente [18]. El equipo de hemodiálisis se divide en dos circuitos principales: el circuito sanguíneo y el circuito de solución de diálisis, también conocido como dializador. El dializador consta esencialmente de una caja o un tubo provisto

de cuatro puertos, dos de los cuales se conectan al compartimiento sanguíneo y los otros dos al compartimiento de la solución de diálisis. En el circuito de diálisis, la sangre se dirige desde el acceso vascular hasta el dializador mediante una bomba. Por otro lado, el circuito de solución dializadora engloba el sistema de suministro de dializado, por medio del cual este líquido se bombea hacia el compartimiento del dializador. Una vez dentro, la membrana semipermeable separa el dializado de la sangre, llevando a cabo así el proceso de filtración y purificación de la sangre [26].

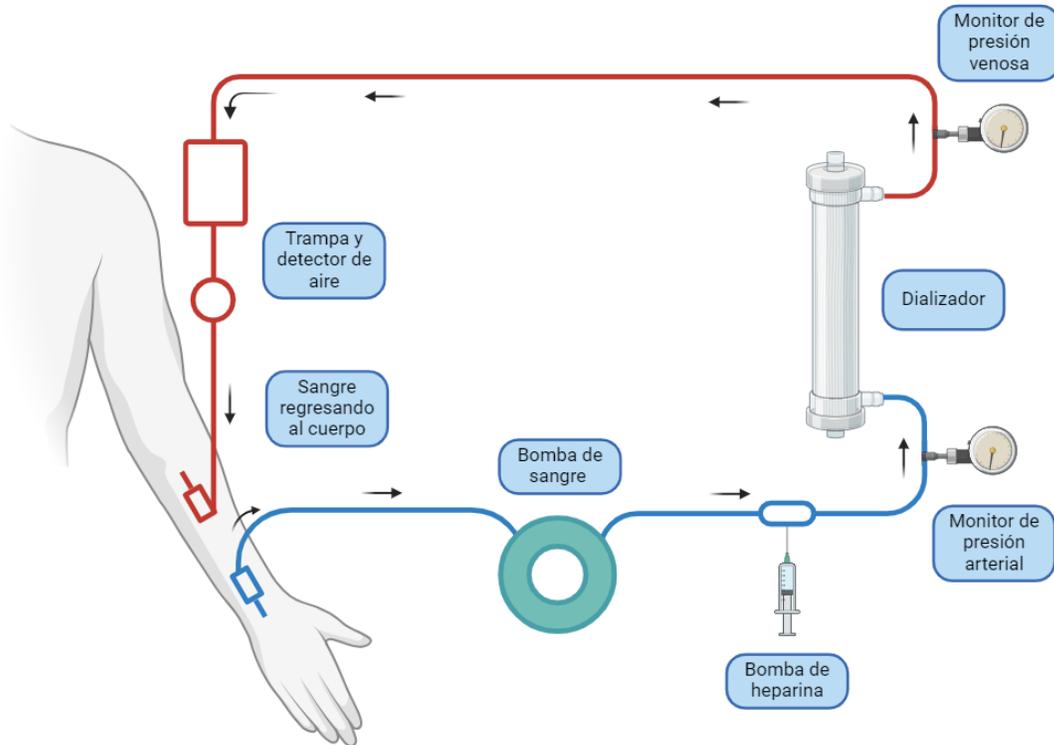


Figura 4. Esquema del proceso de hemodiálisis (elaboración propia).

Las condiciones operativas del equipo de hemodiálisis son críticas para garantizar su correcto funcionamiento. El flujo de sangre de la bomba es bastante rápido, ya que oscila entre 200-600 mL/min. Durante el tratamiento de hemodiálisis, los pacientes están expuestos a una cantidad considerable de agua, que va desde los 120 hasta los 200 litros. Además, la solución de diálisis debe ser liberada a una temperatura precisa, generalmente entre 35 y 38°C. Una temperatura demasiado baja (inferior a 35°C) no representa un riesgo significativo para el paciente, pero una temperatura superior a 42°C podría ocasionar la desnaturalización de las proteínas sanguíneas y, en última instancia, la hemólisis [26].

2.3 Toxinas urémicas

En el contexto de la insuficiencia renal, el síndrome urémico se debe a la acumulación progresiva de compuestos que en condiciones normales son excretados cuando la sangre es filtrada por riñones sanos [27]. Estos compuestos, denominados como toxinas urémicas interactúan de manera negativa con las funciones biológicas y se acumulan en el torrente sanguíneo debido a una eliminación inadecuada [27], [28]. La incapacidad de los riñones para filtrar adecuadamente estos compuestos conduce al deterioro de la salud del paciente. Las toxinas urémicas incluyen una variedad de compuestos químicos que se pueden clasificar según su tamaño molecular. En ese sentido, las toxinas urémicas pueden ser divididas en tres categorías. La primera y segunda categoría tiene que ver con pequeños solutos (<500 D) donde la primera engloba a las moléculas que se sabe que no tienen unión con proteínas mientras que la segunda engloba a las moléculas que si se unen a proteínas. La tercera categoría comprende a moléculas de tamaño medio (≥ 500 D) [27]. En la Tabla 1 se presentan las categorías con los tipos de moléculas que se encuentran en ellas. Dado que este trabajo se centra en conocer los grupos funcionales se coloca una columna con esta información.

Tabla 1. Clasificación de toxinas urémicas según su tamaño molecular. Se detallan los grupos funcionales presentes en las toxinas de cada uno de los grupos [27].

| Categoría | Grupos | Grupos funcionales | |
|--|---|---------------------------------|--|
| Solutos de bajo peso molecular (< 500 D) | Ribonucleósidos Guanidinas Polioles Péptidos Purinas Pirimidinas | | Benzilalcohol |
| | | | Ácido β -guanidinopropiónico |
| | | | β -Lipotropina |
| | | | Creatinina |
| | | | Hidroxilo (-OH) |
| | | | Metilo (-CH ₃) |
| | | | Aminas (>NH, -NH ₂) |
| | | | Imina (>C=N-R) |
| | | | Éter (R ₁ -O-R ₂) |
| | | | Ácido carboxílico (-COOH) |
| | | | Amida (-CONH) |
| | | | Imida (R ₁ -CO-NH-CO-R ₂) |
| | | | |
| | | Guanidina | |
| | | Ácido guanidinoacético | |
| | | Ácido guanidinosuccínico | |
| | | Hipoxantina | |
| | | Malondialdehído | |
| | | Metilguanidina | |
| | | Mioinositol | |
| | | Manitol | |
| | | Oxalato | |
| | | Uracilo | |
| | | Timina | |
| | | Urea | |
| | | Ácido úrico | |
| Solutos unidos a proteínas (< 500 D) | Fenoles Productos finales de glicación avanzada (AGE) | Aromáticos | 3-deoxiglucosona |
| | | Hidroxilo (-OH) | Fructoselisina |
| | | Aminas (>NH, -NH ₂) | Glioxal |
| | | Ácido carboxílico (-COOH) | Ácido hipúrico |
| | | | Homocisteína |
| | | | Hidroquinona |

| | | | |
|--|---|---|---|
| | por sus siglas en inglés) Hipuratos Indoles Poliamidas | Indol (Anillo aromático fusionado con pirrol) Alifáticos | Ácido indol-3-acético Indoxil sulfato Quinurenina Ácido quinurénico Metilglioxal N-carboximetilisina P-cresol Pentosidina Fenol P-OH Ácido hipúrico Ácido quinolínico Espermidina Espermina |
| Solutos de medio peso molecular (≥ 500 D) | Péptidos Citocinas | Amida (-CONH) Aminas (>NH, -NH ₂) Ácido carboxílico (-COOH) | Adrenomedulina β_2 -Microglobulina β -Endorfina Colecistocinina Complemento factor D Cistatina C Ácido hialurónico Hormona paratiroidea |

Así, en el contexto de esta investigación, los esfuerzos se enfocarán en la evaluación de las membranas en condiciones de permeado abierto para determinar cuáles toxinas urémicas son mejor eliminadas.

2.4 Mecanismos de transporte

El proceso de diálisis implica el movimiento de moléculas en ambas direcciones a través de una membrana semipermeable. La eliminación de solutos se realiza mediante tres mecanismos de transporte transmembrana: difusión, convección y adsorción. La contribución relativa de estos mecanismos a la eliminación de un soluto define la modalidad de reemplazo renal. Cuando la difusión es el mecanismo predominante entonces el método recibe el nombre de “hemodiálisis”; si es la convección la predominante, se llama “hemofiltración”; y si tanto la difusión como la convección ocurren simultáneamente, se conoce como “hemodifiltración” [20].

2.4.1 Difusión

El movimiento de solutos por difusión ocurre cuando las moléculas se desplazan del lado con mayor concentración de soluto hacia el lado de menor concentración (gradiente de concentración). El proceso de movimiento de soluto debido a un gradiente de concentración recibe el nombre de diálisis, cuando se coloca una membrana entre las dos soluciones. La velocidad y eficiencia del transporte difusivo dependen de la carga eléctrica, la forma, tamaño y la propiedad hidrofílica de la molécula. A continuación, se describen estos factores [20]:

- a) *El gradiente de concentración entre las soluciones.* Los gradientes de concentración permiten que el dializado elimine los desechos y equilibre los electrolitos de la sangre.
- b) *Permeabilidad de la membrana al soluto.* La membrana con mayor cantidad de poros permite una difusión más rápida. Poros grandes permiten que pasen moléculas más grandes, mientras que las membranas delgadas aumentan la tasa de difusión de los solutos.
- c) *Área superficial de la membrana.* Áreas superficiales grandes permiten mayor difusión.
- d) *Peso molecular de los solutos.* Se trata de una cuestión de transferencia de masa, los solutos más pesados y grandes se mueven lentamente a lo largo del gradiente de concentración respecto a los solutos pequeños. La efectividad de la diálisis se ve afectada en solutos de peso molecular mayor a 1000 Da.
- e) *Proteínas sanguíneas.* La unión de solutos a proteínas ocasiona que se vuelvan impermeables a la membrana.

2.4.2 Convección

La remoción de solutos mediante convección se produce como resultado del flujo de agua (efecto de arrastre por solvente) que atraviesa la membrana debido a un gradiente de presión hidrostática (presión transmembrana) aplicado a través de la membrana [20]. Se ha descrito que el transporte por convección depende del tamaño y cantidad de poros en la membrana. Entonces, se puede decir que la eficiencia con la que el soluto es arrastrado está determinada por su tamaño molecular con relación al tamaño de los poros [20].

2.4.3 Adsorción

La adsorción ocurre cuando las toxinas se adhieren a la membrana del dializador. Este fenómeno está influenciado tanto por las propiedades fisicoquímicas de la superficie de membrana como por el soluto que está siendo adsorbido. En un contexto clínico, la adsorción es relevante debido a las posibles discrepancias en la medición de la eliminación de solutos entre el lado de la sangre y el lado del dializado [20].

En términos generales, la adsorción se limita principalmente a las proteínas, en donde las membranas hidrofóbicas adsorben más proteínas que las membranas de naturaleza hidrofílica [20]. La modificación de las propiedades superficiales, como la estructura de los poros y el grosor de la membrana, pueden alterar su afinidad para la absorción de proteínas. Es esencial prestar especial atención a este aspecto durante la fabricación de la membrana para evitar que los poros sean demasiado grandes, lo que podría provocar la retención de proteínas en ellos debido a la obstrucción estérica. Esto, a su vez, reduciría tanto el transporte difusivo como el convectivo de proteínas de bajo peso molecular, lo que finalmente llevaría al ensuciamiento de la membrana [20].

2.5 Membranas para diálisis

Las membranas dializadoras son el componente principal de los dispositivos de diálisis por lo que son pieza clave para las terapias de reemplazo renal [9]. Es así, que las siguientes subsecciones son dedicadas a su descripción y entendimiento de su naturaleza química.

2.5.1 Clasificación

Existen diversas clasificaciones para las membranas utilizadas en hemodiálisis. La primera categorización fue con base en la composición química de las membranas, éstas se dividían en membranas celulósicas y sintéticas [10]. Por otro lado, existe otra clasificación que se basa en la habilidad de las membranas para remover pequeñas moléculas dando lugar a considerarse de alto y bajo desempeño. En esta última categorización se toma como referencia el peso molecular de la urea (60 kDa) [10]. Otra categoría es la basada en la habilidad de las membranas de remover moléculas de tamaño medio donde aquí se considera como referencia la molécula de β_2 macroglobulina (11 800 Da), de ese modo las membranas se pueden separar en alto-flujo y bajo-flujo. Finalmente, también existe la clasificación considerada por la *US Food and Drug Administration* (FDA) que agrupa las membranas en alta permeabilidad y convencionales [10].

2.5.2 Características

Las membranas para aplicación en hemodiálisis deben presentar hemocompatibilidad y propiedades anticoagulantes. Lo anterior implica que el material al entrar en contacto con la sangre no debe iniciar el proceso de coagulación por adsorción de las proteínas plasmáticas, y consecuentemente, la formación de trombos [10], [29], [30]. Además, tampoco deben promover infecciones, reacciones alérgicas, lixiviación, espalación; y evitar la transferencia de compuestos del dializado contaminado [30].

Es así como, en la actualidad, se han diseñado membranas que puedan ser biocompatibles y hemocompatibles. La primera generación de membranas consistía en membranas celulósicas sin ninguna modificación o tratamiento superficial [10], [20]. Estas membranas simétricas e hidrofílicas suelen remover eficientemente pequeños solutos mediante difusión debido a su estructura delgada y a su alto número de poros. Sin embargo, presentan el inconveniente de que los pequeños diámetros del poro limitan la permeabilidad y la oportunidad de alcanzar altos flujos. También la presencia de hidroxilos en la cadena polimérica de la celulosa es responsable de las frecuentes reacciones de incompatibilidad [20]. En cuanto a las membranas sintéticas, la primera membrana sintética asimétrica fue de la marca Amicon hecha de polielectrolito precipitado. Tiempo después apareció la membrana hecha de poliacrilonitrilo AN69 de Hospal siendo una membrana altamente permeable, de estructura simétrica con propiedades de difusión, convección y adsorción. Desde entonces se han desarrollado otras membranas sintéticas de polisulfona, triacetato de celulosa, poliamida, polimetacrilato, polietersulfona y poliariletersulfona/poliamida [13], [20]. Sin embargo, los esfuerzos se siguen dirigiendo a incrementar la hemocompatibilidad de las membranas, por

lo que se considera la segunda generación aquellas con inmovilización superficial o modificación con estructuras hidrofílicas [10].

Esencialmente se busca que la membrana esté conformada por materiales que contengan la presencia de grupos funcionales que repelan a las proteínas. Se ha reportado en la literatura que los grupos funcionales capaces de repeler las proteínas de la sangre son los que exhiben naturaleza hidrofílica, son aceptores de enlaces de hidrógeno, por ende, no contiene átomos de elementos que sean donadores de enlaces de hidrógeno y, finalmente, son de carga eléctrica neutra [11], [12]. Los grupos que coinciden con dichas características son los aniónicos como el sulfonato ($-\text{SO}_3^-$), el carboxilato ($-\text{COO}^-$) y amino ($-\text{NH}_2$) que puedan repeler los factores anticoagulantes en la sangre y así atrasar la coagulación [1], [13].

2.5.3 Polímeros

Como se mencionó anteriormente, existen dos grandes categorías de membranas con base en el polímero usado para su fabricación: celulosa, celulosa modificada o sustituto de celulosa y los polímeros sintéticos [20], [31]. En ese sentido, en la Tabla 2 se enlistan los polímeros ampliamente descritos en la literatura para la fabricación de membranas para hemodiálisis.

Tabla 2. Polímeros matriz más utilizados en la fabricación de membranas para hemodiálisis, no se consideran modificaciones del polímero.

| | Polímero | Ventajas | Desventajas | Nombres comerciales - Empresa | Ref |
|----------|--|---|--|-------------------------------|------------------|
| Celulosa | Celulosa y celulosa cupramoniaca (Cuprophane®) | <ul style="list-style-type: none"> • Biocompatibilidad • Resistencia térmica. • Naturaleza hidrofílica. • Buena remoción de solutos de bajo peso molecular. | <ul style="list-style-type: none"> • Baja hemocompatibilidad. Se requiere su modificación. • Forma membranas simétricas. • Gran número de grupos hidroxilos libres en el polímero de celulosa que se cree que son responsables de la activación de proteínas. • Alto riesgo de penetración de productos bacterianos desde el dializado hacia la sangre. • No elimina moléculas de tamaño medio. | CF-1511 - Baxter | [23], [32], [33] |

| | | | | | |
|------------------------------|---|---|--|---|--|
| Sustituto de celulosa | <p>Celulosa modificada como acetato de celulosa, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa, Hemophan®</p> | <ul style="list-style-type: none"> • La sustitución de los grupos hidroxilo libres se sustituyen por acetato lo que mejora la biocompatibilidad. | <ul style="list-style-type: none"> • De mayor costo que las membranas estándar. • Mayor producción de citocinas proinflamatorias. • Baja remoción de β2-microglobulina. | <p>HT-100 – Baxter CT-110G - Baxter Sureflux - Nipro</p> | <p>[20], [34]</p> |
| | Sintéticas | <p>Polisulfona (PSU)</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Excelentes propiedades mecánicas. • Químicamente inerte. • Estabilidad térmica. • Permanece estable en condiciones de esterilización. • Permeabilidad al agua. • Buena remoción de β2-microglobulina | <ul style="list-style-type: none"> • Naturaleza hidrofóbica. Se induce la formación de coágulos. • Mayor activación de neutrófilos. • Aumenta la producción de citocinas proinflamatorias. | <p>FX-class - Fresenius Xevonta - B Braun REXEED series – Asahi F15 - WEGO</p> |
| <p>Polietersulfona (PES)</p> | | <ul style="list-style-type: none"> • Buenas propiedades mecánicas. • Buenas propiedades térmicas. • Buena remoción de moléculas de peso molecular medio. | <ul style="list-style-type: none"> • Naturaleza hidrofóbica que afecta la hemocompatibilidad. <ul style="list-style-type: none"> • Baja biocompatibilidad. • Adsorción de proteínas en su superficie. • Persistencia de la activación del sistema inmune. | <p>ELISIO S - Nipro</p> | <p>[13], [40]</p> |

| | | | | |
|--------------------------------|--|---|---------------------------------------|------------------|
| Poli(metil metacrilato) (PMMA) | <ul style="list-style-type: none"> • Buena permeabilidad. • Buena biocompatibilidad. • Gran remoción de proteínas de peso molecular medio. • Menor producción de citocinas proinflamatorias en comparación con las membranas de polisulfona. • Efecto positivo sobre la anemia | <ul style="list-style-type: none"> • Absorción de proteínas y adherencia de plaquetas en la superficie de membranas. • Causa leucopenia leve | Filtalyzer – Toray | [41], [42] |
| Poliacrilonitrilo (PAN) | <ul style="list-style-type: none"> • Excelentes propiedades mecánicas. • Estabilidad térmica. • Formador de membranas. • Adsorción de proteínas proinflamatorias de peso molecular medio y productos bacterianos. • Menor activación de neutrófilos en comparación con membranas de PMMA. | <ul style="list-style-type: none"> • Baja hemocompatibilidad. • Naturaleza hidrofóbica. • Pobre biocompatibilidad. • Producción de bradicinina. • Altos riesgos de reacción anafilática en comparación con otras membranas sintéticas. • Persistencia de una ligera activación del complemento. | AN69 – Gambro Hospal HeprAN - Meyzieu | [43] |
| Poliamida (PA) | <ul style="list-style-type: none"> • Alta resistencia química. • Buenas propiedades mecánicas. | <ul style="list-style-type: none"> • Naturaleza hidrofóbica. | Polyflux L - Baxter | [44], [45] |
| Poli(alcohol vinílico) (PVOH) | <ul style="list-style-type: none"> • Alta hidrofiliidad. <ul style="list-style-type: none"> • Alta Biocompatibilidad • Alta resistencia mecánica. • Estabilidad de pH. | <ul style="list-style-type: none"> • Se requiere entrecruzar para dar resistencia al agua. | | [46], [47], [48] |

Como se observa de la Tabla 2, los polímeros como PSU y PES brindan propiedades mecánicas y térmicas excelentes lo que ha favorecido que se usen en la fabricación del 93%

de las membranas de hemodiálisis; siendo el 71% de las membranas hechas con PSU y el 22% con PES. Sin embargo, ambas presentan problemas y requieren ser modificadas debido a su naturaleza hidrofóbica que provoca la adhesión de proteínas sanguíneas y, por ende, se induce la coagulación [49]. Evitar la coagulación es de suma importancia pues de no ser así se desencadena un descenso del número de leucocitos (leucopenia) y/o de plaquetas en sangre (trombocitopenia) [32]. Por esa razón, se desea un polímero que brinde resistencia mecánica, biocompatibilidad y hemocompatibilidad [48]. Uno de los polímeros que más se ajusta a este perfil es el PVOH pues se trata de un polímero no tóxico, biodegradable y con diferentes aplicaciones biomédicas [46]. Debido a su alta solubilidad en agua el PVOH es generalmente entrecruzado para hacerlo más estable mecánicamente e insoluble en agua [46].

2.5.4 Métodos de fabricación de membranas

En la literatura se especifica que el método comúnmente utilizado para la fabricación de membranas con aplicación en hemodiálisis es la inversión de fase [50]. De hecho, la mayoría de las membranas comerciales para otras aplicaciones son fabricadas por este método [51]. La inversión de fase implica la transformación controlada de un polímero en un estado líquido a un estado sólido. Durante este proceso, la solidificación ocurre por la transición de una mezcla líquido-líquido, donde la fase con mayor concentración de polímero se solidifica [52].

En el proceso de inversión de fase, las soluciones poliméricas pueden experimentar precipitación de diferentes maneras, tales como evaporación del solvente, precipitación por evaporación controlada, precipitación térmica, precipitación desde la fase de vapor y precipitación por inmersión [51], [52]. A continuación, se detallan las técnicas de preparación [52]:

- a) *Precipitación por evaporación de solvente.* Es la técnica más simple ya que consiste en disolver un polímero en un solvente y luego verter la solución polimérica en un soporte como una placa de vidrio, metal o teflón. Posteriormente, el solvente se deja evaporar en una atmósfera inerte lo que resulta en la formación de una membrana densa y homogénea.
- b) *Precipitación desde la fase de vapor.* Una película de polímero disuelto en solvente se coloca en una atmósfera donde la fase de vapor consiste en un no solvente. La alta concentración de no solvente en la fase evita la evaporación del solvente de la película. La formación de la membrana se produce por la difusión del no solvente en la película.
- c) *Precipitación por evaporación controlada.* En este caso, el polímero se disuelve en una mezcla de solvente y no solvente. Durante la evaporación el solvente se evapora, y la composición cambia hacia un mayor contenido de no solvente y polímero, lo que conduce eventualmente a la precipitación del polímero y la formación de una membrana con una capa superficial más densa.

- d) *Precipitación térmica*. Una solución de polímero en un solvente se enfría para inducir la separación de fases. La evaporación del solvente da lugar a la formación de una membrana densa.
- e) *Precipitación por inmersión*. Este método implica verter una solución de polímero sobre un soporte adecuado y sumergirlo en un baño de coagulación que contiene un mal solvente del polímero, conocido como solvente teta. La precipitación del polímero se produce por el intercambio de solvente y el solvente teta. La estructura de la membrana es el resultado de una combinación de transferencia de masa y separación de fases. Estas membranas se pueden preparar en dos configuraciones: plana o tubular. Aunque tanto las membranas planas como las de fibra hueca pueden exhibir rendimientos similares, los procedimientos para su preparación no son los mismos.

Las membranas planas se preparan vertiendo directamente la solución de polímero sobre un soporte mediante un cuchillo de colada. El grosor puede variar entre 50 a 500 μm . Posteriormente, la película se sumerge en un baño de no solvente para el polímero, lo que provoca el intercambio entre el solvente y el solvente teta y, finalmente, la precipitación del polímero. A menudo, se utiliza agua como solvente teta, pero también se pueden usar solventes orgánicos. Las membranas obtenidas después de la precipitación se pueden usar directamente o se puede aplicar un post-tratamiento (por ejemplo, tratamiento térmico).

La forma tubular es la geometría alternativa en la fabricación de membranas, donde se pueden distinguir los siguientes tipos: fibra hueca (con un diámetro inferior a 0.5 mm), capilares (con un diámetro entre 0.5 y 5 mm) y tubulares (con un diámetro superior a 5 mm). Las fibras huecas y los capilares pueden ser producidos mediante tres métodos: *wet spinning*, *melt spinning*, *dry spinning* y *dry-wet spinning* [53].

Para la preparación de estas membranas se bombea a través de un hilador una solución polimérica viscosa. Es esencial que la viscosidad de la solución polimérica sea elevada, generalmente superior a 100 Poise. El fluido se bombea a través del tubo interno del hilador y después de un tiempo en aire o en una atmósfera controlada, la fibra se sumerge en un baño que contiene un no solvente donde ocurre la coagulación.

Con el objetivo de mejorar la biocompatibilidad y la remoción de moléculas tóxicas de peso molecular medio (≥ 500 D), se han aplicado diversas técnicas de modificación en las membranas. Estas incluyen la inmovilización química de los grupos funcionales (*Surface grafting*), unión de especies químicas capa por capa (LBL), unión covalente de hidrogel súper hidrofílico, membrana de matriz mezclada (MMM) y modificación del polímero base [54].

2.5.5 Tendencias

Como parte de los antecedentes de esta investigación, se ha llevado a cabo un análisis bibliométrico con el propósito de obtener una visión clara de las tendencias en el campo de estudio. Este análisis se inició con la búsqueda y selección de publicaciones referentes a estudios sobre membranas poliméricas con aplicación en hemodiálisis. La base de datos utilizada fue Scopus donde las palabras clave introducidas en el buscador fueron “Hemodialysis”, “Dialysis”, “Kidney”, “Membrane” y “Polymer”. Se planteó como estrategia de investigación tres fases. La primera fase corresponde a la etapa de identificación en donde se aplicaron tres filtros que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de filtros aplicados y resultados de la estrategia de revisión correspondiente a la fase de identificación.

| | Filtro 1 | Filtro 2 | Filtro 3 | |
|-------------------------------|---|---|--|---------------------------|
| Base de datos (Scopus) | Hemodialysis and Dialysis and Kidney and Membrane and Polymer | Palabras clave relacionadas a tipos de polímero y relacionadas a hemodiálisis | Áreas en ciencia de materiales, química e ingeniería | Base de datos consolidada |
| Cantidad de documentos | 1938 | 352 | 145 | 125 |

En la segunda fase se procedió a revisar los títulos y resúmenes de los documentos obtenidos por la búsqueda, y se agregaron filtros adicionales para excluir artículos que trataran de membranas para aplicaciones distintas a la hemodiálisis. De ese modo quedaron un total de 68 artículos que fueron visualizados mediante el software *VOSviewer* versión 1.6.19. En la Tabla 4 se presentan las 24 palabras de mayor ocurrencia.

Tabla 4. Ocurrencia de palabras claves recuperadas de los 68 artículos seleccionados.

| No. | Palabras claves | Ocurrencia | Total link strength |
|------------|------------------------|-------------------|----------------------------|
| 1 | Membranes | 36 | 107 |
| 2 | Dialysis | 21 | 86 |
| 3 | Hemodialyzers | 14 | 70 |
| 4 | Biocompatibility | 14 | 51 |
| 5 | Urea | 12 | 44 |
| 6 | Hidrophilicity | 10 | 40 |
| 7 | Hemodialysis | 9 | 31 |
| 8 | Composite membrane | 8 | 22 |
| 9 | Phase separation | 7 | 27 |
| 10 | Pore size | 7 | 24 |
| 11 | Hollow fiber membranes | 6 | 25 |
| 12 | Creatinine | 5 | 14 |
| 13 | Polyvinyl alcohols | 5 | 16 |

| | | | |
|-----------|---------------------|---|----|
| 14 | Cellulose acetate | 5 | 22 |
| 15 | Polyethylenglicols | 5 | 27 |
| 16 | Artificial organs | 4 | 18 |
| 17 | Blood purification | 4 | 14 |
| 18 | Electrospinning | 4 | 7 |
| 19 | Uremic toxins | 4 | 19 |
| 20 | Antifouling | 4 | 15 |
| 21 | Polyethersulfone | 4 | 17 |
| 22 | Casting solution | 4 | 22 |
| 23 | Oxides polyethylene | 4 | 19 |
| 24 | Esters | 4 | 17 |

La última fase consistió en el análisis de la red de palabras claves que se ilustra en la Figura 5. En la red se muestra la presencia de 4 agrupaciones que se dividen en color rojo, amarillo, verde y azul. En su mayor parte, se observa la presencia de polímeros utilizados en la fabricación de membranas como polietersulfonas, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), acetato de celulosa y poli(alcohol vinílico). Este último polímero se encuentra en el mismo grupo que “biocompatibility” lo cual indica que hay interés por parte de la comunidad científica en usarlo para aplicaciones biomédicas por su actividad inocua en el cuerpo. Es pertinente notar la presencia de palabras como “ester”, “membranes” y “artificial organs” dentro del mismo grupo, indicando que las membranas esterificadas tienen una potencial capacidad para biomimetizar la función del riñón. Las tendencias son consideradas dentro del trabajo de investigación

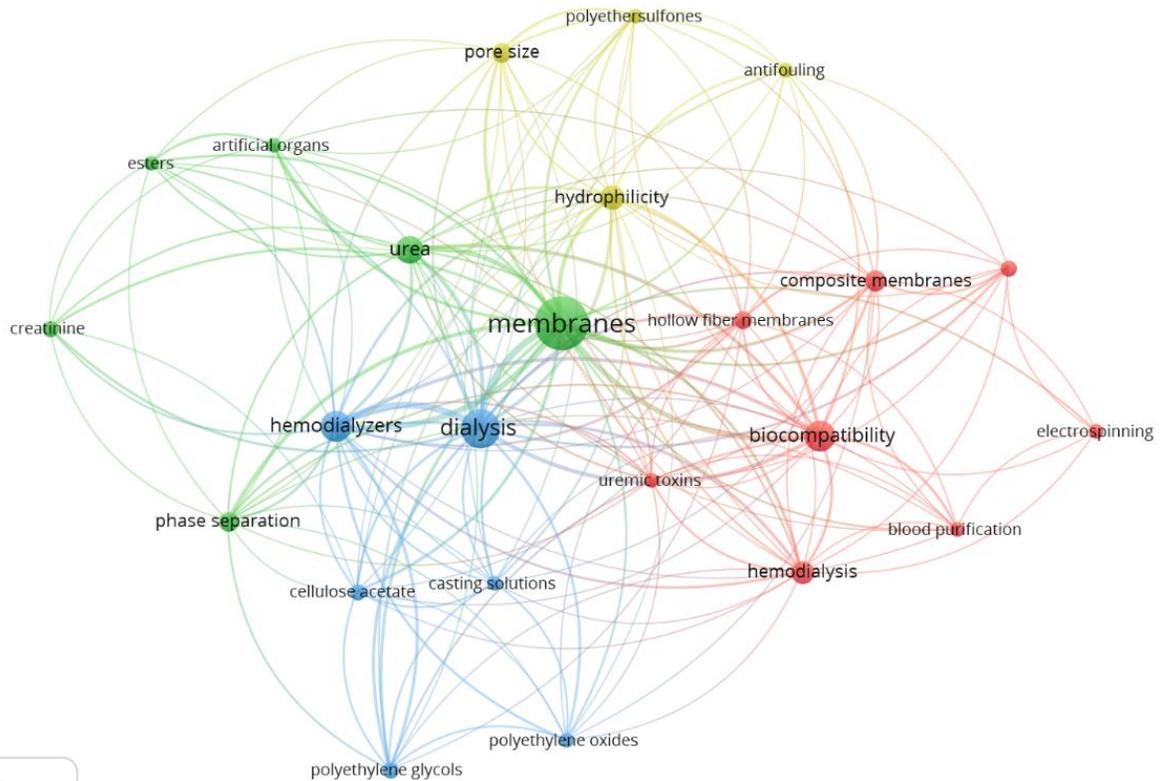


Figura 5. Red basada en las palabras clave de los artículos exportados de Scopus.

Además, se consultó la base de datos de patentes conocida como LENS en donde se introdujeron las palabras clave “hemodialyzer”, “membrane” y “polymer” las cuales arrojaron un total de 82 patentes. Tras realizar una inspección y depuración de las patentes asegurándose de que se trataran exclusivamente de membranas, se obtuvo un total de 77 patentes relevantes. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de los países a los que pertenecen las patentes, y se realizó una gráfica de pastel (Figura 6) que muestra a los países líderes en investigación y desarrollo de membranas para hemodiálisis. Se puede destacar que Estados Unidos encabeza la lista, seguido de países europeos, los países que se encuentran dentro de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO por sus siglas en inglés), China, Canadá, Japón y, finalmente, Taiwan.

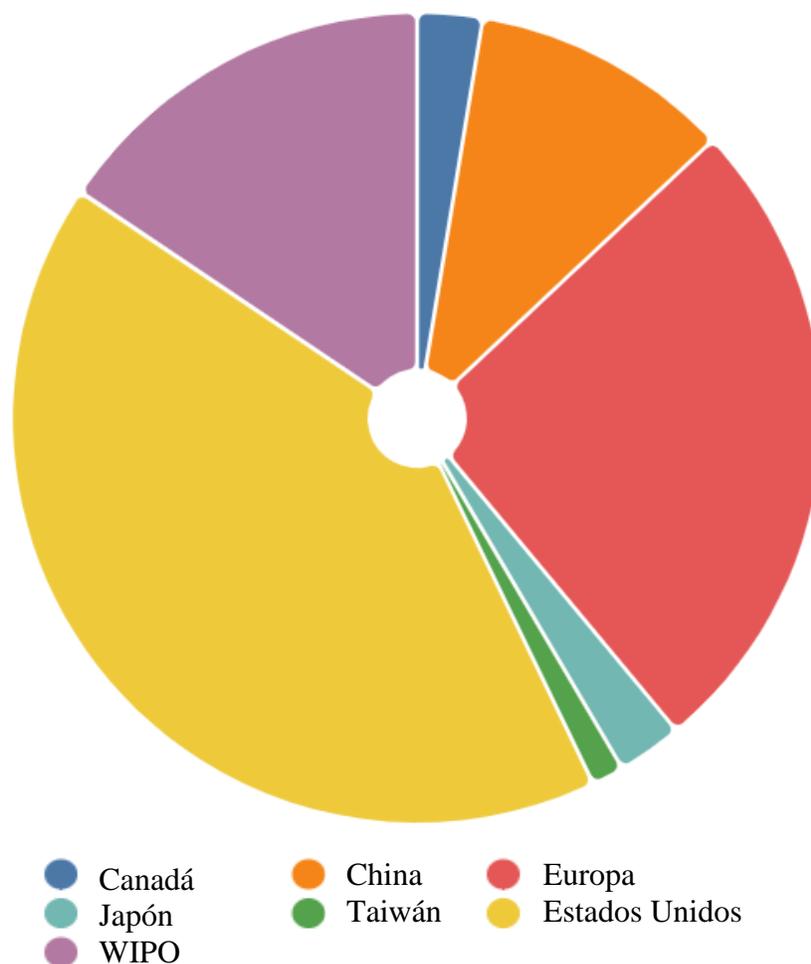


Figura 6. Gráfica de los países que cuentan con patentes en materia de membranas para hemodiálisis obtenida de la base de datos LENS.

En resumen, el análisis de la red de palabras clave y la revisión de patentes revelan una notable actividad en la investigación y desarrollo de membranas poliméricas para aplicaciones biomédicas, especialmente en hemodiálisis. Polímeros como el poli(alcohol vinílico) destacan por su biocompatibilidad, y las membranas esterificadas muestran un gran potencial para emular la función renal. Estados Unidos y otros países lideran en el registro de patentes, lo que evidencia un fuerte enfoque en la innovación y el desarrollo en este campo.

Esta línea de investigación representa una oportunidad significativa para México, ya que el desarrollo de nuevas membranas poliméricas para hemodiálisis podría posicionar al país como un competidor en el ámbito de la biotecnología médica. Invertir en esta área podría fomentar la colaboración internacional, atraer inversiones y mejorar los tratamientos médicos disponibles tanto a nivel nacional como internacional.

2.6 Sostenibilidad

En octubre de 1987, el Informe Brundtland definió el término de desarrollo sostenible, el cual consiste en satisfacer las necesidades presentes sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer las suyas. La sostenibilidad se compone de tres dimensiones: la ambiental, la social y la económica. Estas tres dimensiones están estrechamente ligadas y son dependientes una de la otra [55]. Para los fines de esta investigación, la sostenibilidad se relaciona con la importancia de satisfacer la necesidad básica del cuidado de la salud, un derecho humano universal que forma parte de la sostenibilidad social. Por lo tanto, este trabajo se alinea con dos de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

El primer objetivo que abarca este trabajo es el ODS número 3, centrado en la salud y el bienestar [8]. El desarrollo de membranas para hemodiálisis más eficientes y asequibles tiene como objetivo tratar una enfermedad crónica cuya incidencia se espera que aumente en los próximos años.

El segundo objetivo relevante es el ODS número 12, que busca garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles [56]. Un ejemplo de cómo este trabajo contribuye a dicho objetivo es el uso de reactivos biodegradables, abundantes o reciclables. El poli(alcohol vinílico) (PVOH) es un polímero biodegradable, ampliamente disponible y de bajo costo. De manera similar, el ácido cítrico se utiliza como una alternativa más sostenible en comparación con otros agentes químicos como la heparina, que se emplean para evitar la coagulación.

La tecnología y la ciencia juegan un papel crucial en el desarrollo sostenible y se requiere de su uso para identificar las respuestas que permitan resolver dolencias ambientales, sociales y económicas.

Metodología

“It is a good morning exercise for a research scientist to discard a pet hypothesis every day before breakfast. It keeps him young.”

- Konrad Lorenz

3.1 Materiales

Los reactivos utilizados en la preparación de las membranas son poli(alcohol vinílico) (PVOH, $(\text{CH}_2\text{CHOH})_n$, M_w : 31,000-50,000, 98-99% hidrolizado, Sigma Aldrich®), ácido cítrico monohidratado (AC, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Fermont®) y glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, Karal). Se utilizaron como solventes etanol 96% (EtOH, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Fermont®), acetona ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, BAKER® ACS) y agua destilada. Los reactivos fueron utilizados sin modificación alguna.

3.2 Síntesis de PVOH esterificado

Para la modificación química del PVOH, se llevó a cabo una reacción de esterificación tipo Fischer entre los hidroxilos del PVOH y los grupos carboxílicos del ácido cítrico en medio ácido. La relación de PVOH:ácido cítrico se varió con el fin de determinar qué relación molar es la adecuada para obtener una solución que permitiera formar membranas y contuviera enlaces éster.

Para reducir la existencia de ácidos carboxílicos libres, se realizó una segunda esterificación al efectuar el entrecruzamiento con un alcohol de cadena corta con características de biocompatibilidad, como el glicerol. Se da una descripción más detallada del arreglo experimental en el correspondiente capítulo.

3.3 Fabricación de membranas

Las membranas se fabricaron a través de dos técnicas que brindan características distintas al material. El proceso de preparación de membranas por inversión de fase da como resultado membranas asimétricas, las cuales consisten en una capa superior con microporosidades soportada por una subcapa con macroporosidades. En otras palabras, estas membranas tienen una capa superior que se puede considerar como densa soportada por una subcapa porosa. Para fines de este trabajo, se referirá a este tipo de membranas como densas.

El arreglo experimental consistió en colocar las soluciones de PVOH:AC sobre placas de vidrio y sumergirlas en un baño de coagulación con acetona como solvente teta. Una vez que

la membrana se desprendió de la placa de vidrio, se colocó en un plato de PTFE para su secado a temperatura ambiente.

Una segunda membrana, utilizada como una segunda capa filtrante, se realizó mediante la técnica de electrohilado, dando como resultado membranas con fibras que, al formar una red, presentan porosidades dadas por la red misma y microporosidades de la fibra. Estas membranas no tejidas se prepararon con el equipo TL-01 marca TONGLI. Las condiciones utilizadas fueron: voltaje de 20 kV, distancia punta-colector de 15 cm, velocidad del colector de 300 rpm y velocidad de flujo de 0.5 mL/hr.

3.4 Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización de las membranas obtenidas tienen como objetivo determinar la presencia de grupos funcionales tipo éster y ácido carboxílico (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier - FTIR); evaluar la biocompatibilidad y hemocompatibilidad del material (citotoxicidad, hemólisis y coagulación); analizar las propiedades térmicas (Calorimetría Diferencial de Barrido - DSC); y estudiar la morfología, topografía y naturaleza hidrofílica (SEM, AFM y Ángulo de Contacto). Finalmente, también se determinó el grado de hinchamiento en presencia de agua. Lo anterior se resume en la Figura 7. La preparación de la muestra se describe en la sección experimental del respectivo capítulo.

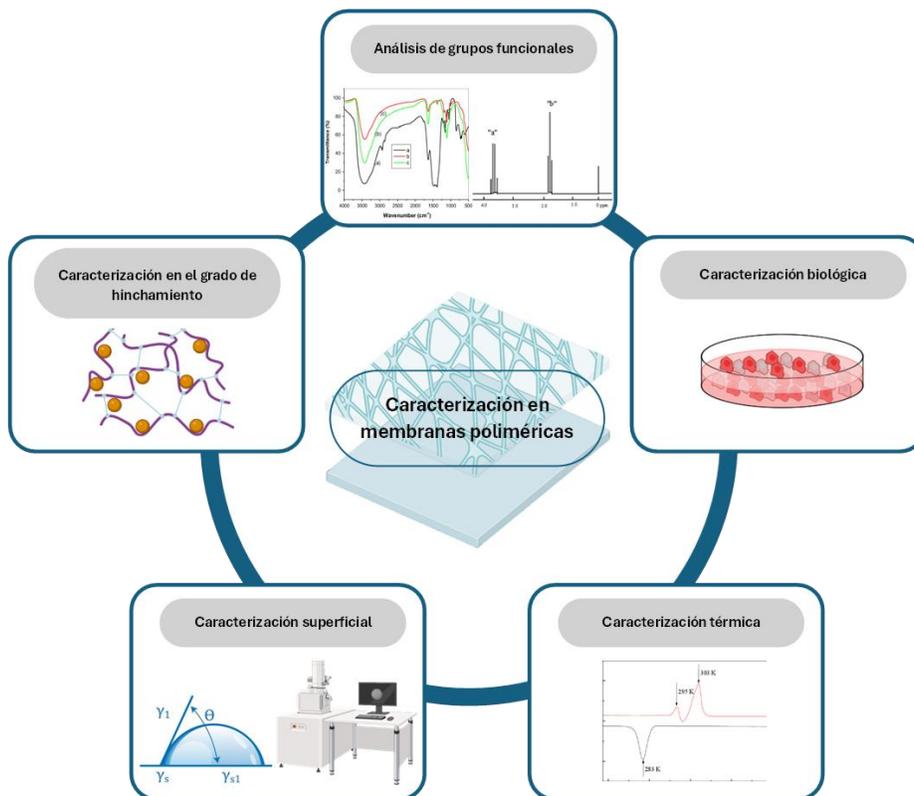


Figura 7. Esquema de las caracterizaciones realizadas durante el trabajo de investigación. Las caracterizaciones se agrupan en 5 secciones.

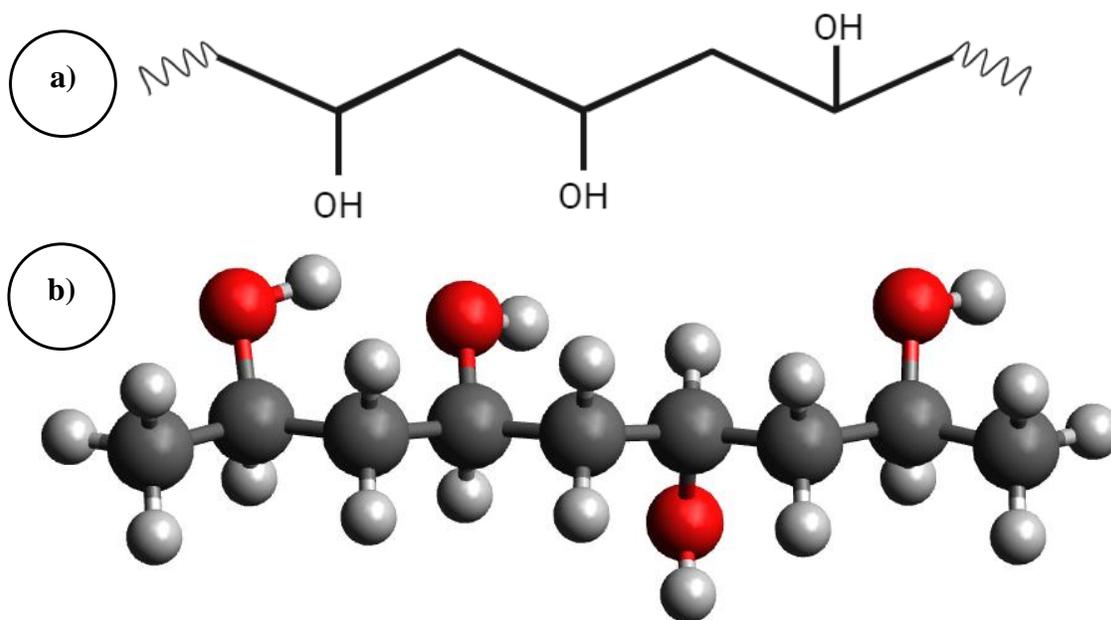
Funcionalización del PVOH

“If your dreams do not scare you, they are not big enough”

- Ellen Johnson Sirleaf

4.1 Antecedentes

El poli(alcohol vinílico) es un polímero sintético que exhibe excelentes propiedades como resistencia química, termoestabilidad, es inocuo al cuerpo y es capaz de formar membranas [57]. El PVOH tiene como estructura química la mostrada en la Figura 8, en donde debido a la presencia de hidroxilos acomodados de forma aleatoria (configuración átactica) en la cadena se le considera un polímero polihidroxiado soluble en agua, uno de los pocos alifáticos lineales no halogenados [57].



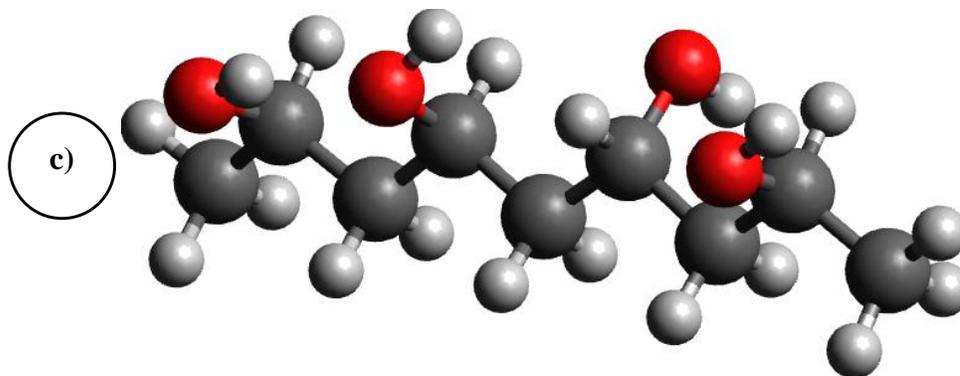


Figura 8. a) Fórmula estructural del PVOH atáctico, b) así como su modelo molecular visto desde arriba y c) desde un costado. Se puede observar que los hidroxilos están posicionados de forma aleatoria.

Además de la naturaleza de la matriz de la membrana, se ha buscado la forma de asegurar que los mecanismos de coagulación no se activen por lo que se han enfocado esfuerzos en incorporar agentes anticoagulantes. El anticoagulante convencionalmente utilizado en hemodiálisis es la heparina que es un polisacárido sulfatado que contiene grupos sulfónico, sulfoamino y carboxílico [58], aunque su uso excesivo ha traído consigo efectos secundarios, además de que los métodos para su inmovilización en la membrana suelen ser complejos y tener una influencia negativa en las características mecánicas de ésta; pues la degradación, interrupción de la cadena y reacciones secundarias no deseadas, son inevitables [59]. Una alternativa para la sustitución de la heparina es el ácido cítrico que presenta propiedades anticoagulantes [59], [60], incluso se ha usado en lugar de la heparina durante la hemodiálisis con dializadores de triacetato de celulosa [61]. El ácido cítrico es un ácido orgánico débil que contiene 3 grupos carboxílicos y un hidroxilo (Figura 9) [61].

Es ampliamente descrito como un importante producto intermediario del ciclo de Krebs por lo que se considera como no tóxico y biodegradable en los organismos [62]. Además de sus propiedades anticoagulantes, el ácido cítrico también se puede utilizar como agente entrecruzante. El entrecruzamiento con ácido cítrico se ve altamente influenciado por la concentración, la temperatura de reacción y el pH [63], [64].

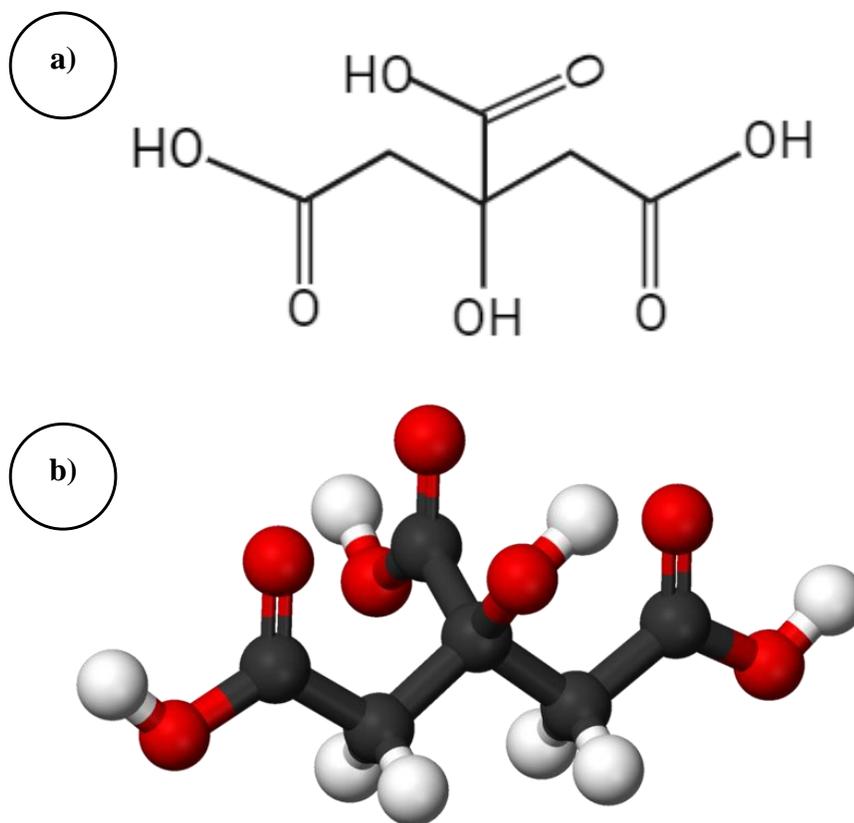


Figura 9. a) Fórmula estructural del ácido cítrico, b) así como su modelo molecular.

La reacción de esterificación entre el poli(alcohol vinílico) y el ácido cítrico es una reacción de tipo esterificación de Fischer, pues se tiene como producto un éster de la reacción entre un alcohol y un ácido carboxílico en medio ácido. Por otro lado, se ha descrito que el agregar un exceso de ácido cítrico provoca la funcionalización del polímero en lugar del entrecruzamiento [62]. En ese sentido, se realizó el cálculo estequiométrico de la cantidad necesaria de ácido cítrico para que se diera la reacción con todos los hidroxilos de la cadena polimérica. A continuación, se describe el desarrollo experimental y los resultados obtenidos.

4.2 Metodología

4.2.1 Funcionalización del PVOH

Para determinar la mejor proporción de PVOH:AC, se prepararon soluciones acuosas de PVOH con una concentración de 10% p/p. Estas soluciones se dejaron en agitación magnética a 300 rpm y 100°C durante 3 horas [65]. Una vez que se logró obtener una solución homogénea, se añadió el AC en las siguientes proporciones molares 1:0.25, 1:0.5, 1:1 y 1:4 PVOH:AC. La solución se mantuvo en agitación magnética a 300 rpm y 120°C durante 3 horas [66].

4.2.2 Curva de calibración mediante FTIR

Se llevó a cabo una curva de calibración con el objetivo de determinar la proporción óptima que genere la máxima funcionalización sin afectar el pH del polímero. Para ello, la solución se vertió en un plato de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), y se realizaron lavados con EtOH al 96% para eliminar el exceso de ácido cítrico [67]. Posteriormente, se adicionaron 50 mL de agua destilada para la redilución del polímero y se dejó evaporar en un horno a 60°C durante 24 horas. Se midió el pH con el potenciómetro ExStik®II marca EXTECH Instruments. Los lavados se detuvieron hasta obtener un pH constante. La curva de calibración se generó con base en las alturas de la banda de 1080 cm^{-1} , que corresponde al enlace -O-CH del grupo éster, obtenidas de los espectros FTIR de las diferentes muestras generadas, PVOH:AC 1:0.25, 1:0.5, 1:1 y 1:4 molar. Para ello se utilizó el software *Omic9* versión 9.2.106, con el cual se realizó de forma automática el suavizado de los espectros y la corrección de línea base. Las mediciones se hicieron 3 veces y los datos promedio de las alturas obtenidas fueron graficados en el software *Origin*.

4.2.3 Caracterizaciones fisicoquímicas

4.2.3.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de identificar si la reacción de esterificación se realizó en la cadena polimérica de PVOH se utilizó el espectrofotómetro ThermoScientific Nicolet iS10 con la técnica de reflectancia total atenuada (ATR).

Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente en un intervalo de número de onda de 550 - 4000 cm^{-1} , con 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Mecanismo de reacción de la funcionalización del PVOH con ácido cítrico

En ese sentido, se realizó el cálculo estequiométrico de la cantidad necesaria de ácido cítrico para que se lleve a cabo la reacción con todos los hidroxilos de la cadena polimérica. El mecanismo de reacción propuesto se muestra en la Figura 10. Uno de los oxígenos carbonílicos del ácido cítrico es protonado provocando que aumente el carácter positivo del carbonilo (Figura 10a). El oxígeno del alcohol actúa como nucleófilo y se enlaza al carbono del carbonilo de modo que se tiene un intermediario tetraédrico (Figuras 10b y 10c). Se denomina intermediario tetraédrico porque la hibridación del carbono del ácido carboxílico cambia de sp^2 a sp^3 . El oxígeno hidroxílico (del carbono que reacciona) se protona, formando un catión menos estable, esta carga no se puede compartir entre los dos oxígenos siendo la principal razón por la que en el hidroxilo sucede la protonación que dará paso a la molécula de agua (Figura 10d). El siguiente paso es la disociación de la molécula de agua para llegar a la forma protonada del éster (Figura 10e). Finalmente, al desprotonarse da como resultado el éster de PVOH-AC (Figura 10f).

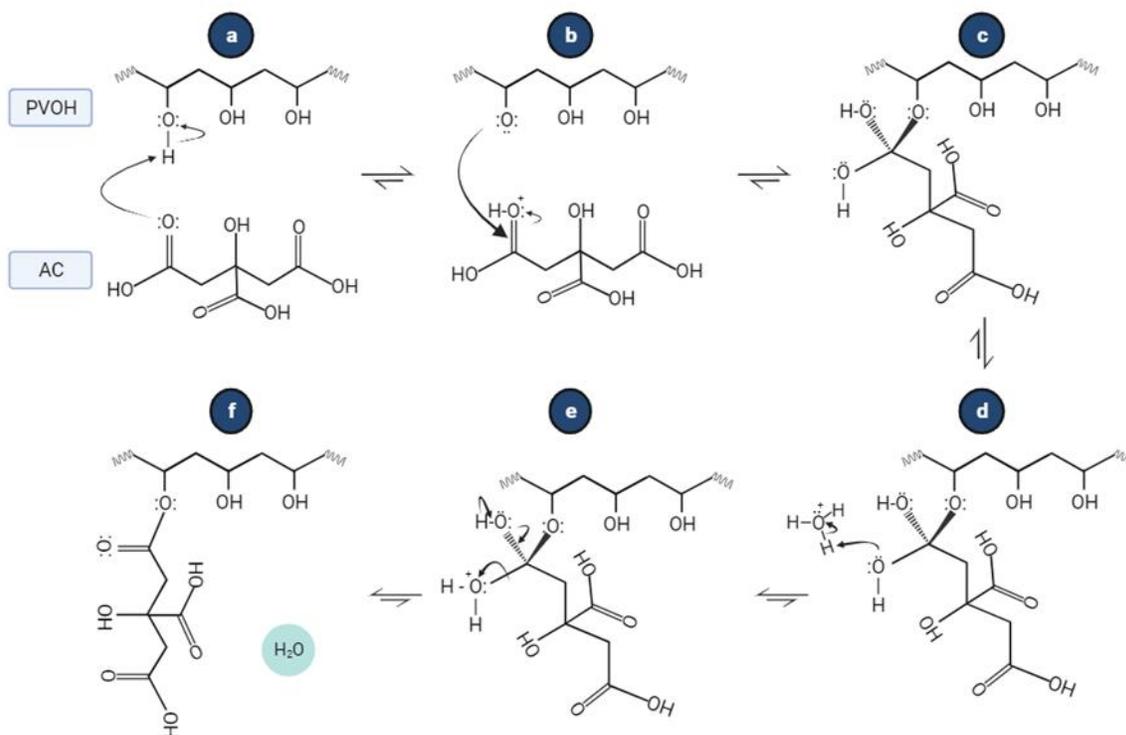


Figura 10. Mecanismo de reacción de la esterificación entre el PVOH y ácido cítrico para favorecer la funcionalización.

Cualitativamente, se observó que una vez realizada la esterificación, la solución era altamente soluble en agua sin la adición de calor lo que indica que la funcionalización pudo haber ocurrido y no el entrecruzamiento, puesto que en ese último lo que se forma es un gel el cual se hidrata, pero no se solubiliza.

4.3.2 Efecto de la funcionalización en la estructura química del PVOH

Para corroborar lo anterior, se utilizó la espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier. Los espectros FTIR del PVOH, AC, PVOH-AC 1:1, y PVOH-AC 1:4 se muestran en la Figura 11.

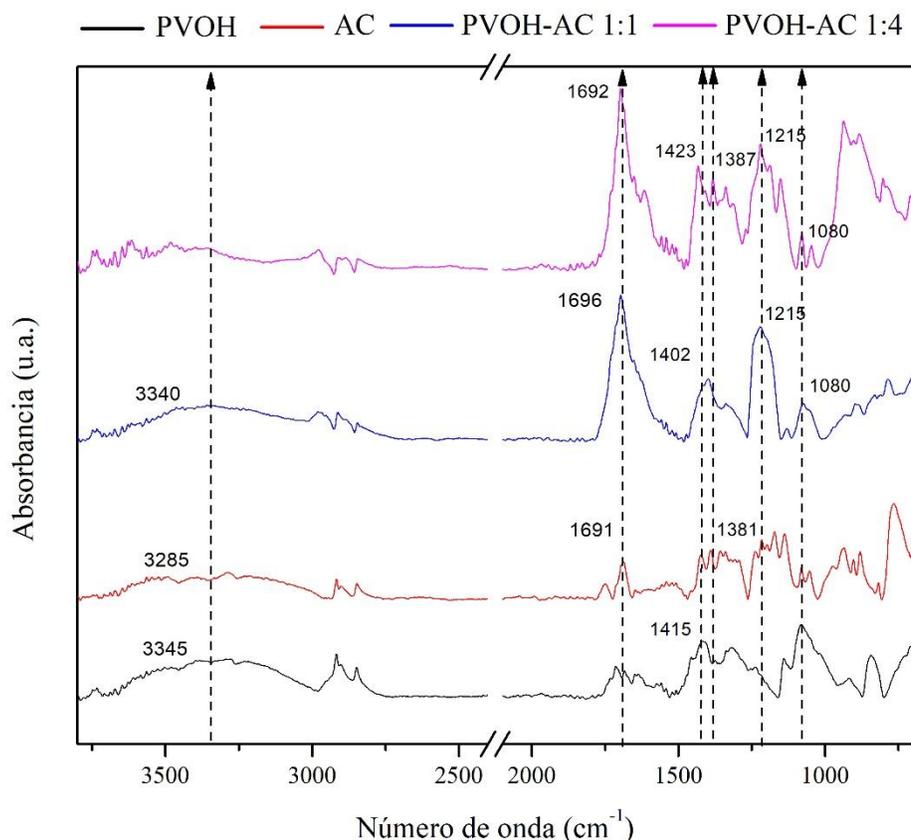


Figura 11. Espectros FTIR de PVOH, Ácido de cítrico, las soluciones de PVOH y AC en relación molar 1:1 y 1:4.

Ambos espectros de PVOH-AC muestran señales características de éster como es la banda alrededor de 1215 cm^{-1} atribuida al alargamiento asimétrico del C-O y en 1080 cm^{-1} debida al enlace O-CH [48], [68]. Los espectros de PVOH, AC y PVOH-AC 1:1 presentan una banda característica de alargamiento del O-H alrededor de 3300 cm^{-1} . En el caso del espectro de PVOH-AC 1:4 esta banda no es tan intensa indicando que posiblemente la mayoría de los hidroxilos del PVOH reaccionaron. Por otro lado, ambos espectros de PVOH-AC presentan una señal intensa alrededor de 1700 cm^{-1} que puede ser atribuida al enlace C=O de alargamiento para ácidos carboxílicos, así como, la banda alrededor de 1380 cm^{-1} que se atribuye al enlace O-H de deformación de ácido carboxílico. El hecho de que se observe la presencia señales atribuidas al ácido carboxílico es un indicativo de que la esterificación ocurrió solo en uno de los tres grupos carboxílicos de la molécula de ácido cítrico dando indicio de que efectivamente sucedió la funcionalización. También se observan señales entre $1423\text{-}1402\text{ cm}^{-1}$ que son atribuidas al enlace C-H [68].

Con la finalidad de determinar el contenido aproximado del grupo éster en la cadena de PVOH se realizó la curva de calibración de las alturas relativas de la banda en 1080 cm^{-1} (Figura 12). La banda en 1080 cm^{-1} es una señal atribuida al enlace O-CH característica en

acetatos formados por alcoholes secundarios o terciarios[68]. También, se eligió dicha banda ya que es la única que no coincide con las señales características para ácidos carboxílicos considerando que aún se encuentran presentes en la solución.

Los datos de la curva de calibración revelaron excelente linealidad con valores de correlación de 0.97532 y mostraron que hay una relación inversamente proporcional entre la cantidad de ácido cítrico agregado y la cantidad de éster encontrado. Esto implica que a proporciones bajas de ácido cítrico se genera el entrecruzamiento, es decir, los 3 grupos carboxílicos de la molécula de ácido cítrico reaccionan. Dado que solo se desea que reaccione uno de los grupos carboxílicos la señal de éster debería disminuir, lo cual coincide con lo obtenido. Para la preparación de membranas se hicieron pruebas de las soluciones 1:1, 1:2 y 1:3 de modo que se asegura la funcionalización sin disminuir demasiado el pH de la solución.

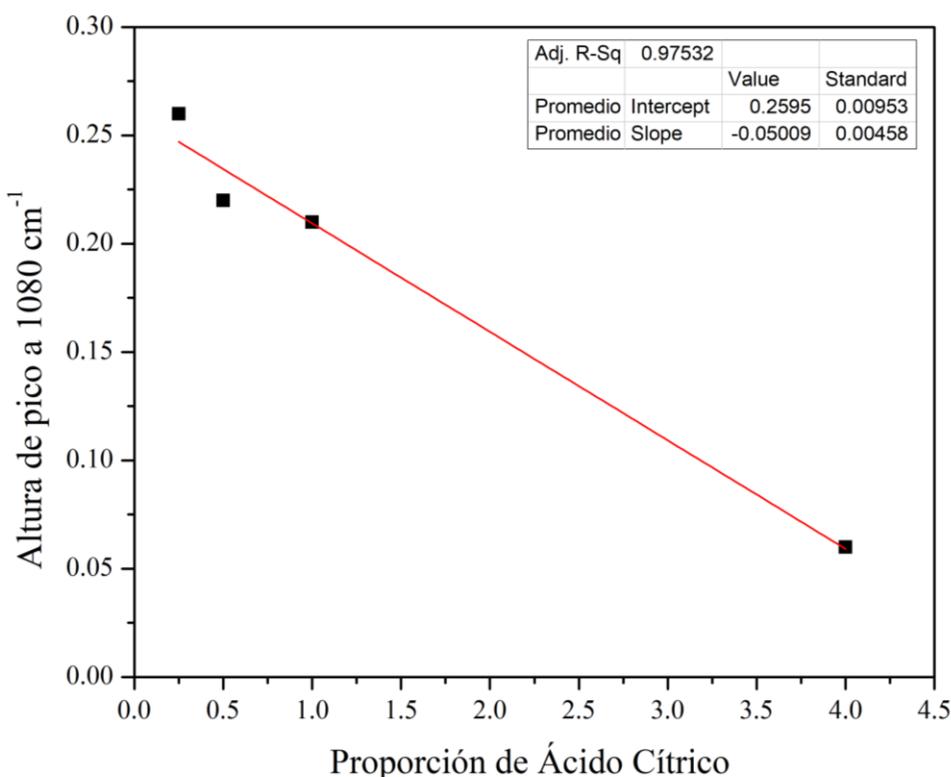


Figura 12. Curva de calibración para la proporción de ácido cítrico vs. altura relativa para la señal de 1080 cm⁻¹

Al realizar pruebas de inversión de fase mediante precipitación por inmersión con las soluciones mencionadas anteriormente, se observó que no hubo formación de membrana al sumergirse en el solvente teta. Al efectuar la inversión de fase por evaporación del solvente, se formaba una placa de polímero poco flexible y quebradiza, lo que indica que la modificación del PVOH funcionalizado no forma membranas. Esto se atribuye al exceso de ácido cítrico que funcionalizó la cadena de PVOH, y como consecuencia, una cantidad considerable de grupos carboxilo permanecen libres aumentando la capacidad de solvatación y no favorece a la formación de películas.

4.4 Notas finales del capítulo

Mediante FTIR se confirmó la presencia de la formación del poliéster PVOH-AC, pues se presentan bandas características de éster en 1215 y 1080 cm^{-1} . Se puede decir que la funcionalización ocurrió dado que también aparecen señales características de ácido carboxílico en 1700 cm^{-1} atribuida al C=O alargamiento y 1380 cm^{-1} atribuida a O-H de deformación para ácido carboxílico. Además, cualitativamente se observó que el polímero obtenido incrementó su solubilidad en agua sin calentamiento, lo cual no sucede con el PVOH solo.

Mediante la curva de calibración se determinó el contenido aproximado de éster permitiendo elegir la proporción más adecuada de ácido cítrico. Así, se consideró realizar pruebas en la preparación de membranas por inversión de fases con las proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 de PVOH:AC. Se observó que estas soluciones no generan membranas, lo que puede deberse a que una cantidad considerable de ácidos carboxílicos permanecen libres, favoreciendo la solvatación del polímero y por tanto no se pudo generar una membrana mecánicamente resistente.

Entrecruzamiento del PVOH

“Acquire new knowledge whilst thinking over the old and you may become a teacher of others.”

- Confucius

5.1 Antecedentes

Como se mencionó en el capítulo IV, el entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas de PVOH se puede lograr con bajas cantidades molares de ácido cítrico. Esto se favorece porque la disponibilidad de las moléculas disminuye, asegurando que todos los grupos carboxílicos del ácido cítrico reaccionen. El entrecruzamiento es necesario para mejorar la integridad estructural de la mezcla polimérica. En este capítulo se explica cómo se usó ácido cítrico en bajas cantidades molares a través de una reacción de esterificación tipo Fischer para mejorar las propiedades mecánicas y favorecer la formación de membranas. El ácido cítrico es un aditivo utilizado en el ámbito alimentario y en cosmética y, al ser de naturaleza no tóxica, se convierte en un precursor favorable para la síntesis de biomateriales [67].

5.2 Metodología

5.2.1 Entrecruzamiento del PVOH

Se prepararon soluciones acuosas de PVOH con una concentración de 10% p/p. Estas soluciones se dejaron en agitación magnética a 300 rpm y 100°C durante 3 horas [65]. Una vez que se logró obtener una solución homogénea, se añadió el AC en las proporciones molares 1:0.02 y 1:0.08 PVOH:AC [66]. La solución se mantuvo en agitación magnética a 300 rpm y 120°C durante 3 horas [66].

5.2.2 Caracterizaciones fisicoquímicas

5.2.2.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de identificar si la reacción de esterificación se realizó en la cadena polimérica de PVOH se utilizó el espectrofotómetro ThermoScientific Nicolet iS10 con la técnica de reflectancia total atenuada (ATR).

Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente en un intervalo de número de onda de 550 - 4000 cm^{-1} , con 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Mecanismo de reacción del entrecruzamiento del PVOH con ácido cítrico

El mecanismo de reacción del entrecruzamiento entre el ácido cítrico y la cadena de PVOH sigue los mismos pasos descritos en el capítulo IV para la funcionalización del PVOH, salvo en el paso g, donde se muestra que la esterificación ocurre en los tres grupos carboxílicos del ácido cítrico, generando así tres moléculas de agua por cada molécula de ácido cítrico. Es importante destacar que la reacción de los grupos carboxílicos puede suceder con diferentes cadenas de PVOH o con la misma cadena a la que ya está unida, como se muestra a continuación en la Figura 13.

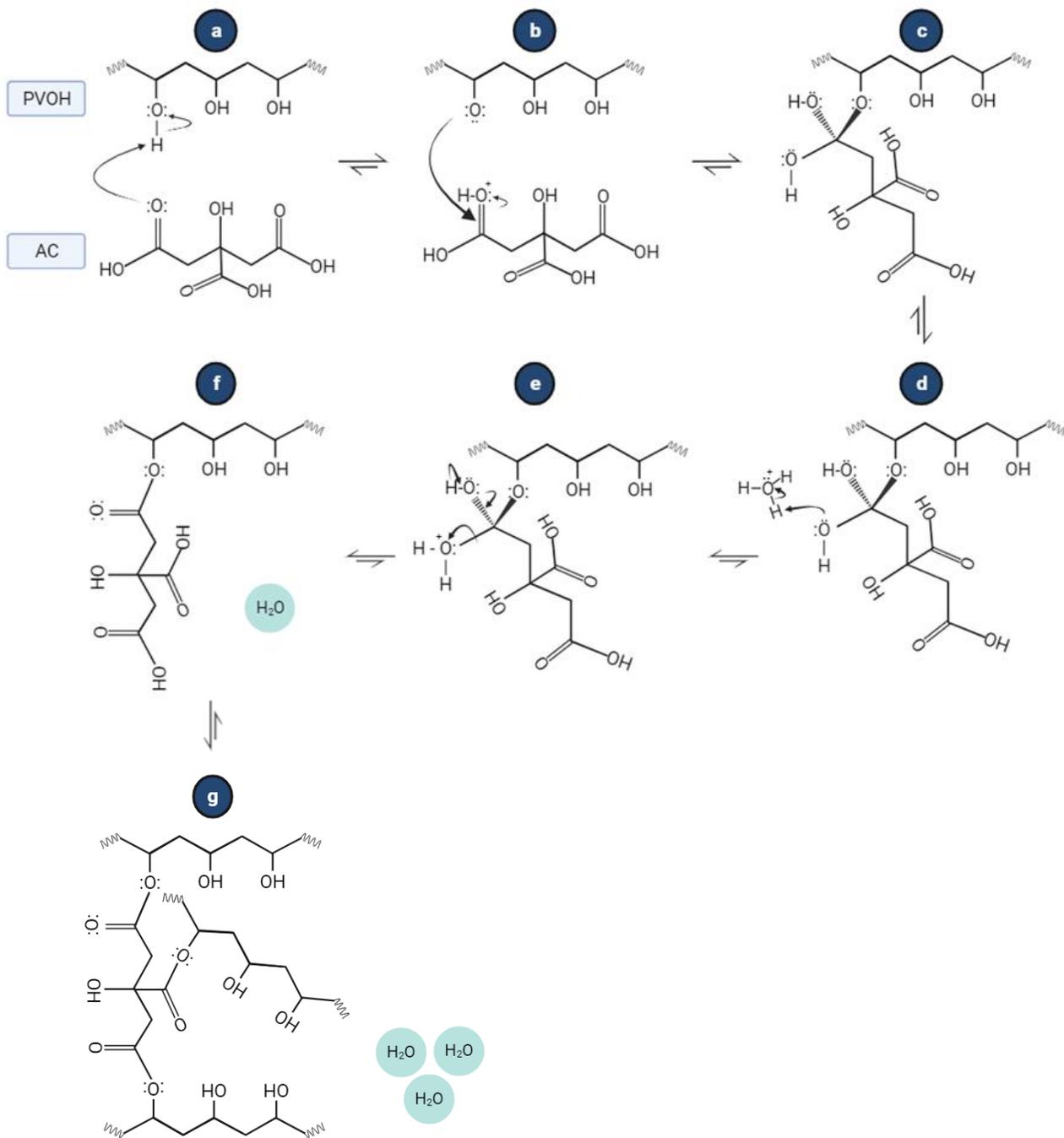


Figura 13. Mecanismo de reacción de la esterificación entre el PVOH y ácido cítrico donde se ve favorecido el entrecruzamiento de las cadenas. Los incisos son descritos a detalle en el Capítulo IV.

5.3.2 Efecto del entrecruzamiento en la estructura química del PVOH

Con el fin de determinar la formación de enlaces éster entre el ácido carboxílico y el PVOH, se realizó espectroscopía FTIR. En la Figura 14 se muestran los espectros del PVOH, AC, PVOH-AC 1:0.02 y PVOH-AC 1:0.08.

Los espectros de PVOH-AC 1:0.02 y PVOH-AC 1:0.08 presentan señales características del grupo funcional éster, destacándose la banda alrededor de 2940 cm^{-1} , la cual corresponde a la vibración de alargamiento del CH_2 cerca del carbonilo de éster. Además, se observan alteraciones en los grupos contiguos al grupo carbonilo que permiten confirmar que se llevó a cabo la esterificación de los grupos carboxílicos. Por ejemplo, es el caso de la banda en el rango de $1431\text{-}1435\text{ cm}^{-1}$ que es debida a la deformación asimétrica del enlace CH_2 , típica de los acetatos [68].

Otra señal importante es la banda en 1714 cm^{-1} , que se atribuye a la absorción debida a la frecuencia de alargamiento del carbonilo de éster ($\text{C}=\text{O}$). Asimismo, la banda en 1143 cm^{-1} se debe a la vibración de alargamiento del enlace $\text{C}-\text{O}$, mientras que la señal en 1093 cm^{-1} corresponde al alargamiento asimétrico del enlace $\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}$ [68].

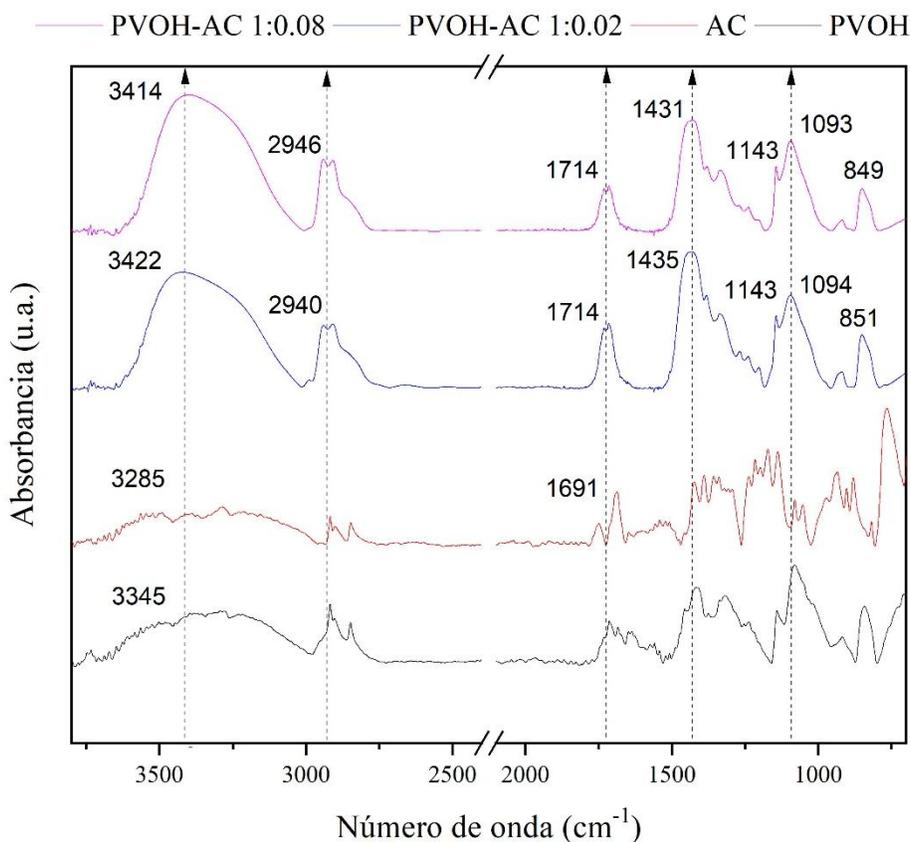


Figura 14. Espectros FTIR de PVOH, Ácido de cítrico, las soluciones de PVOH y AC en relación molar 1:0.02 y 1:0.08

Estas señales confirman la existencia exclusiva de grupos éster, sin presencia de ácido carboxílico, lo que implica que los carboxilos del ácido cítrico reaccionaron completamente para generar el entrecruzamiento.

Al realizar pruebas de inversión de fase mediante precipitación por inmersión con las soluciones mencionadas anteriormente, se observó que si hubo formación de membrana al sumergirse en el solvente teta por lo que se continuó la fabricación con estas formulaciones.

5.4 Notas finales del capítulo

La adición de ácido cítrico en relaciones molares bajas (1:1.02 y 1:1.08) favorece el entrecruzamiento de las cadenas de PVOH. Esto se debe a que la menor disposición de moléculas de ácido cítrico favorece la reacción de esterificación de los tres grupos carboxílicos de dicho ácido con los grupos hidroxilo del PVOH. Esta conclusión se respalda los resultados obtenidos mediante FTIR, en donde es evidente la presencia de señales atribuibles a ésteres en lugar de las señales asociadas al ácido carboxílico del ácido cítrico.

Además, las soluciones PA0.02 y PA0.08 se probaron en un baño de coagulación, donde se observó la formación de membranas.

Entrecruzamiento del PVOH- funcionalizado con glicerol

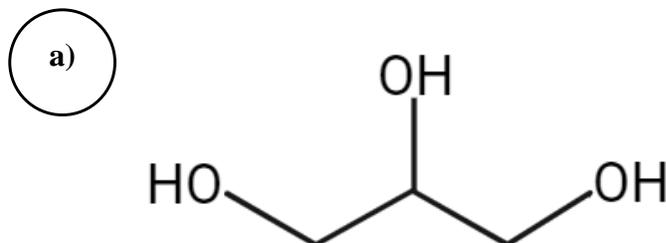
“People like what science gives them, but not the questions that science asks”

- Frankenweenie (2012)

6.1 Antecedentes

El glicerol está presente en los sistemas vivos y es esencial en muchas rutas metabólicas importantes en las células. Lo que lo convierte en un compuesto no tóxico y biodegradable, al igual que el ácido cítrico [62].

El glicerol es un monómero con alta funcionalidad, es decir, cuenta con 3 grupos hidroxilos que favorecen la generación de entrecruzamiento entre las cadenas (Figura 15). Por esta razón, se añadió glicerol como agente entrecruzante a las soluciones de PVOH funcionalizado. La presencia de grupos carboxílicos remanentes en el ácido cítrico permite una segunda esterificación con los hidroxilos del glicerol. Estas nuevas soluciones se evaluaron para confirmar la formación de membranas mediante el proceso de inversión de fases.



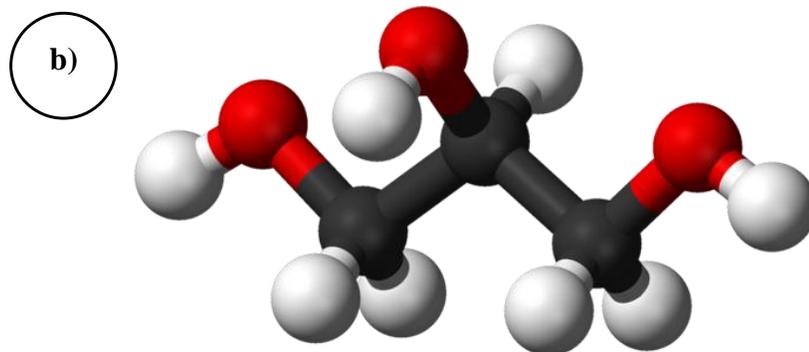


Figura 15. a) Fórmula estructural del glicerol, b) así como su modelo molecular.

6.2 Metodología

6.2.1 Entrecruzamiento con glicerol

Con base en los resultados de la curva de calibración, se tomó la decisión de llevar a cabo el entrecruzamiento con glicerol en las soluciones de PVOH:AC con relaciones molares de 1:1, 1:2 y 1:3. La inclusión del glicerol tiene como objetivo favorecer el entrecruzamiento, ya que durante las pruebas de inversión de fase se observó que un aumento en la cantidad de AC no resultaba en la formación de membrana, debido a la funcionalización y subsecuente alta solubilidad. Una vez preparadas las soluciones en las proporciones mencionadas se adicionó el glicerol en las relaciones molares 1.5, 2.5 y 3.5 con respecto al AC. Se realizó un diseño de experimentos (DOE) factorial para determinar el efecto del glicerol en las propiedades físicas, grado de entrecruzamiento y biodegradabilidad. A continuación, en la Tabla 5, se presentan los experimentos a realizar, de acuerdo con el DOE.

Tabla 5. Resultados del DOE factorial realizado para la cantidad de glicerol.

| Experimento | Relación molar PVOH:AC | Moles Glicerol |
|-------------|---------------------------|----------------|
| 1 | 1:1 | 1.5 |
| 2 | 1:1 | 2.5 |
| 3 | 1:1 | 3.5 |
| 4 | 1:2 | 1.5 |
| 5 | 1:2 | 2.5 |
| 6 | 1:2 | 3.5 |
| 7 | 1:3 | 1.5 |
| 8 | 1:3 | 2.5 |
| 9 | 1:3 | 3.5 |

La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 110°C, con agitación magnética constante durante 3 horas, y se agregó glicerol gradualmente durante la reacción.

6.2.2 Caracterizaciones fisicoquímicas

6.2.2.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de identificar si la reacción de esterificación se realizó en la cadena polimérica de PVOH se utilizó el espectrofotómetro ThermoScientific Nicolet iS10 con la técnica de reflectancia total atenuada (ATR).

Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente en un intervalo de número de onda de 550 - 4000 cm^{-1} , con 32 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Mecanismo de reacción del entrecruzamiento con glicerol del PVOH previamente funcionalizado con ácido cítrico

El mecanismo de reacción del entrecruzamiento entre el glicerol y el ácido cítrico unido a la cadena de PVOH sigue los mismos pasos descritos en el capítulo IV para la funcionalización del PVOH, ya que se trata de la reacción entre un alcohol y un ácido carboxílico. En el paso g se muestra que la esterificación ocurre en uno de los dos ácidos carboxílicos restantes del ácido cítrico. El glicerol, al tener tres grupos hidroxilo disponibles, puede unirse a otros grupos carboxilo de diferentes cadenas funcionalizadas o de la misma cadena.

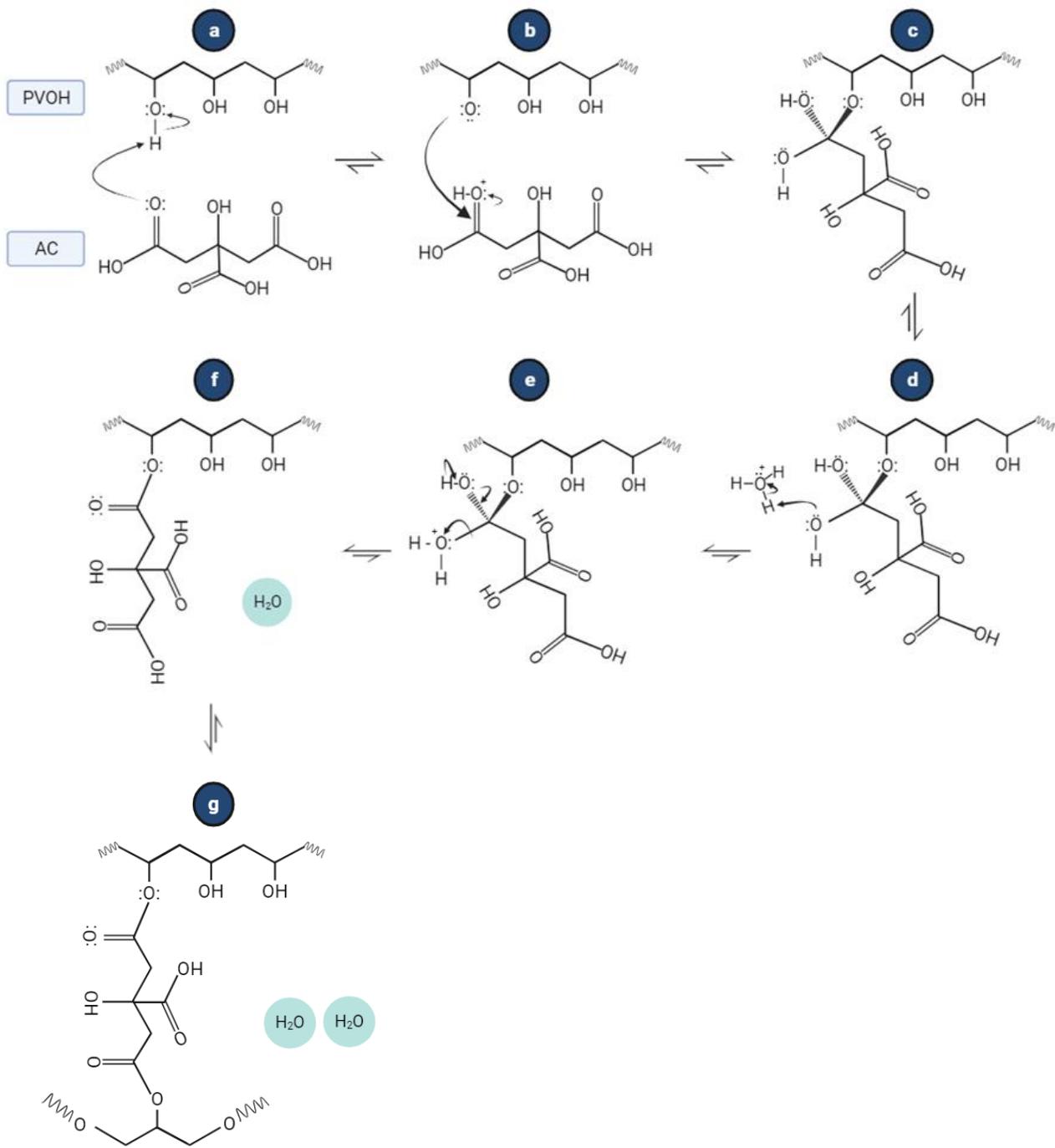


Figura 16. Mecanismo de reacción de la esterificación entre el PVOH y ácido cítrico, seguido de su entrecruzamiento con glicerol. Los incisos son descritos a detalle en el Capítulo IV.

6.3.2 Efecto del entrecruzamiento con glicerol en la estructura química del PVOH

Con el fin de determinar la formación del entrecruzamiento con el glicerol y la cadena PVOH funcionalizada, se realizó espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier. En la Figura 17 se muestran los espectros del PVOH, AC, Glicerol, PVOH-AC-Glicerol 1:1:1.5 y PVOH-AC-Glicerol 1:3:3.5.

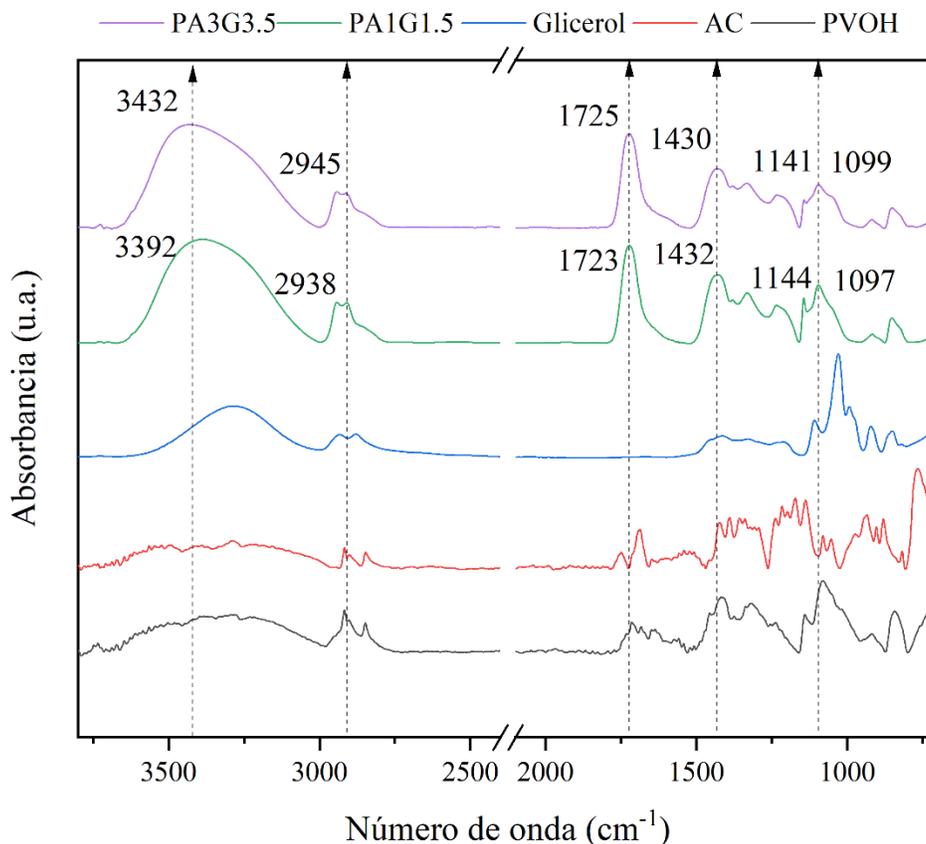


Figura 17. Espectros FTIR de PVOH, Ácido de cítrico, Glicerol, las soluciones de PVOH, AC y Glicerol en relación molar 1:1:1.5 y 1:3:3.5.

Considerando que ocurren dos esterificaciones, se espera observar señales características del grupo funcional éster, destacándose la banda alrededor de 2940 cm^{-1} , la cual corresponde a la vibración de alargamiento del CH_2 cerca del carbonilo de éster. Además, se observan alteraciones en los grupos contiguos al grupo carbonilo que permiten confirmar que se llevó a cabo la esterificación de los grupos carboxílicos. Por ejemplo, es el caso de la banda en el rango de $1431\text{-}1435\text{ cm}^{-1}$ que es debida a la deformación asimétrica del enlace CH_2 , típica de los acetatos [68].

Otra señal importante es la banda en 1725.1723 cm^{-1} , que se atribuye a la absorción debida a la frecuencia de alargamiento del carbonilo de éster ($\text{C}=\text{O}$). Asimismo, la banda en 1144-

1141 cm^{-1} se debe a la vibración de alargamiento del enlace C-O, mientras que la señal en 1099-1097 cm^{-1} corresponde al alargamiento asimétrico del enlace O-CH₂-C [68].

Estas señales confirman la existencia de grupos éster sin presencia de ácido carboxílico, lo que indica que los carboxilos del ácido cítrico reaccionaron completamente para generar el entrecruzamiento tanto con la cadena de PVOH como con el glicerol.

Al realizar pruebas de inversión de fase mediante precipitación por inmersión con las soluciones que contenían glicerol se observó que solo algunas de ellas (ver Tabla 5) formaron membrana al sumergirse en el solvente teta. Las soluciones que lograron formar membranas se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 6. Soluciones con glicerol que dieron a la formación de membranas

| Membrana | Relación molar PVOH:AC | Moles Glicerol |
|----------|---------------------------|----------------|
| 1 | 1:1 | 1.5 |
| 2 | 1:1 | 2.5 |
| 3 | 1:1 | 3.5 |
| 4 | 1:2 | 2.5 |
| 5 | 1:2 | 3.5 |
| 6 | 1:3 | 1.5 |

La no formación de membranas puede deberse a que las propiedades del PVOH, el reactivo que realmente forma la membrana se ven afectadas por la mayor presencia de otros reactivos. Todas las membranas con una relación 1:1 PVOH:AC y un exceso de glicerol lograron formarse, lo que indica que hubo interacción entre todos los reactivos para generar el entrecruzamiento. Por otro lado, en la solución con una relación 1:2:1.5 PVOH:AC:Glicerol, la falta de formación de membrana puede deberse a la mayor proporción de ácido cítrico, lo que mantiene una alta solubilidad en la solución. Esto contrasta con las relaciones molares 1:2:2.5 y 1:2:3.5, en las cuales sí se observó la formación de membranas, posiblemente debido a que el exceso de ácido cítrico reaccionó. Finalmente, en el caso donde la cantidad molar de ácido cítrico es alta (3 molar), solo se observó la formación de membrana con una relación molar de 1.5 para el glicerol. Es posible que, a mayores cantidades molares, el excedente sea tal que la cadena polimérica, en lugar de entrecruzarse, quede simplemente mezclada.

6.4 Notas finales del capítulo

La adición excesiva de glicerol favorece la generación de una segunda esterificación de los grupos carboxílicos que pudieran quedar libres. Esta conclusión se respalda en los resultados obtenidos mediante FTIR, donde es evidente la presencia de señales atribuibles a ésteres en lugar de las señales asociadas al ácido carboxílico del ácido cítrico. Además, las soluciones con glicerol fueron sometidas a pruebas en un baño de coagulación, donde se observó que no todas las soluciones lograron formar membranas. Esto sugiere en algunas relaciones, el

glicerol no solo influye en el entrecruzamiento, sino que también puede afectar la capacidad de formación de membranas, posiblemente debido a un aumento en la solubilidad de la solución.

Preparación de membranas

“If you are tired of membranes, you are tired of life”

- Richard Bowen

7.1 Antecedentes

Las membranas utilizadas en hemodiálisis se consideran el tipo de membranas más importantes para aplicaciones biomédicas, siendo el segundo campo más grande de uso de membranas a nivel mundial, solo por debajo de la desalinización de agua [29]. Por lo tanto, se utilizarán las soluciones sintetizadas de PVOH modificado para fabricar las membranas correspondientes y proceder a su evaluación biológica.

Las membranas de hemodiálisis fabricadas de PVOH:AC y PVOH:AC:Glic deben cumplir con una separación eficiente, así como una alta biocompatibilidad y hemocompatibilidad. Esta última característica es especialmente crucial, ya que es un requisito indispensable para este tipo de membranas debido a su uso específico. Este capítulo se centra en la fabricación de las membranas densas junto con la membrana electrohilada para crear un medio filtrante. Inicialmente, se realizaron caracterizaciones biológicas que permitieron descartar las soluciones que no cumplían con los requisitos de biocompatibilidad y hemocompatibilidad según las normas correspondientes. Posteriormente, se procedió a la caracterización fisicoquímica del material para determinar sus propiedades térmicas, superficiales y de absorción de agua.

7.2 Metodología

7.2.1 Preparación de membrana densa

Para la preparación de las membranas densas se utilizó la técnica por inversión de fase mediante precipitación por inmersión. Las soluciones acuosas de PVOH:AC o PVOH:AC:Glic se vertieron sobre placas de vidrio a temperatura ambiente (~20°C) y se distribuyó con ayuda de una varilla de vidrio. Inmediatamente, la solución sobre la placa de vidrio se sumergió en un baño de coagulación que contenía acetona como solvente teta [69]. Las películas resultantes se mantuvieron sumergidas en el baño de coagulación hasta que se desprendieron de la placa de vidrio, momento en el cual se retiraron con pinzas y se colocaron en platos de teflón.

7.2.2 Capa superior electrohilada

Las membranas densas obtenidas se dispusieron sobre el papel de aluminio, el cual se utilizó como soporte para la recolección de las fibras electrohiladas. Las soluciones se electrohilaron utilizando el equipo TL-01 marca Tong Li Tech. El montaje consistió en una punta de calibre 7 G, una jeringa de 20 mL, una bomba de jeringa (SINO MDT SN-50F6), un colector de tambor giratorio y una fuente de alto voltaje. Se aplicó un voltaje de 20 kV con un flujo de 0.5 mL/h, manteniendo una distancia de 15 cm entre la punta y el colector, una velocidad del rotor fue de 300 rpm y un desplazamiento axial de 13.2 mm/s [70].

7.2.3 Post-tratamiento térmico

El proceso de post-tratamiento térmico se realizó utilizando la termobalanza Ohaus MB45-2A0. Para determinar la temperatura óptima, se llevó a cabo un diseño experimental factorial que evaluó las temperaturas de 110°C y 120°C durante tiempos de 1, 1.5 y 2 horas. Las diferentes combinaciones de estas variables se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados del DOE factorial

| Experimento | Temperatura | Tiempo |
|-------------|-------------|--------|
| 1 | 110 | 1.0 |
| 2 | 110 | 1.5 |
| 3 | 110 | 2.0 |
| 4 | 120 | 1.0 |
| 5 | 120 | 1.5 |
| 6 | 120 | 2.0 |

7.2.4 Caracterización biológica

7.2.4.1 Prueba de citotoxicidad. Ensayo MTT.

La evaluación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante el ensayo MTT conforme a la norma ISO 10993-5:2009 titulada “Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity” [71]. Se usaron fibroblastos (3T3-P6) como línea celular en concordancia con la norma ISO, los cuales fueron cultivados en una placa de microcultivo de 96 pozos en una concentración de 5×10^5 células/pozo en medio DMEM 1X. Una vez sembradas, las células se incubaron durante 24 horas a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Figura 18).

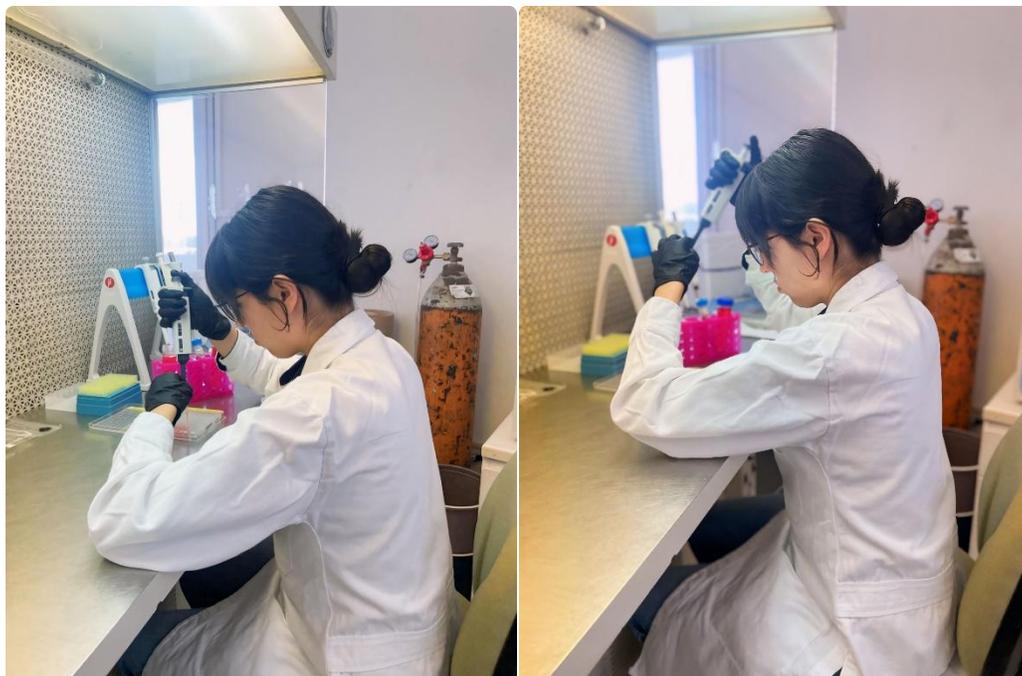


Figura 18. Ejecución de la prueba de citotoxicidad. Se procede a colocar medio celular en una placa de 96 pozos.

Cada muestra se replicó dos veces y se dividió la placa en 11 grupos: control negativo, control positivo, blanco, PA0.02, PA0.08, PA1G1.5, PA1G2.5, PA1G3.5, PA2G2.5, PA2G3.5 y PA3G1.5. Posteriormente, se midió la absorbancia utilizando MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. Este compuesto actúa como indicador de viabilidad en un ensayo colorimétrico basado en la actividad metabólica de las células expuestas al material en estudio. Durante el proceso, el MTT que inicialmente es de color amarillo se reduce a Formazán que es color violeta en presencia de células metabólicamente activas. La cantidad de Formazán se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. (Figura 19).

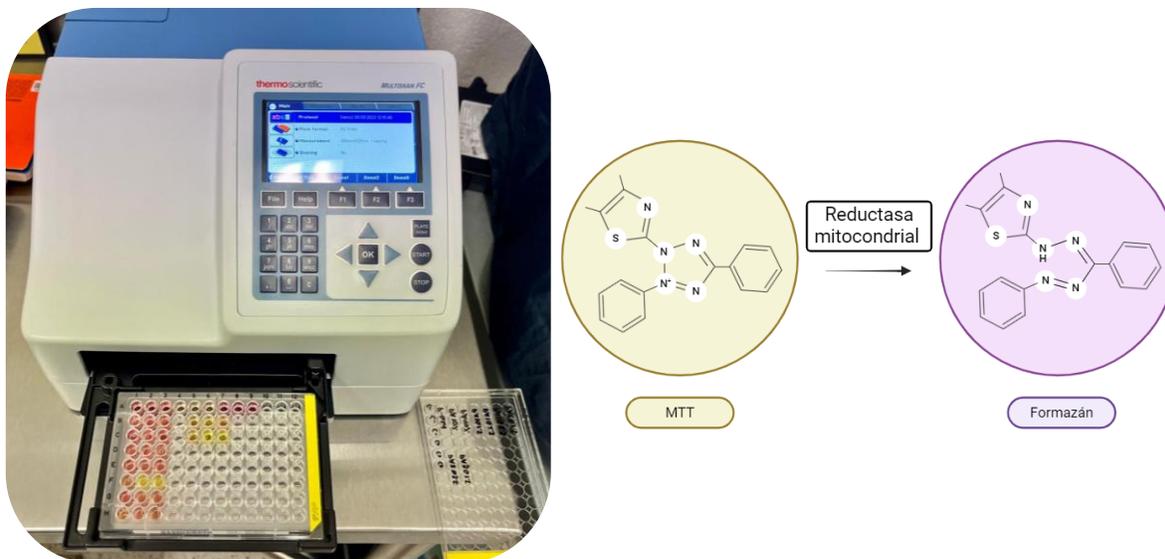


Figura 19. Para la medición de las absorbancias se utilizó el fotómetro para microplacas Multiskan FC de la marca Thermo Scientific. La formación de formazán es debido a la reacción de oxidación que experimenta el MTT en la presencia de la reductasa mitocondrial que se encuentra en células metabólicamente vivas.

7.2.4.2 Prueba de hemocompatibilidad: Hemólisis.

La hemocompatibilidad de las membranas fabricadas se evaluó mediante un ensayo de hemólisis, el cual se llevó a cabo siguiendo la norma Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials (ASTM F756-17). La preparación de las membranas para el ensayo consistió en cortarlas en dimensiones de 1 x 1 cm (Figura 20). Luego, se preparó una solución de eritrocitos y PBS (pH 7.2) en una relación de 1:50, y se colocaron 8 mL de esta mezcla en tubos cónicos Eppendorf de 15 mL para cada muestra. En relación con los controles, el blanco se preparó exclusivamente con PBS, el control positivo contenía PBS con Tritón X-100 y el control negativo consistió en la solución de eritrocitos. El control positivo es considerado 100 % hemolítico y el control negativo es 0 % hemolítico.



Figura 20. Ejecución de la prueba de hemólisis. Los tubos Falcon contienen la solución de eritrocitos en presencia de los materiales a evaluar.

Las muestras fueron sumergidas en los respectivos tubos con la solución eritrocitaria y se incubaron durante 3 horas a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Todos los tubos se invirtieron gentilmente cada 30 minutos. Al final de la incubación se centrifugó cada tubo a 700 G durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se midió la absorbancia a 540-541 nm utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop. El porcentaje de hemólisis se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Hemólisis} = \frac{\text{absorbancia muestra} - \text{absorbancia negativo}}{\text{absorbancia positiva} - \text{absorbancia negativo}} \times 100$$

7.2.4.3 Coagulación

Se evaluó la agregación plaquetaria con el fin de determinar si las membranas fabricadas inducen la formación de coágulos. Esto se determinó mediante turbidimetría, el cual es un método que se basa en medir la densidad óptica de la agregación de plaquetas cuando el material de estudio se expone a plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP). Los resultados obtenidos se compararon con las evaluaciones realizadas cuando el material se expone a PRP y PPP que contiene una sustancia agonista como es la colágena.

La preparación de las membranas para el ensayo consistió en cortarlas en dimensiones de 0.5 x 0.5 cm. Para obtener el PRP y PPP, se tomaron dos muestras de sangre en tubos de citrato de sodio al 3.2% como anticoagulante, con una proporción de 9 partes de sangre venosa por una parte de anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 1 500 rpm durante 5 minutos, y

el sobrenadante, que contiene el PRP, se extrajo y se colocó en un tubo de Falcón. El resto del paquete globular se centrifugó nuevamente a 3 500 rpm durante 10 minutos para obtener PPP.

Una vez obtenidos el PPP y el PRP, los tubos en los que se colocaron se protegieron de la luz, no se agitaron ni se expusieron a cambios bruscos de temperatura para prevenir alteraciones en las plaquetas que puedan afectar los resultados del ensayo (ver Figura 21). Por cada tipo de membrana se utilizaron en total 4 tubos Falcón. En los primeros dos tubos se colocaron 1 mL de PRP o PPP junto con 1 mL de agua estéril inyectable. En los otros dos tubos se colocaron 1 mL de PRP o PPP junto con 1 mL de colágena. La exposición al material fue de 30 minutos y posteriormente se realizaron las lecturas en el turbidímetro Modelo 2D-2A [72], [73], [74].

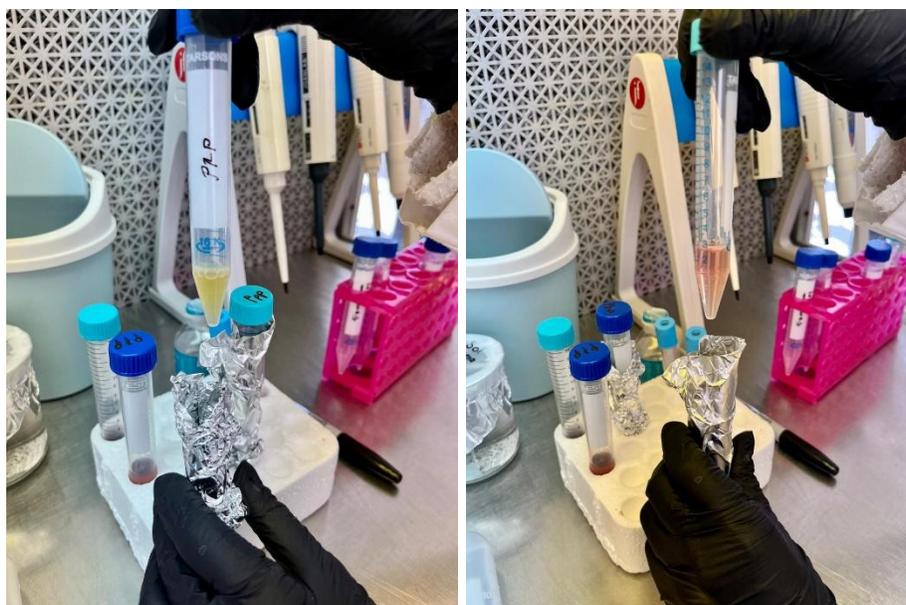


Figura 21. Ejecución de la prueba de coagulación. Tubos Falcón con las muestras de plasma rico en plaquetas (PRP) (tubo izquierdo) y plasma pobre en plaquetas (PPP) (tubo derecho).

7.2.5 Caracterización térmica

7.2.5.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) es ampliamente utilizada en la caracterización de materiales debido a su capacidad para evaluar cambios en las propiedades térmicas. El procedimiento experimental utilizado en el análisis DSC con el equipo Q200 de TA Instruments se describe a continuación. Las muestras fueron calentadas en un intervalo de temperatura de -50 a 300°C a una velocidad de calentamiento de $20\text{ min}/^{\circ}\text{C}$ y luego enfriadas a temperatura ambiente. Se repitieron dos ciclos de calentamiento y enfriamiento por muestra, utilizando nitrógeno como gas de purga a una velocidad de flujo de $50\text{ mL}/\text{min}$.

7.2.6 Caracterización superficial

7.2.6.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el objetivo de examinar la morfología de las capas, tanto densa como electrohilada, las muestras generadas se observaron utilizando Microscopía Electrónica de Barrido en el equipo FEI-ESEM QUANTA 250 utilizando un alto vacío. Las muestras se montaron sobre un pin de aluminio con tintura de plata y posteriormente, fueron recubiertas con oro durante 60 segundos. La sección transversal de las membranas se observó haciendo un corte criogénico y se montaron en pines verticales utilizando cinta de carbono.

Las imágenes se procesaron utilizando el programa ImageJ 1.54g para determinar el diámetro de la fibra, el tamaño de los poros y el espesor de las membranas. Para medir el diámetro de la fibra, se analizaron imágenes de SEM con una magnificación de 20 000x, obteniendo aleatoriamente 450 mediciones por membrana. En cuanto al tamaño de los poros, se realizaron 200 mediciones aleatorias en imágenes de SEM con una magnificación de 10 000x para las membranas que contenían únicamente ácido cítrico. Para la membrana con glicerol, se utilizaron imágenes con una magnificación de 2 500x debido al mayor tamaño y menor distribución de los poros. Finalmente, para medir el espesor de las membranas, se llevaron a cabo 100 mediciones aleatorias por membrana en imágenes con una magnificación de 600x.

7.2.6.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El análisis de AFM de las membranas de PVOH modificado se realizó utilizando el microscopio de fuerza atómica Bruker, modelo X. La preparación de la muestra consistió en recortar las membranas a dimensiones de 1 x 1 cm y colocarlas en el soporte metálico con cinta doble cara, para minimizar los cambios superficiales que podrían afectar el proceso de escaneo. Se utilizó el modo de contacto con un área de escaneo de 25 x 25 μm .

7.2.6.3 Determinación de la porosidad

La determinación de la porosidad se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Liu *et al* [75]. Las membranas se cortaron en fragmentos de peso similar, los cuales se registraron como W_m y se secaron en la termobalanza Ohaus MB45-2A0 a 80°C durante 1 hora. Se utilizaron vasos de precipitados de 50 mL, los cuales se pesaron vacíos, registrado este peso como W_1 . A continuación, se añadió el fragmento de membrana y se incorporó acetona como solvente inerte (densidad $\rho_h=0.792 \text{ g/cm}^3$) registrando el peso de todo el sistema como W_2 . Para asegurar la eliminación del aire de los poros de la membrana, se sometió la solución a ultrasonido durante 5 minutos. Después, se retiraron las membranas de la acetona y se pesaron, obteniendo el peso W_3 . De este modo, el volumen de acetona corresponde al volumen de los poros en las membranas. La porosidad (P) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones.

$$V_g = 50 - \frac{W_2 - W_1 - W_m}{\rho_h}$$

$$\rho_g = \frac{W_m}{V_g}$$

$$V_p = \frac{W_2 - W_3 - W_m}{\rho_h}$$

$$P = \frac{V_p}{V_p + V_g}$$

Donde ρ_g es la densidad de la membrana (g/cm^3), V_g es el volumen de la membrana (cm^3) y V_p es el volumen de la acetona en los poros (cm^3). Se realizaron tres réplicas para cada membrana.

7.2.7 Caracterización de la hidrofiliidad

7.2.7.1 Ángulo de contacto

Para determinar la naturaleza hidrofílica de las membranas, se llevaron a cabo mediciones de ángulo de contacto utilizando el Goniómetro marca Biolín Scientific modelo Theta Lite. Las fotografías fueron capturadas con el software de imagen One Attention. Se cortaron segmentos de membranas con doble capa en dimensiones de aproximadamente $0.5 \times 0.5 \text{ cm}$ y se agregó una gota de agua desionizada ($3 \mu\text{l}$) a temperatura ambiente mediante una jeringa [48], [76], [77]. Las mediciones de ángulo de contacto para todas las membranas se realizaron en el fotograma correspondiente a 4 segundos después de depositar la gota. Se utilizó el programa ImageJ 1.54g con el método Low-Bond Axisymmetric Drop Shape Analysis for Surface Tension and Contact Angle Measurements of Sessile Drops (LBADSA) el cual se basa en la ecuación de Young-Laplace para la medición del ángulo de contacto y tensiones superficiales [78]. Se realizaron diez réplicas para cada membrana y los valores promedio fueron reportados.

7.2.7.2 Porcentaje de absorción de agua

Para determinar la cantidad de agua que pueden absorber las membranas, se cortaron tres pedazos del material del mismo peso. Las membranas se secaron durante 1 hora a 80°C en la termobalanza Ohaus MB45-2A0. Después del secado, se dejaron durante 10 minutos en el desecador. Las membranas secas se sumergieron en 50 mL de agua desionizada a un pH de 7.35-7.45, que corresponde al pH de la sangre de acuerdo con la literatura [79]. El peso de las membranas hidratadas se midió cada 2 minutos hasta mostrar un peso estable. Antes de pesarlas, se sacudió el exceso de agua de la superficie de las membranas. La relación entre el peso de la membrana hidratada y el peso de la membrana seca se define como grado de hinchamiento, el cual se determina a partir de la siguiente expresión:

$$\% \text{ Absorción de } H_2O = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100\%$$

Donde W_h es el peso de la membrana hidratada y W_s es el peso de la membrana seca. El grado de hinchamiento se llevó a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. La gráfica se realizó en el programa *Origin*.

7.2.8 Desempeño

7.2.8.1 Permeabilidad

Los ensayos de permeación en la celda de Franz son un primer paso para determinar si las especies de interés (ácido úrico, creatinina y urea) son separadas por las membranas. Se cortaron fragmentos de membrana de 47 mm de diámetro, los cuales se colocaron entre el compartimiento donador y el receptor de la celda. Las celdas de difusión de Franz cuentan con un volumen de 75 mL en el compartimiento receptor, en este compartimiento se añadió buffer de fosfato salino (PBS) con un pH de 7.4 manteniéndose a una temperatura de $37 \pm 1.00^\circ\text{C}$ y con una agitación constante de 100 rpm (ver Figura 22). Después de colocar la membrana que separa ambos compartimientos, se añadió el medio donador, compuesto por una solución de suero:PBS en proporción 1:5, con un volumen aproximado de 5 mL. El suero fue obtenido de muestras de sangre humana sin padecimientos renales registrados. Se tomaron alícuotas de 0.5 mL del compartimiento receptor en intervalos de 15 minutos (15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos), reponiendo el medio en el compartimiento receptor con PBS después de cada extracción [80], [81]. Debido a la cantidad de suero disponible en las muestras de sangre, se realizó una repetición por membrana.

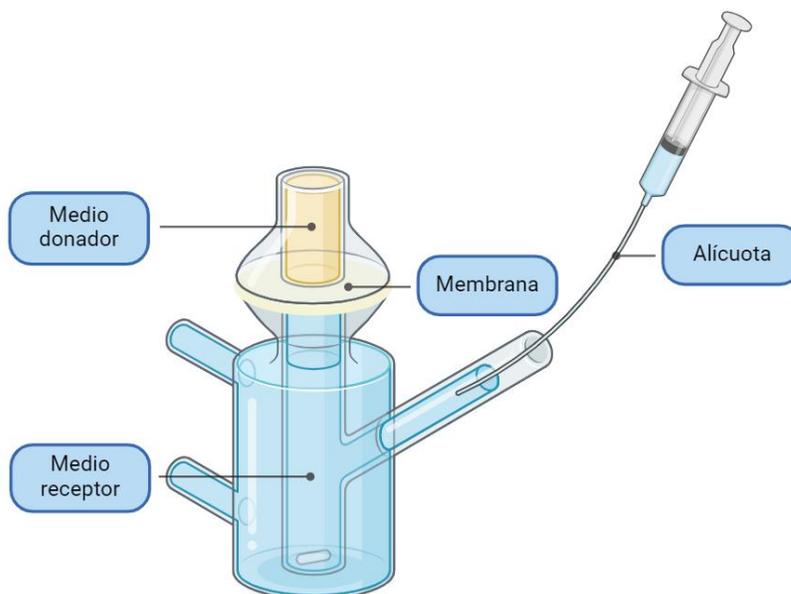


Figura 22. Esquema de la celda de Franz (elaboración propia).

La cuantificación de los analitos ácido úrico, creatinina y urea en las alícuotas se llevó a cabo utilizando la metodología de química seca mediante tiras reactivas para la prueba de función renal. Los resultados fueron graficados utilizando el programa *Origin*.

7.2.9 SEM: Caracterización de membranas empleadas en la evaluación de eficiencia con celda de Franz.

Las membranas utilizadas en la celda de Franz se observaron bajo Microscopía Electrónica de Barrido en el equipo FEI-ESEM QUANTA 250 a alto vacío. Las muestras se montaron sobre un pin de aluminio con tintura de plata y posteriormente, fueron recubiertas con oro durante 60 segundos. También se realizó un estudio de la composición química semicuantitativa con la técnica de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Preparación de membranas

Como se detalló en los capítulos anteriores, se observó que las soluciones con relaciones molares bajas de AC (0.02 y 0.08) sí formaban membranas, mientras que las soluciones con altas relaciones molares de AC no lo hacían. Que no se puedan formar películas se atribuye al exceso de ácido cítrico, el cual promueve mayoritariamente la funcionalización, y no necesariamente el entrecruzamiento de la cadena de PVOH, y como consecuencia, una cantidad considerable de grupos carboxilo permanecen libres aumentando la capacidad de solvatación. Con base en esto, se propuso la adición de glicerol como agente entrecruzante mediante una segunda esterificación. Para ello, se hizo un diseño de experimentos factorial (DOE) para evaluar el efecto del glicerol y el ácido cítrico (Tabla 5).

En cuanto la apariencia de las membranas, en general presentan una coloración blanquecina; sin embargo, aquellas que contienen glicerol tienden a ser mayormente traslúcidas. Todas las membranas son flexibles y muestran resistencia al agua (no se disolvieron) después de haber sido térmicamente tratadas durante 1 hr a 110°C (Figura 23).



Figura 23. Fotografía de membranas densas del DOE mostrado en la Tabla 5.

7.3.2 Citotoxicidad

La compatibilidad de las membranas preparadas es un parámetro crítico debido a que es un material que se pretende utilizar en contacto con sangre, el cual es un fluido que comprende de células sanguíneas. Para evaluar esto, se determinó la absorbancia del medio celular expuesto al material utilizando el ensayo MTT. Se utilizó la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3 y se expuso a las diferentes membranas durante 24 horas. Para considerar que un material no es citotóxico, se busca la formación de formazán, que se genera a partir de la reducción de sales de tetrazolio como el MTT, proceso que solo ocurre en presencia de células metabólicamente activas, ver Figura 24.

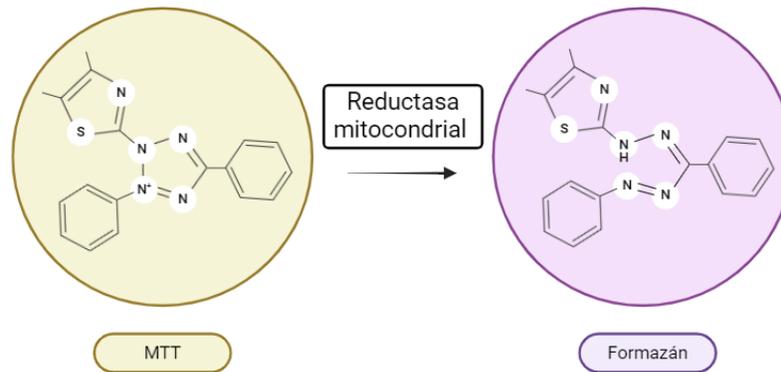


Figura 24. La formación de formazán se debe a la reacción de oxidación que experimenta el MTT en presencia de la reductasa mitocondrial, presente en células metabólicamente activas (elaboración propia).

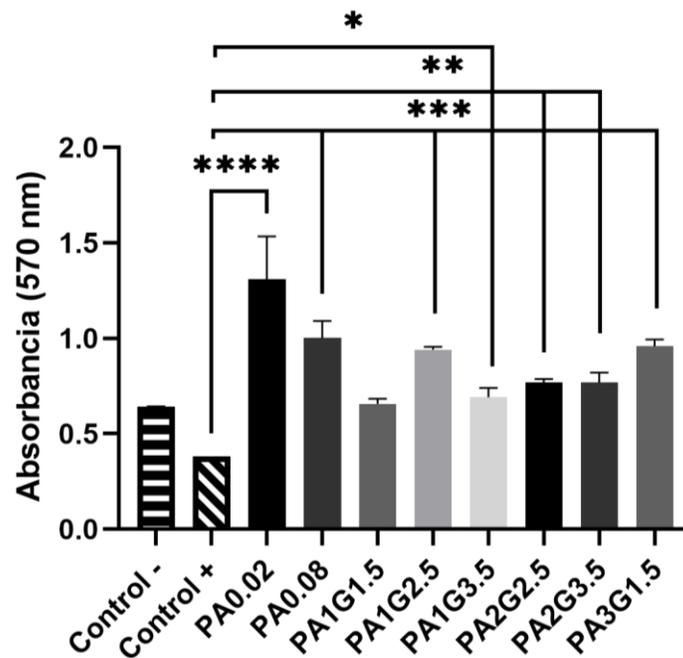


Figura 25. Absorbancias promedio con su desviación Estándar (SD, por sus siglas en inglés) (n=2). Significancia estadística: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

En la Figura 25 se muestra el análisis estadístico de los datos, se utilizó el software GraphPad Prism 9, utilizando una prueba ANOVA con comparaciones múltiples. Se estableció un nivel de significancia alfa del 95% de confianza con un valor de P de 0.05. Se compararon las absorbancias de todas las membranas evaluadas con el control negativo, que mostró una absorbancia de 0.64, y el control positivo que contenía un agente citotóxico, con una absorbancia de 0.38.

Las membranas que presentaron mayor absorbancia fueron PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5, con valores de 1.31, 1.00 y 0.94, respectivamente. Los valores para estas membranas fueron significativamente superiores al control negativo, lo que sugiere que se favoreció la proliferación celular. Incluso en el peor de los casos, la absorbancia no decayó al mismo valor del control positivo.

Estos resultados sugieren que las membranas fabricadas con la menor cantidad de ácido cítrico favorecen la biocompatibilidad. En cuanto a la proporción de glicerol, se observó que biológicamente es más benéfica con la relación molar 1:2.5 de AC:Glic.

7.3.3 Hemólisis.

La hemólisis se define como la ruptura de eritrocitos, y por consecuencia, la liberación de su contenido en el medio circundante. El porcentaje de hemólisis refleja la proporción de glóbulos rojos que se hemolizan al entrar en contacto con el material en evaluación [82].

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el software GraphPad Prism 9, utilizando una prueba ANOVA con comparaciones múltiples. Se estableció un nivel de significancia alfa del 95% de confianza con un valor de P de 0.05.

Los porcentajes de hemólisis obtenidos para la serie de membranas fabricadas con ácido cítrico y/o glicerol se presentan en la Figura 26b los valores que se encuentran por debajo del 5 % de hemólisis, el cual representa el límite establecido por la norma ASTM F756-17 para que un material se considere no hemolítico.

Los gráficos revelan que las membranas PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5 se sitúan dentro de este intervalo, siendo la membrana PA0.02 clasificada como no hemolítica (0-2 %) y las membranas PA0.08 y PA1G2.5 ligeramente hemolíticas (2-5%) [83].

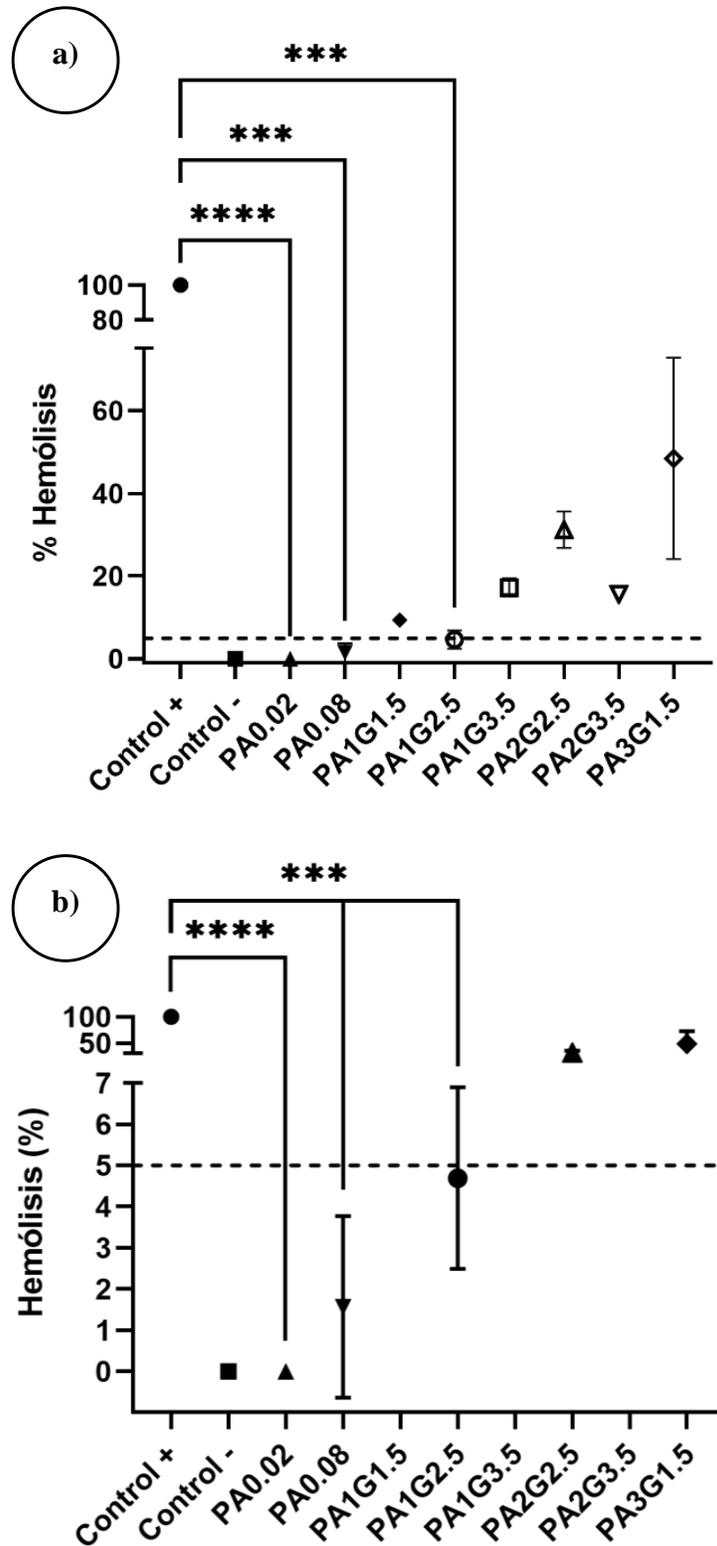


Figura 26. Los datos son expresados como Promedio \pm Desviación Estándar (SD) (n=2). Significancia estadística: *P < 0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001. a) Se muestra el porcentaje de hemólisis para todas las muestras; b) se hace un zoom a la gráfica para destacar aquellas que están por debajo del 5% de hemólisis de acuerdo con lo descrito por la norma ASTM F756-17.

7.3.4 Coagulación

Cuando ocurre una lesión tisular se activa la repuesta hemostática que comprende un proceso complejo el cual regula la activación de proteínas de coagulación, plaquetas y componentes de la pared vascular para formar tapones hemostáticos y trombos oclusivos que detengan el sangrado [84]. Los eventos que suceden se pueden englobar en tres fases: iniciación, extensión y estabilización. Durante la fase de iniciación, las plaquetas que circulan son reclutadas al sitio de la lesión a través de interacciones adhesivas entre el factor de von Willebrand (vWf) unido a las fibras de colágeno en la pared del vaso y el complejo receptor GPIb-IX-V de las plaquetas. En la fase de extensión, se reclutan plaquetas adicionales de la circulación para formar un agregado plaquetario mediante la cohesión plaqueta-plaqueta. Una vez formado el tapón hemostático deben condensarse y anclarse firmemente en el sitio de lesión para resistir la fuerza de la sangre en movimiento y prevenir una nueva hemorragia [84].

Las plaquetas son componentes cruciales de la sangre y su principal función es detener el sangrado después de una lesión en los vasos sanguíneos. Las plaquetas son fragmentos pequeños de 2 a 3 μm [85]. De todas las respuestas funcionales plaquetarias, la agregación es probablemente la más ampliamente investigada [86]. Cuando se produce una interrupción en el endotelio, las plaquetas se acumulan en el sitio de lesión del vaso sanguíneo, a esto se le conoce hemostasis primaria y sigue los procesos detallados anteriormente. La hemostasia primaria es seguida por un proceso secundario que implica la activación de la cascada de coagulación con la deposición de fibrina, la cual estabiliza el trombo inicial [85].

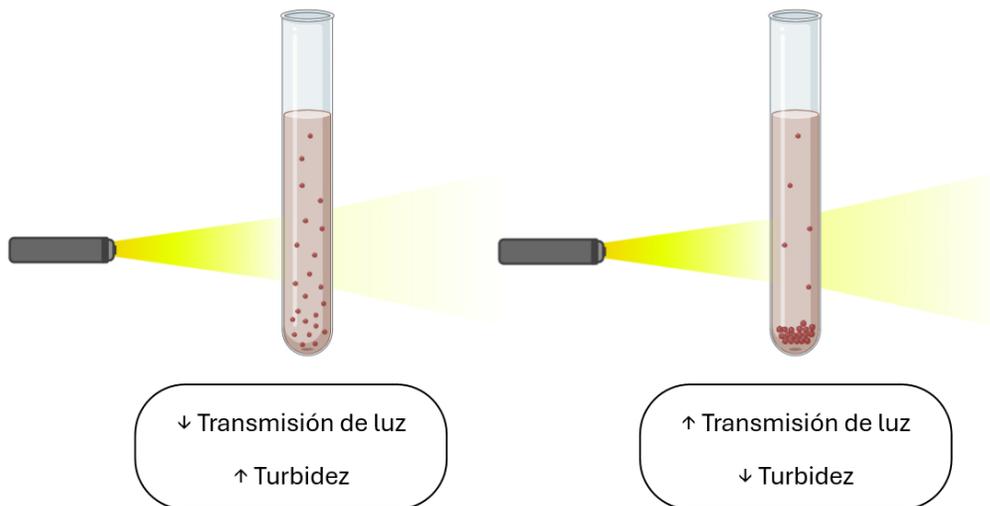
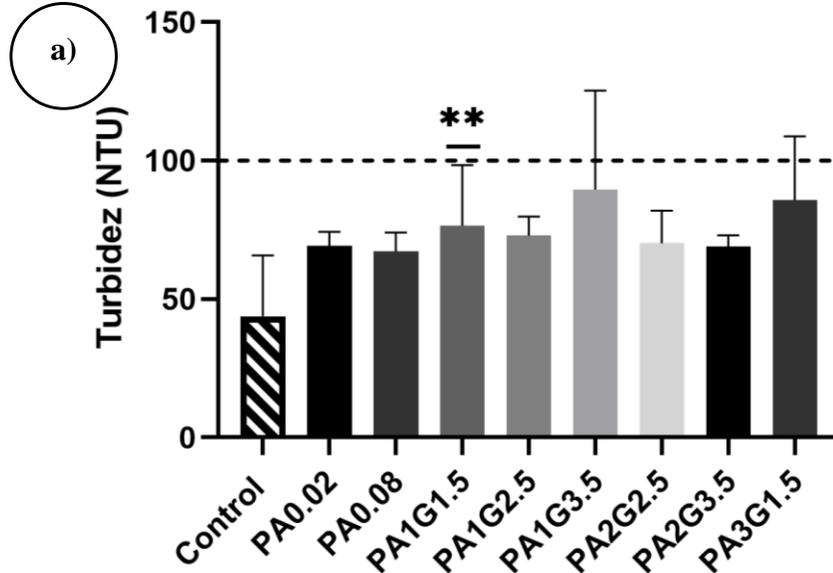


Figura 27. Esquema donde la imagen de la izquierda ejemplifica la falta de transmisión de la luz a través de plasma sin agregación plaquetaria (turbio) y la imagen de la derecha, el caso donde se induce la agregación plaquetaria de grandes conglomerados, esto permite el paso de la luz y se considera como una disminución en la turbidez (elaboración propia).

Para la medición de la agregación plaquetaria se utilizó el método turbidimétrico, en el cual la cantidad de luz transmitida depende de la suspensión de plaquetas, esto proporciona una medida de la densidad óptica de la suspensión [86]. De acuerdo con la literatura, la turbidez de partículas pequeñas es directamente proporcional a su masa, pero a medida que se forman agregados más grandes, puede producirse una disminución de la turbidez (Figura 27) [87]. Es así como el sistema de detección óptica se basa en cambios de la medición de la turbidez como un cambio en la luz transmitida, lo cual es proporcional a la extensión de la agregación plaquetaria inducida por la adición de un agonista [88].

Los agonistas más utilizados en las pruebas in vitro son el ADP, la colágena, la epinefrina y el ácido araquidónica y lo que hacen es simular la agregación plaquetaria. En particular, la colágena es un componente del subendotelio de las paredes venosas. Las plaquetas tienen dos receptores para colágena, el integrin $\alpha_2\beta_1$, con un mayor papel en la adhesión y anclaje de las plaquetas, y un miembro de la familia Ig, GPVI, principal responsable del señalamiento y activación plaquetaria [89].

En la Figura 28 se presentan los resultados de poner en contacto las membranas con PRP y PPP, en el inciso *a* únicamente con el material y en el inciso *b* con la presencia de un agonista como la colágena. Lo que se busca es que el material no interfiera con el proceso de coagulación, el usar un agonista permite comparar los resultados, ya que se conoce el comportamiento de agregación con colágena [90].



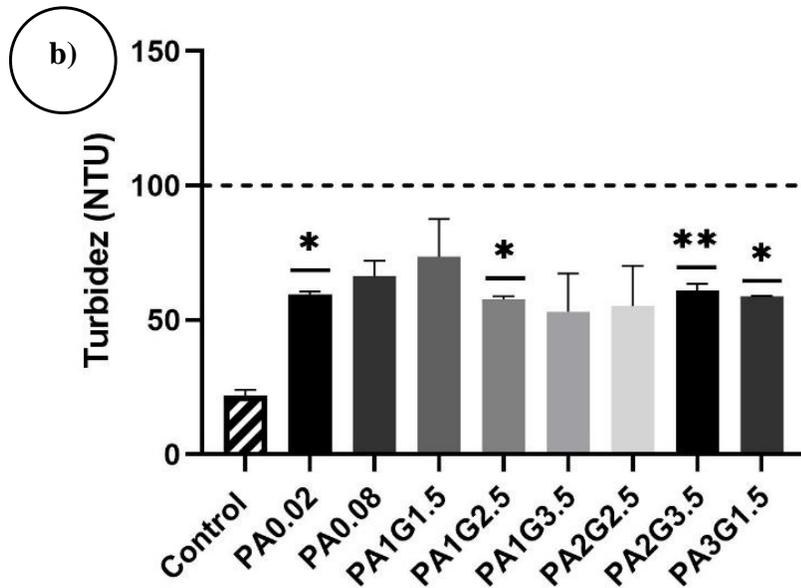


Figura 28. a) Turbidez medida de la agregación plaquetaria de PRP y PPP cuando se exponen las membranas durante 30 minutos sin la presencia de agonista, b) Turbidez medida de la agregación plaquetaria de PRP y PPP cuando se exponen las membranas durante 30 minutos con colágena como agonista.

Como se observa en el gráfico *a*, las membranas en el PRP y PPP exhiben una turbidez superior al control. Lo ideal es que el material no interfiera con la agregación plaquetaria por lo que es necesario verificar los cambios respecto al control. Estos cambios deben ser leves pues de otra forma podría haber daño en las plaquetas. En este caso, los resultados, de más favorables a menos favorables, son: PA0.08, PA0.02, PA2G3.5, PA2G2.5, PA1G2.5, PA1G1.5, PA3G1.5 y PA1G3.5.

En el caso de la gráfica con el agonista, se observa un incremento en la agregación de las plaquetas, lo que genera tamaños de partícula más grandes y, como consecuencia, una disminución de la turbidez [87]. Por eso, la turbidez del control del PRP y PPP es mucho menor cuando está presente la colágena. Como se desea que el material tenga un efecto regulador sobre la activación y agregación plaquetaria inducida por colágena, idealmente se espera que las membranas presenten una mayor turbidez en comparación con el control. Por lo tanto, las membranas, de más favorable a menos favorable, son: PA1G1.5, PA0.08, PA2G3.5, PA0.02, PA3G1.5, PA1G2.5, PA2G2.5 y PA1G3.5.

Considerando los resultados de las membranas en la coagulación y sumado a las pruebas de MTT y hemólisis, se puede concluir que las tres mejores membranas para continuar su evaluación fisicoquímica son PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5.

7.3.5 Componente filtrante: Capa electrohilada

A partir de los datos biológicos, se decidió continuar con tres de las soluciones que mostraron mejores resultados, las cuales fueron PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5.

Se optó por evaluar cada una de las soluciones para determinar si podían electrohilarse. Durante la experimentación, se observó que la solución PA1G2.5 no es adecuada para utilizarse en esta técnica. Durante el proceso de electrohilado se pudo observar la formación del cono de Taylor; sin embargo, al depositar las aparentes fibras sobre el papel de aluminio, inmediatamente se formaban gotas de solución. Esto puede explicarse por la alta hidrofiliidad y humectabilidad de la solución debido a la presencia del glicerol. Es probable que se presenten algunos OH libres del glicerol que no entrecruzaron, sumados a aquellos OH del ácido carboxílico. Lo anterior puede explicar por qué el agua no se evapora completamente y, por lo tanto, las fibras se depositan húmedas. En cambio, las soluciones con concentraciones molares de 0.02 y 0.08 generaban fibras secas y formaban una película. Las soluciones con menores cantidades molares favorecen el entrecruzamiento lo que disminuye la cantidad de OH libres y una menor humectabilidad. La solución de PA0.02 demostró un mejor desempeño durante el proceso de electrohilado, ya que se pudo electrohilar de manera continua y uniforme.

Además, se notó que la membrana electrohilada era muy delgada, por lo que se decidió utilizar las membranas densas como soporte y depositar una capa electrohilada utilizando la solución que se procesó adecuadamente, que fue la PA0.02. La solución anterior también se eligió debido a su alta biocompatibilidad. Se colocaron membranas densas de PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5 sobre el papel aluminio el cual se montaba sobre el rotor y se electrohiló sobre ellas. La generación de dos capas puede tener implicaciones interesantes en la distribución y tamaño de poro para lograr una mayor selectividad en el paso de las toxinas urémicas (Figura 29a y b).

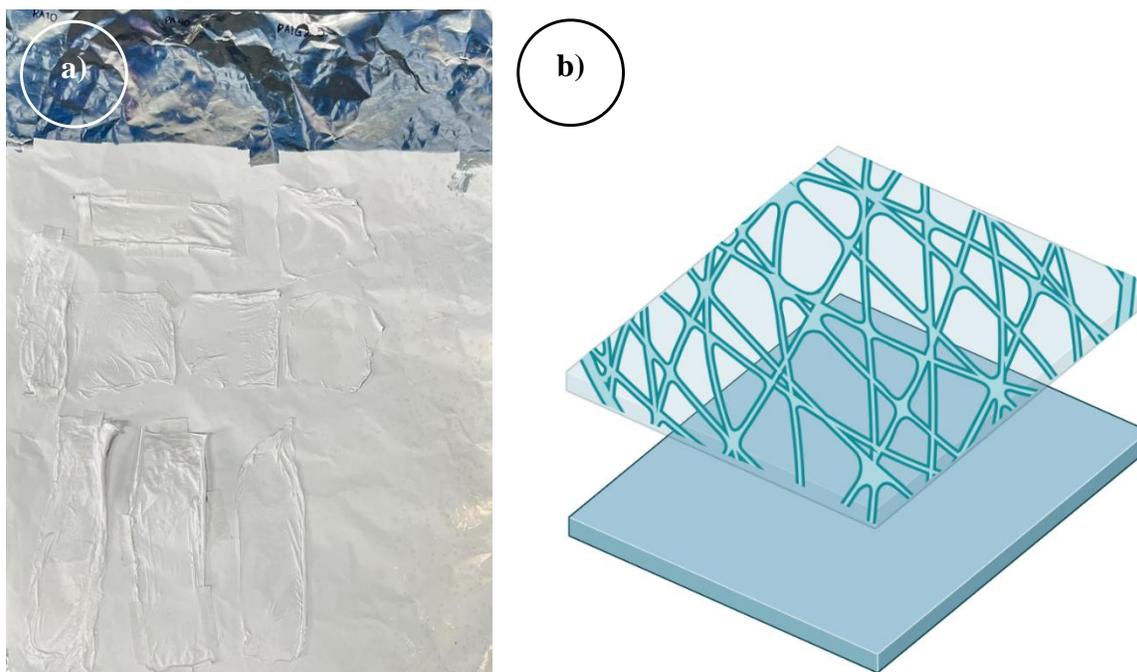


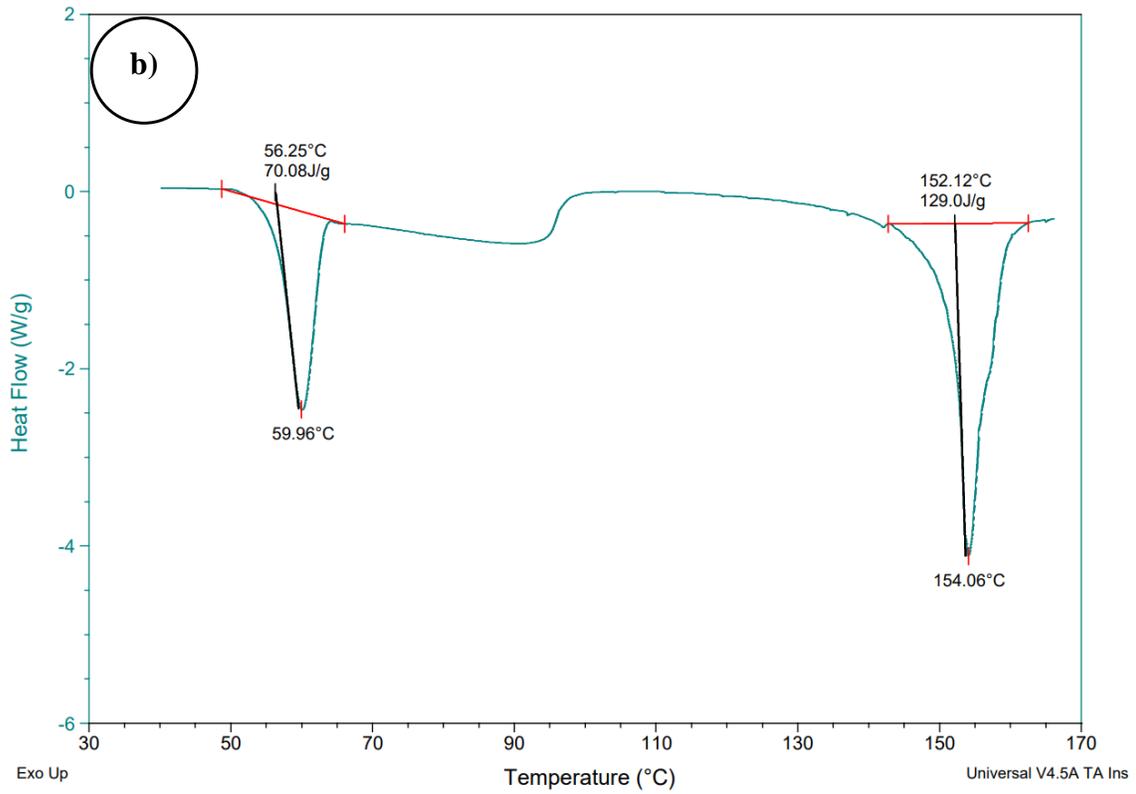
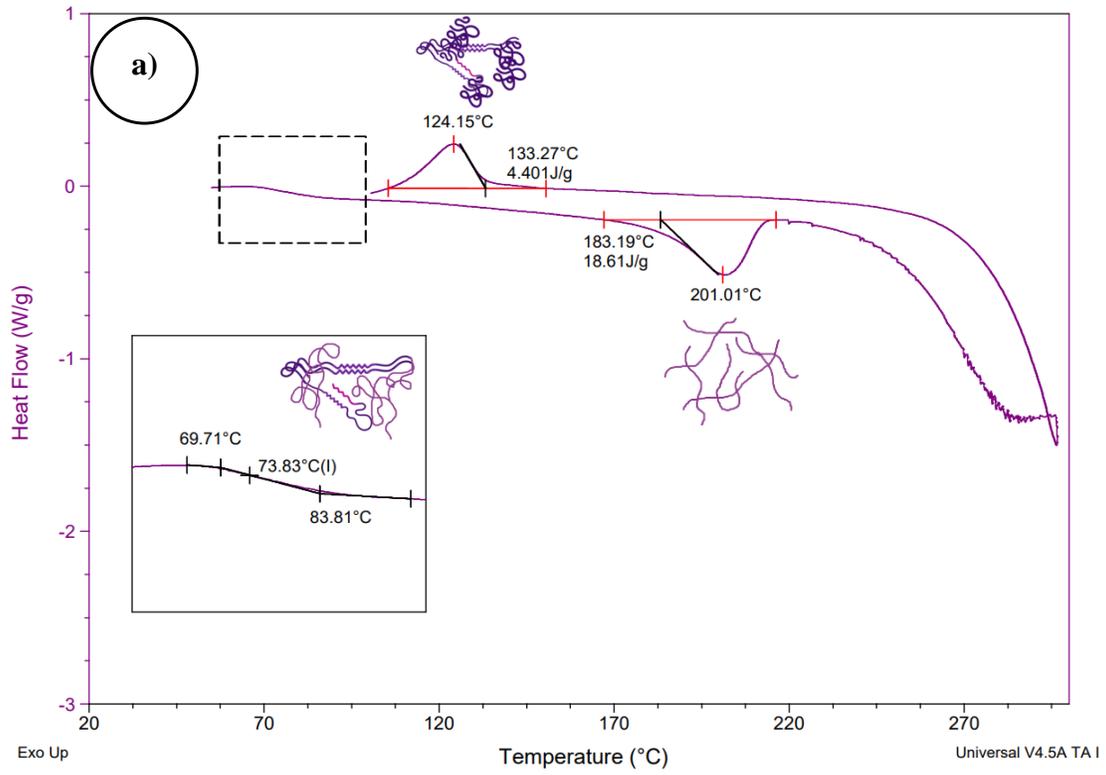
Figura 29. a) Membranas densas con capa de PA0.02 electrohilada; b) esquema ilustrativo del acomodo de las capas.

7.3.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico mediante DSC es ampliamente utilizada en la caracterización de materiales debido a su capacidad para evaluar cambios en las propiedades térmicas como son cambios en transiciones de la temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de fusión (T_m) y la temperatura de cristalización (T_c), así como las entalpías asociadas a cada proceso presente en la muestra polimérica.

Las membranas fabricadas consisten en una matriz polimérica químicamente modificada, cuyo polímero de partida fue el PVOH, un polímero con estereo regularidad atáctica pero que gracias a la presencia de enlaces con el hidrógeno exhibe carácter semi-cristalino, lo que en términos de transiciones esperamos observar de dos tipos, las que corresponde a la parte amorfa y las que corresponde a la parte cristalina [52]. El PVOH también se clasifica dentro de la familia de los termoplásticos, específicamente en los plásticos suaves, lo que implica que se puede reprocesar [52]. En ese contexto, en el segundo ciclo del termograma del PVOH se observaron dos transiciones térmicas. La primera corresponde a la T_g alrededor de 73.83°C . La T_g se puede definir como el movimiento coordinado de al menos 50 átomos de carbono, por tal motivo en la Figura 30a se colocan esquemas de cómo se mueven las cadenas poliméricas a la temperatura mencionada. Este movimiento de las cadenas poliméricas está influenciado por la flexibilidad de éstas para rotar, así como por las interacciones que existan en la cadena. Ambos aspectos están estrechamente ligados con los grupos funcionales presentes. La segunda es una transición de fusión en 201.01°C con una entalpía de 18.61 J/g , en donde las cadenas poliméricas presentan un movimiento más fluido. Se observó además la transición exotérmica a 124.15°C , correspondiente a la temperatura de cristalización, durante la cual las cadenas poliméricas se reordenan.

En cuanto al ácido cítrico monohidratado, al tratarse de un sólido cristalino, presenta un pico de fusión a 154.06°C (Figura 30b). La transición endotérmica a 59.96°C se atribuye a la desolvatación de la molécula de agua de acuerdo con la literatura [91]. Por otro lado, el glicerol, no muestra un acomodo ordenado por lo que se considera amorfo y lo que se esperaría ver es una T_g . En el termograma (Figura 30c), la T_g del glicerol se observa alrededor de -85.45°C , valor similar al reportado en la literatura [92].



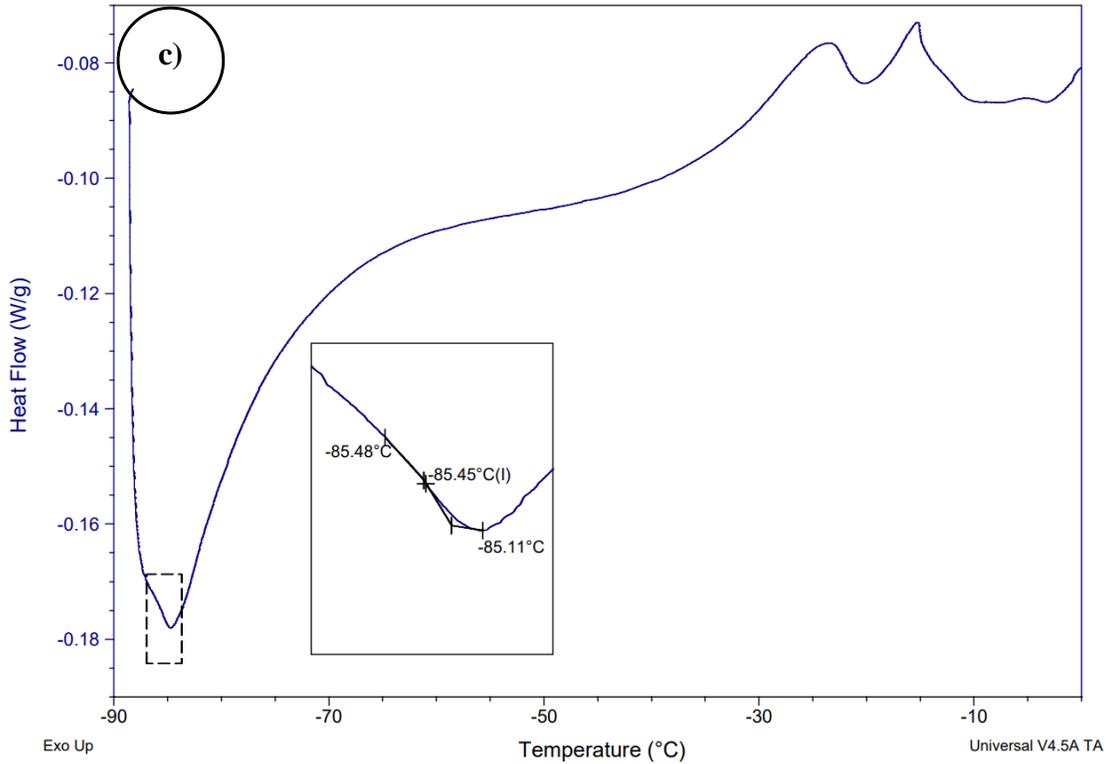


Figura 30. a) Termograma del PVOH, donde se esquematiza lo que sucede con las cadenas poliméricas en cada una de las transiciones térmicas; b) Termograma del ácido cítrico monohidratado; c) Termograma del glicerol.

Por otro lado, se realizó la evaluación de las propiedades térmicas de las membranas densas (ver Figura 31). La información obtenida a partir de los termogramas indicó que la membrana densa de PA0.02 tiene una T_g en 83.69°C y una T_m a 171.58°C . La presencia de la T_m indica que aún hay una fracción que mantiene un acomodo regular, aunque en menor medida que el PVOH puro. Lo que pudo suceder en este caso es que el entrecruzamiento con ácido cítrico incrementó el tamaño del plegado entre las cadenas y mantiene la región arreglada, lo que explica la reducción de la T_m con respecto al polímero puro. En la membrana densa de PA0.08, se observa la presencia de una T_g mayor y no se aprecia una T_m , lo que implica la ausencia de la fracción regular. Esto significa que el entrecruzamiento de las cadenas de PVOH con ácido cítrico ha sido tan significativo que provocó cambios en el comportamiento térmico del material, desapareciendo la zona cristalina, lo cual es lógico pues ya no se permite el arreglo regular de las cadenas. Este comportamiento también se observa en la membrana con glicerol, que es indicativo de que ocurrió el entrecruzamiento del glicerol con el PVOH funcionalizado con ácido cítrico.

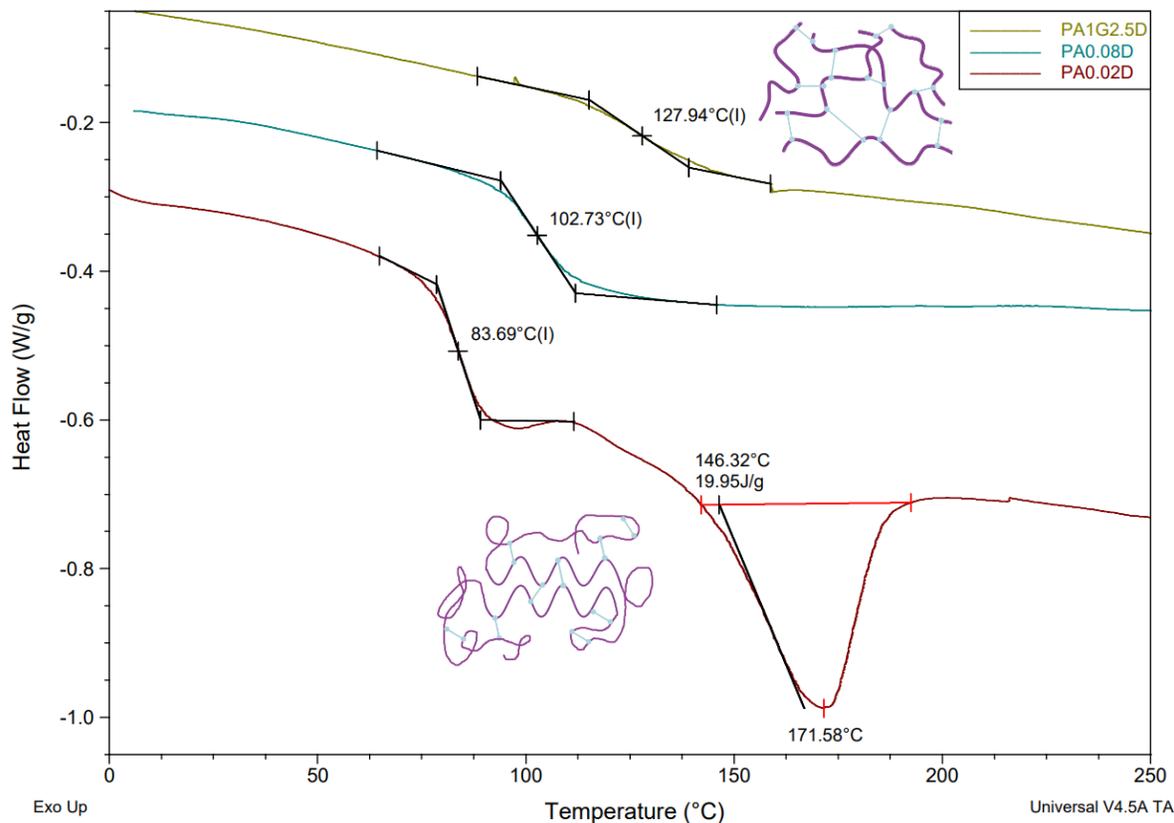


Figura 31. Termogramas de las membranas densas PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5. Se esquematiza la disposición del polímero conforme se incrementa la cantidad de ácido cítrico, donde las líneas moradas corresponden a la cadena de PVOH y las líneas azules representan el entrecruzamiento de las mismas. Se puede notar la desaparición de la fracción cristalina conforme aumenta la cantidad de ácido cítrico.

Para visualizar mejor el cambio en la T_g con respecto al aumento del ácido cítrico, se presenta la gráfica de la Figura 32 que relaciona los valores de T_g y T_m con la cantidad de ácido cítrico. Lo que se puede destacar es que se muestra un comportamiento lineal, es decir, a medida que aumenta la cantidad de agente entrecruzante incrementa la T_g y, por otro lado, la T_m tiende a desaparecer. Esto es congruente con las observaciones previas, ya que al incrementar el agente de entrecruzamiento se dificulta la movilidad de las cadenas poliméricas, como consecuencia de la interacción del agente de entrecruzamiento con éstas, y por ende se reduce la capacidad de generar volumen libre, por ello se requiere de mayor energía y el valor de T_g se incrementa. Además, el grado de entrecruzamiento puede ser tal que no permita el arreglo ordenado de las cadenas poliméricas y por ello no se presenta la fusión.

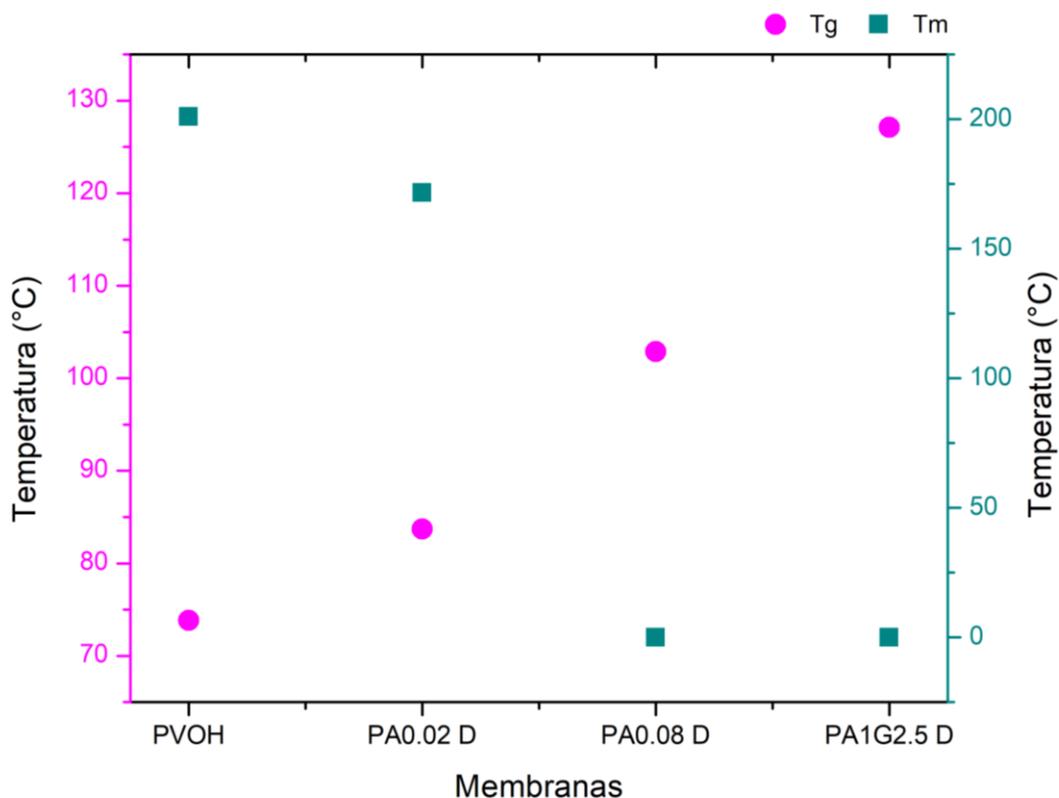


Figura 32. Modificación de la Tg y la Tm con respecto al aumento del ácido cítrico en las membranas densas fabricadas.

Con relación a los termogramas de las membranas densas con una capa de electrohilado, se observó la presencia de una Tg, donde en la Figura 33 se hace la comparativa de las transiciones obtenidas para estas muestras. La Tg se registró a 98.44, 122.35 y 179.69°C para PA0.02DEH, PA0.08DEH y PA1G2.5DEH, respectivamente. Como se puede notar, el valor de la Tg aumenta conforme aumenta la cantidad de ácido cítrico y, en el caso de la membrana con glicerol, tiene el valor más alto que puede atribuirse a que hay mayor entrecruzamiento por parte del glicerol. El aumento en el valor de la Tg está relacionado con mayor restricción al movimiento de las cadenas poliméricas, debido a que existe mayor entrecruzamiento de éstas, lo que requiere más energía para crear espacio libre y promover dicho movimiento [93]. La membrana con glicerol mostró una segunda Tg en 104.31°C, la aparición de esta segunda transición se debe a que el glicerol está haciendo un efecto plastificante.

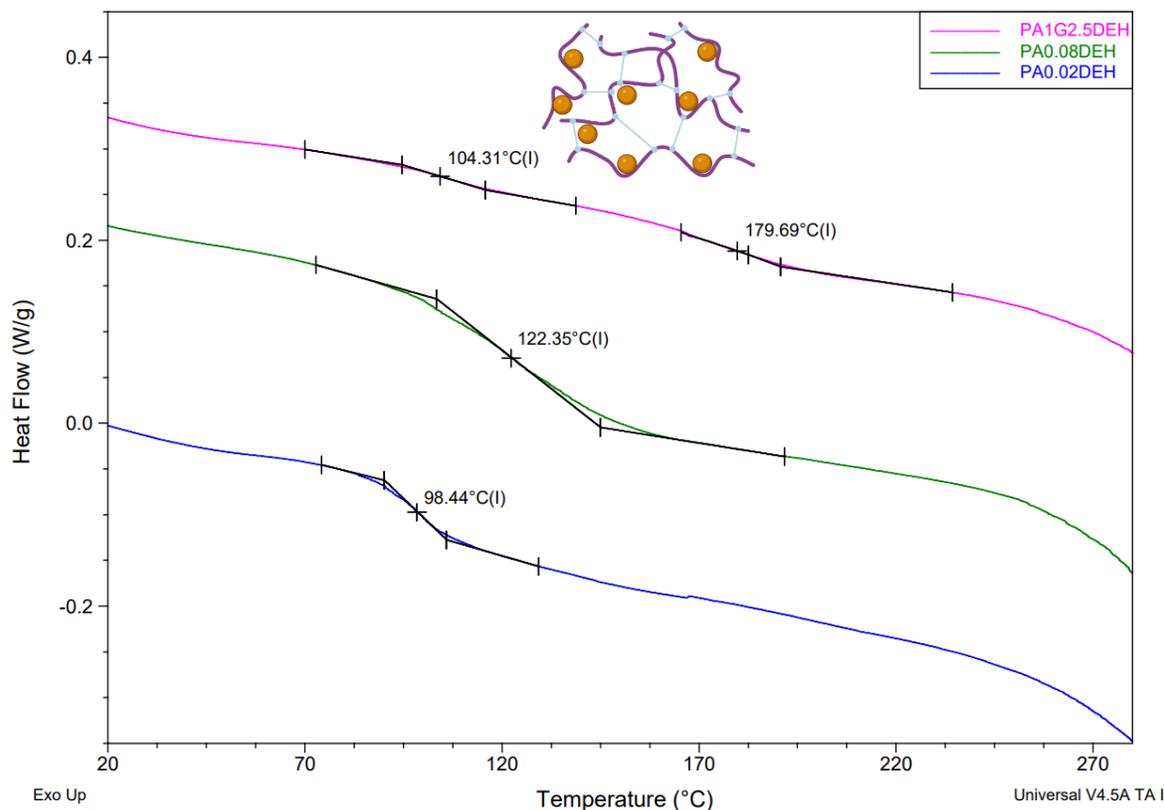


Figura 33. Termogramas de las membranas con una capa densa y otra electrohilada. Se presenta el esquema de la matriz polimérica entrecruzada, donde las líneas moradas corresponden a la cadena de PVOH y las líneas azules representan el entrecruzamiento de las mismas. Las esferas naranjas representan las moléculas de glicerol, que pueden funcionar como plastificante al acomodarse entre las cadenas y favorecer la formación de espacio libre.

7.3.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el objetivo de examinar la morfología de las muestras generadas, éstas se observaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido. Se examinó tanto el lado denso como el lado con fibras no entretrejidas de las membranas, así como su espesor en conjunto.

El lado denso mostró la presencia de porosidades cuyo tamaño aumentaba mientras que su distribución disminuía a medida que aumentaba la cantidad de ácido cítrico. Para determinar cuantitativamente estos cambios, se midió el tamaño de los poros y se elaboraron histogramas a los cuales se ajustó un modelo gaussiano (Figura 34). Para la membrana PA0.02, el tamaño promedio de los poros fue de 487 nm. En el caso de la membrana PA0.08, se tuvo una distribución bimodal, con tamaño promedio de poro de 355.76 y 606.25 nm. Por otro lado, en la membrana con glicerol, también con distribución bimodal, se observaron cavidades, alcanzando los 5.923 y 13.212 μm . La determinación de la distribución del tamaño de los poros es importante en la determinación de las propiedades de corte molecular. El tener una distribución amplia permite la remoción de moléculas de tamaños variados [94], [95].

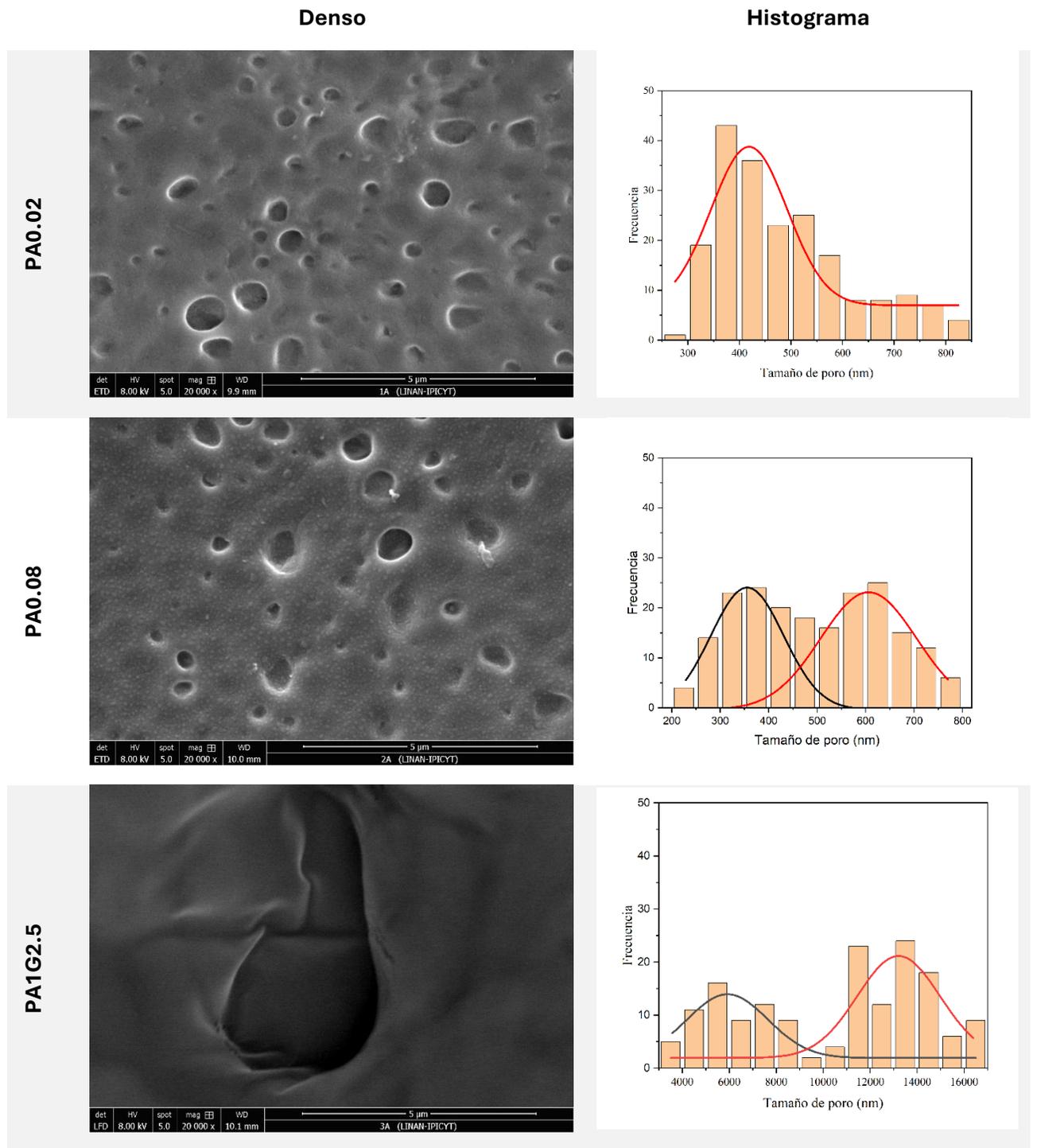
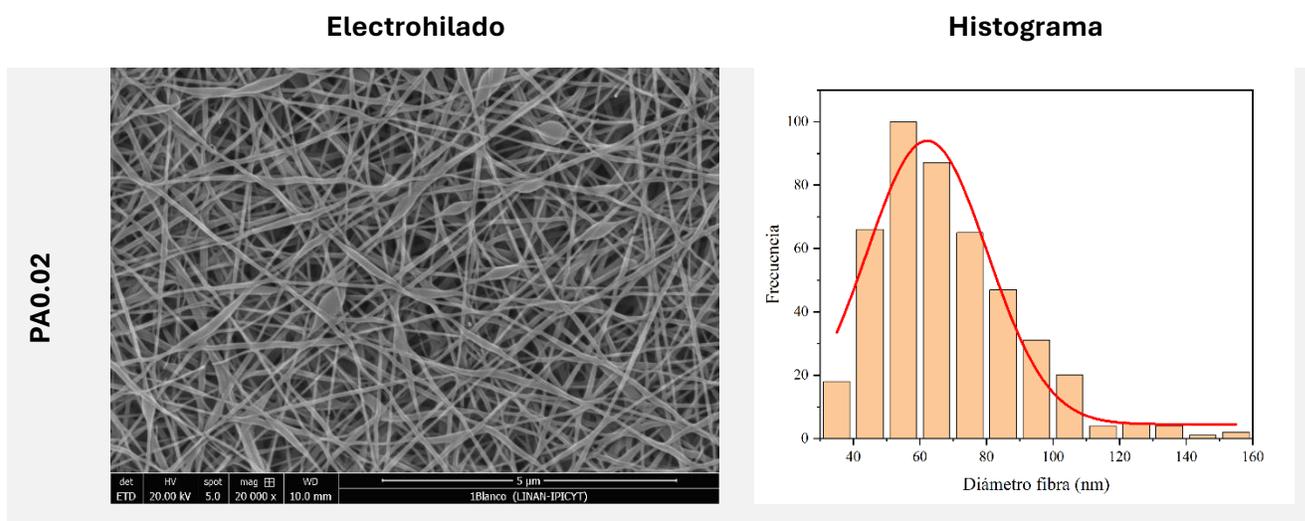


Figura 34. Imágenes de SEM de las diferentes muestras, obtenidas por electrones secundarios y una magnificación de 20 000x. Los histogramas corresponden a las mediciones realizadas en dichas imágenes de SEM.

La diferencia notable en el tamaño de los poros de las membranas fabricadas con glicerol podría deberse al efecto plastificante del glicerol, el cual, al ser una molécula pequeña en comparación con la cadena polimérica de PVOH, se difunde con mayor facilidad. Como resultado, la molécula de glicerol parece ocupar los espacios dentro de la matriz polimérica, evitando la formación de poros más pequeños. El efecto plastificante del glicerol en las membranas es apoyado por los resultados observados en los termogramas de esta muestra, donde se observó la aparición de una transición térmica atribuida a este fenómeno. Esto sugiere que una fracción del glicerol no está entrecruzada, y esté generado espacio libre entre las cadenas. El espacio libre, también conocido como volumen libre, es el espacio interno entre las cadenas de polímero. La función principal de los plastificantes es aumentar el volumen libre dentro del polímero al reducir las fuerzas intermoleculares entre las cadenas, incrementando así su movilidad y confiriéndole propiedades más flexibles y elásticas. Además, los plastificantes pueden generar enlaces secundarios con las cadenas poliméricas, rellenando los espacios vacíos y contribuyendo a la modificación de las propiedades mecánicas del material [96].

Por otro lado, se examinó el área electrohilada y se midió el diámetro de las fibras (Figura 35). En las imágenes obtenidas se detectaron fibras que no eran visibles con microscopía óptica. También se identificaron defectos tipo rosario, considerados como productos no deseados debido a que reducen el área superficial [97]. Los diámetros promedio de las fibras de las membranas PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5 fueron de 68, 71 y 80 nm respectivamente, lo que permite categorizarlas como nanofibras. Según la literatura, las nanofibras son fibras sólidas con un diámetro inferior a 100 nm y una longitud mayor que su diámetro [98]. El modelo gaussiano se ajustó a los histogramas y se encontró que la R^2 fue superior al 90% en las muestras.



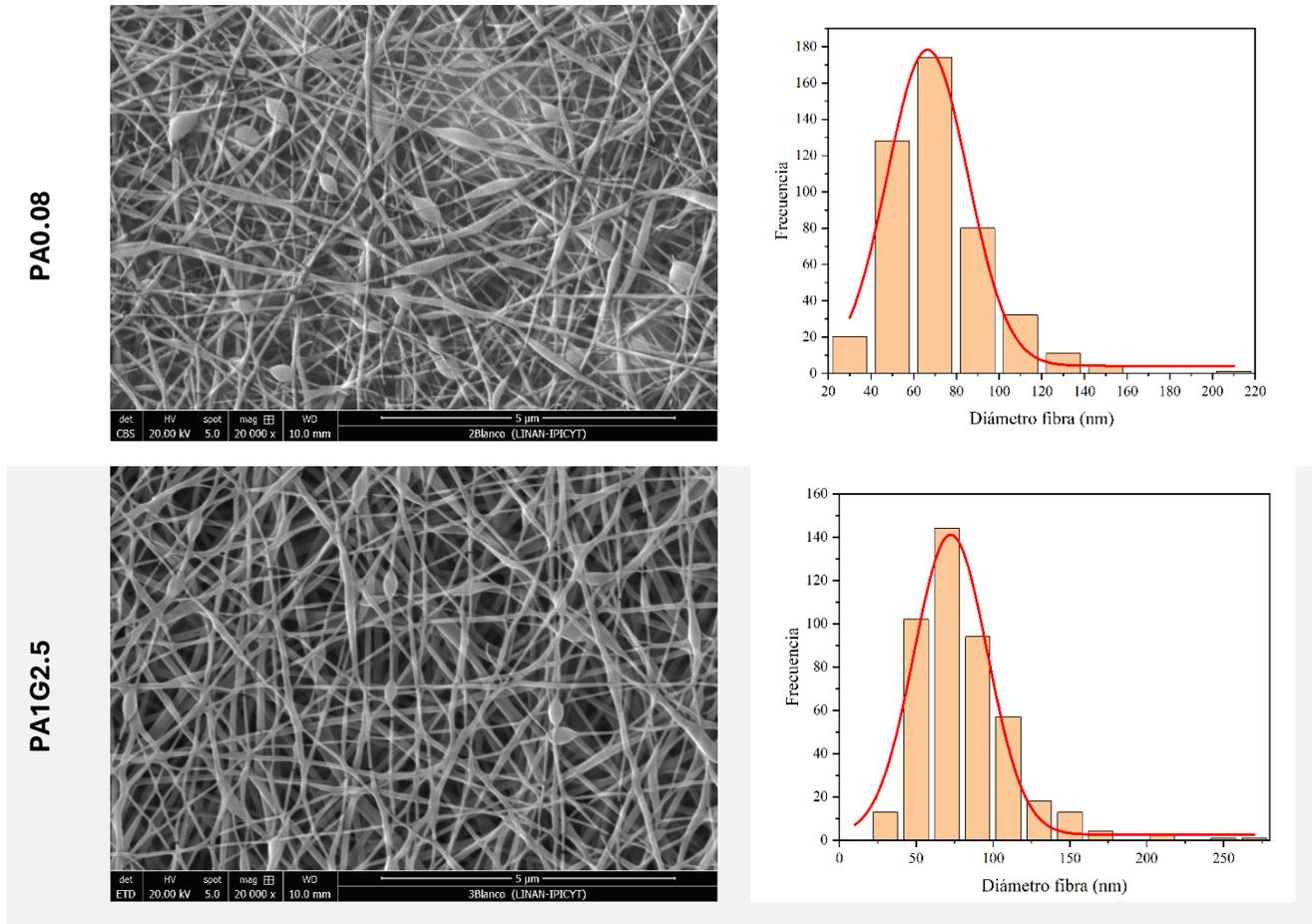
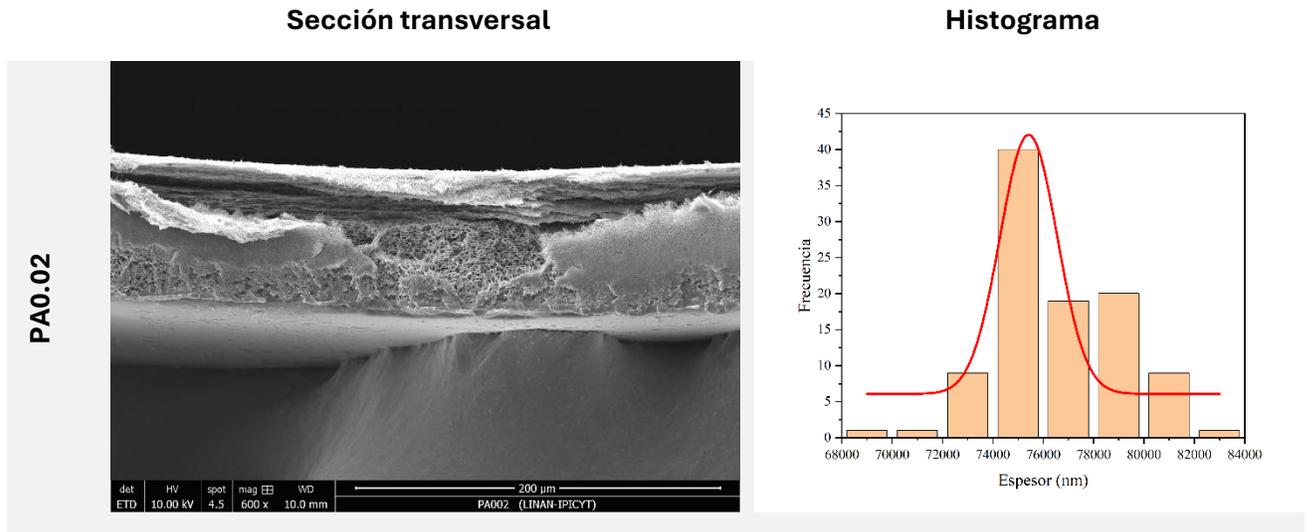


Figura 35. Imágenes de SEM, obtenidas por electrones secundarios, con una magnificación de 20 000x. Los histogramas corresponden a las mediciones realizadas en dichas imágenes de SEM.

En cuanto al espesor de las membranas, los valores promedio para PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5 fueron de 76, 63 y 66 μm , respectivamente. La membrana PA0.08 mostró la mayor desviación en la distribución gaussiana.



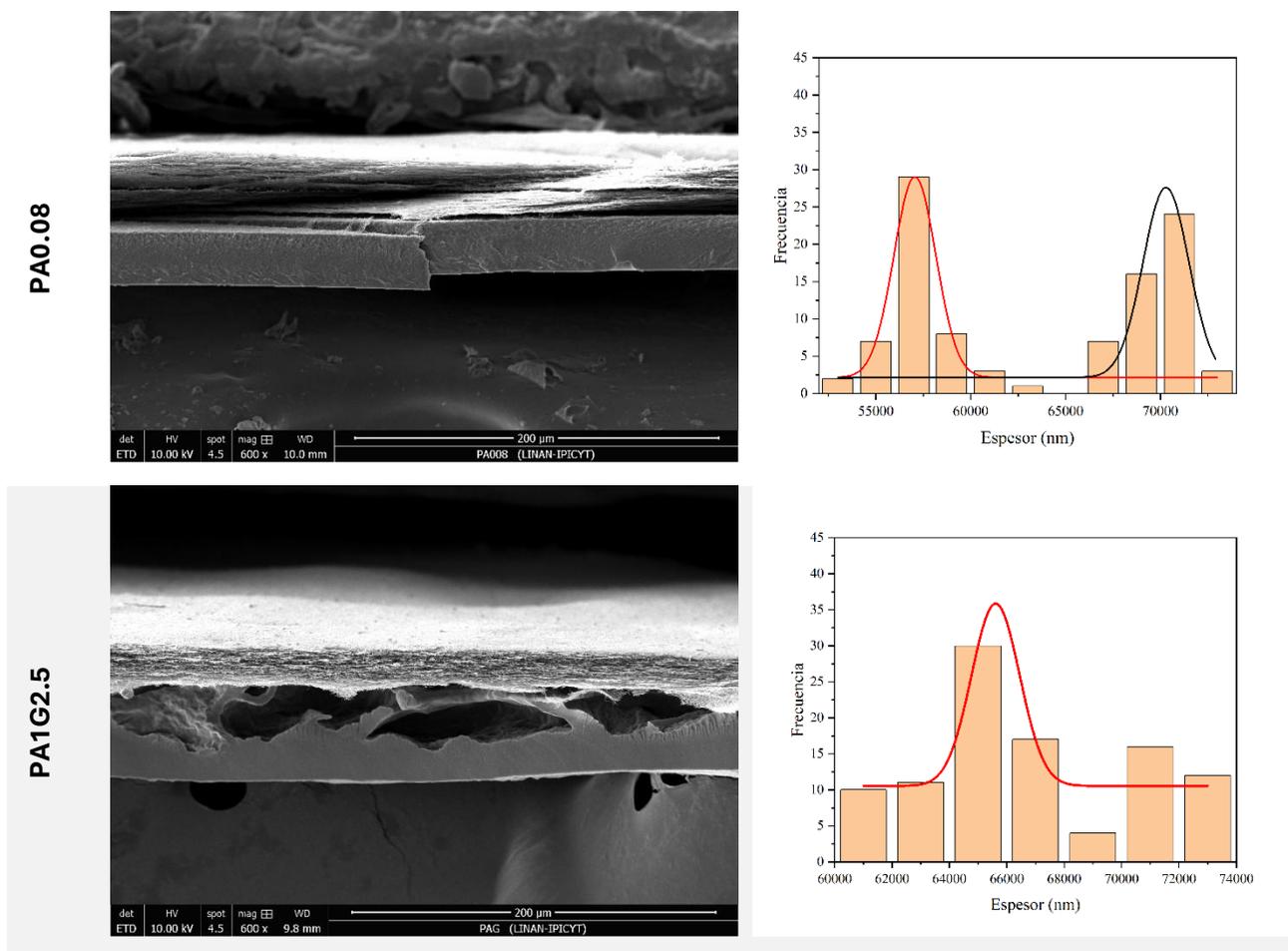


Figura 36. Imágenes de SEM, obtenidas por electrones secundarios, con una magnificación de 600x. Los histogramas corresponden a las mediciones realizadas en dichas imágenes de SEM.

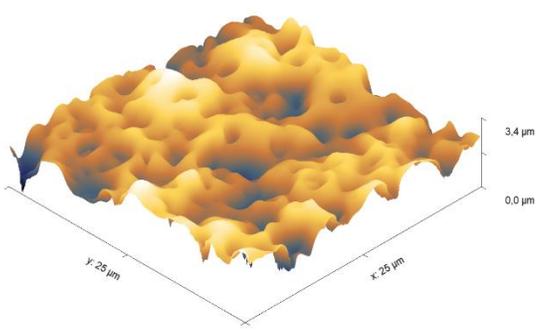
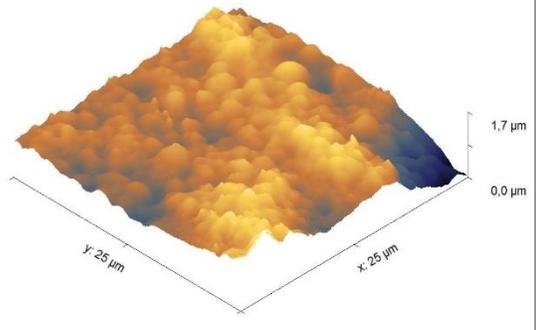
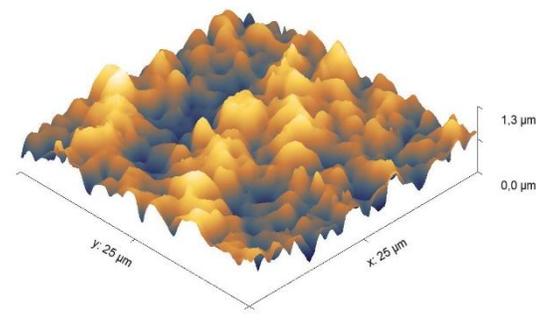
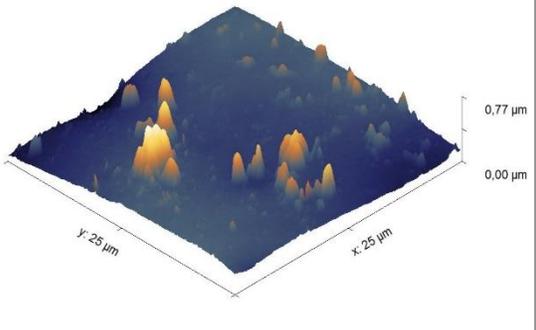
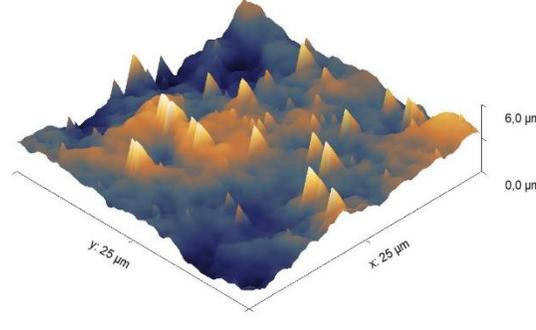
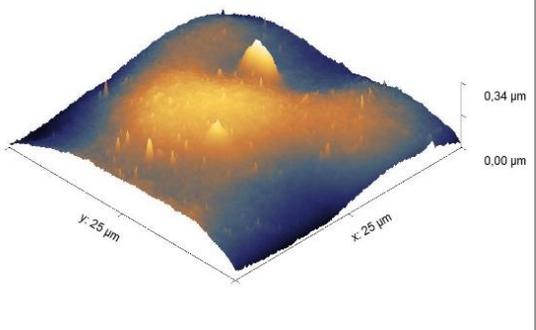
Se corrobora la presencia de cavidades y no de poros en la muestra PA1G2.5, lo cual es consistente con lo mencionado anteriormente, ya que es consecuencia de la difusión del glicerol en la matriz polimérica.

7.3.8 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se llevó a cabo la caracterización de las muestras mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) para evaluar la topografía de la superficie de las membranas fabricadas. La superficie de las membranas puede evaluarse comparando sus parámetros de rugosidad, mediante la rugosidad promedio (S_a) y la rugosidad cuadrática media (S_q). La S_a es un parámetro estadístico que se consigue por la media de valores absolutos de las desviaciones de la superficie por arriba y por abajo del área de muestreo [99]. Las superficies con un S_a bajo se consideran más lisas, mientras que un S_a alto indica una superficie más rugosa. Por otro lado, la rugosidad cuadrática media (S_q) es otro parámetro de dispersión que representa la desviación estándar de las alturas de la superficie [99].

Los resultados obtenidos se presentan a continuación en las tablas Tabla 8, Tabla 9 y Tabla 10.

Tabla 8. Imágenes 3D de AFM de ambos lados de las membranas de una sola capa, denominadas membranas densas (D). Los valores de la rugosidad cuadrática media (Sq) y la rugosidad promedio (Sa), se presentan debajo de cada imagen para cada lado. El lado A corresponde al lado más brillante, que está en contacto con el ambiente, mientras que el lado B es el lado opaco, que se encuentra en contacto con la placa de vidrio.

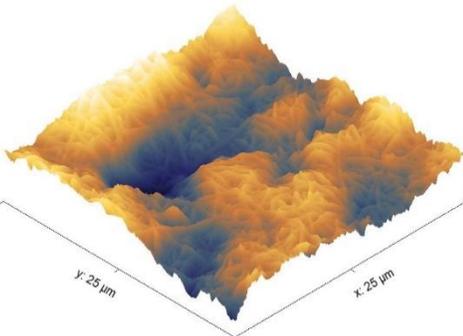
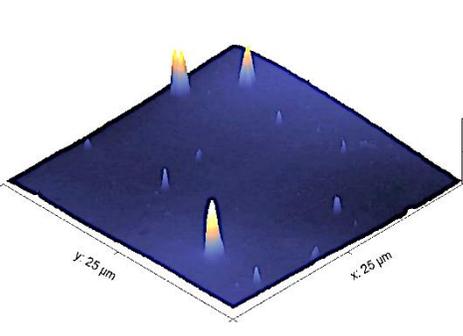
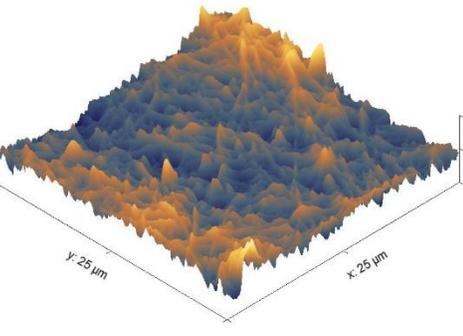
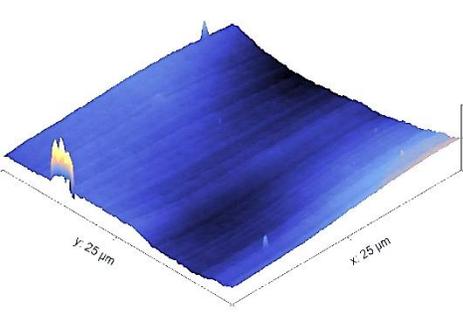
| | Lado A | | Lado B | |
|----------|---|----------------|--|----------------|
| PA0.02D |  | |  | |
| | Sq = 480.75 nm | Sa = 385.55 nm | Sq = 215.35 nm | Sa = 162.15 nm |
| PA0.08D |  | |  | |
| | Sq = 190.1 nm | Sa = 153.55 nm | Sq = 73.07 nm | Sa = 50.98 nm |
| PAIG2.5D |  | |  | |
| | Sq = 959.4 nm | Sa = 782.95 nm | Sq = 57.76 nm | Sa = 45.82 nm |

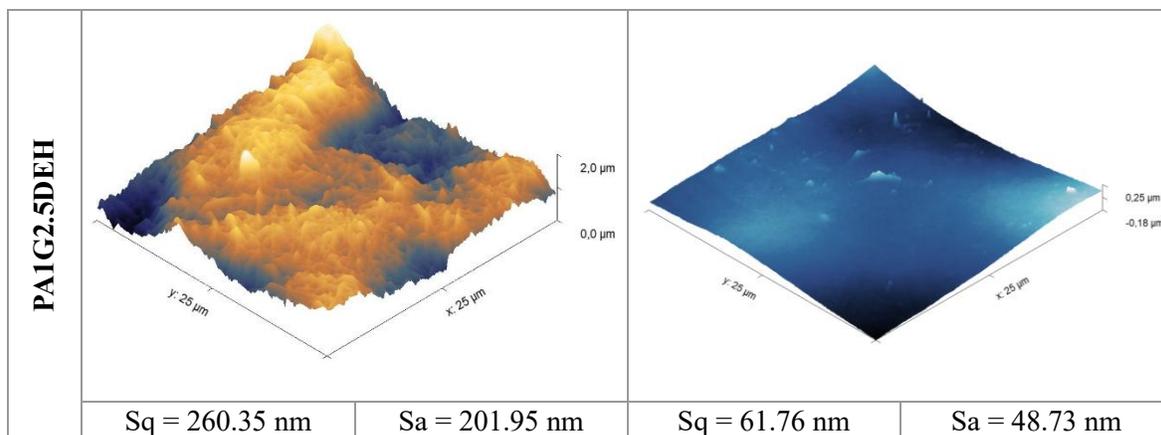
En las membranas densas, ambas caras presentan características diferentes. El lado A muestra una mayor porosidad, lo cual se refleja no solo en las imágenes obtenidas, sino también en el valor elevado de la rugosidad promedio en comparación con el lado B. Este último, con

menor diferencia de valles y crestas, así como menor porosidad, por lo que puede considerarse una superficie relativamente lisa.

La membrana PA0.08D, con los valores más bajos de Sa y Sq en ambos lados, es la que presenta, en promedio, la menor rugosidad de las tres membranas analizadas. Esto la convierte en la más favorable, ya que se ha reportado que las superficies rugosas tienden a ensuciarse más fácilmente debido a su mayor área superficial, lo que incrementa los puntos de contacto entre la superficie y los compuestos que causan el ensuciamiento. Además, la rugosidad afecta otras propiedades de la membrana, como el ángulo de contacto, la carga superficial y la hidrodinámica, las cuales también pueden influir en la tasa de ensuciamiento [100].

Tabla 9. Imágenes 3D de AFM de ambos lados de las membranas de dos capas, denominadas membranas densas y electrohiladas (DEH). Los valores de la rugosidad cuadrática media (Sq) y la rugosidad promedio (Sa), se muestran debajo de cada imagen para cada lado. En cada caso, el lado A corresponde a la capa electrohilada, mientras que el lado B representa la capa fabricada mediante inversión de fase.

| | Lado A | | Lado B | |
|-----------|---|----------------|--|---------------|
| PA0.02DEH |  | |  | |
| | Sq = 323.45 nm | Sa = 259.05 nm | Sq = 107.31 nm | Sa = 64.88 nm |
| PA0.08DEH |  | |  | |
| | Sq = 150.9 nm | Sa = 114.85 nm | Sq = 80.94 nm | Sa = 66.94 nm |



En las membranas de dos capas, una densa y otra electrohilada, siendo el lado A la capa electrohilada, las imágenes revelan claramente la presencia de fibras, dando lugar a pocas crestas agudas y valles pronunciados. En contraste, el lado B tiene una apariencia más lisa, ya que fue fabricado mediante inversión de fase. En general, se observa una disminución en los parámetros de rugosidad en las membranas de dos capas en comparación con las de una sola capa. Esto es significativo, ya que se sabe que las superficies rugosas de una membrana pueden afectar su interacción con biomoléculas. Una menor rugosidad reduce el área superficial expuesta a las proteínas, lo que puede disminuir la adsorción de éstas y, por ende, el ensuciamiento [101]. Al igual que en el caso de las membranas de una sola capa, la membrana PA0.08DEH presenta los valores más bajos de rugosidad en ambos lados, en promedio. Esto podría deberse a su composición, específicamente a la cantidad de PVOH y ácido cítrico, ya que el entrecruzamiento generado por el ácido cítrico reduce la contracción del PVOH en presencia de un solvente teta durante el baño de coagulación, y, en consecuencia, disminuye la rugosidad del material. Esto también sugiere que el método de fabricación utilizado influye en que las membranas presenten una mayor rugosidad.

Por otro lado, al comparar las membranas de PVOH con las membranas comerciales de PES y PSf (ver Tabla 10), se observa que las de PVOH presentan parámetros de rugosidad mayores, en general, aunque en el caso de la membrana PA0.08DEH se obtuvieron resultados similares ($Sq=80.94$ y $Sa=66.94$) con los reportados para las membranas de PES, en especial en términos de Sa. Aunque el resultado es cercano, se requiere seguir mejorando el proceso de fabricación de las membranas de PVOH para reducir la rugosidad.

Tabla 10. Parámetros de rugosidad reportados para membranas de Polietersulfona (PES) y Polisulfona (PSf).

| | Sq (nm) | Sa (nm) | Referencia |
|---------------------|---------|---------|------------|
| Membrana PES | 88.14 | 67.10 | [102] |
| Membrana PSf | 10.158 | 8.056 | [103] |

7.3.9 Determinación de la porosidad

La porosidad total puede definirse como la fracción del volumen total del material que no está ocupada por materia sólida [104]. La determinación de la porosidad se realizó mediante un método gravimétrico que consiste en medir el peso de un líquido que se deposita en los poros de las membranas. La porosidad puede expresarse como una fracción o como un porcentaje. En los valores fraccionarios, el 0 representa un material sin porosidad y 1 indica un espacio completamente vacío.

Cabe señalar que la porosidad no proporciona información sobre los tamaños de los poros, su distribución y su grado de conectividad [104]. Los valores de porosidad de las membranas tanto densas como densas con capa electrohilada se muestran en la Tabla 11. Los resultados obtenidos mostraron que todas las membranas tienen valores similares, por arriba de 0.65.

Tabla 11. Resultados de porosidad para las membranas densas y densas con capa electrohilada.

| Membrana | Porosidad |
|-------------------|---------------|
| PA0.02D | 0.655 ± 0.002 |
| PA0.08D | 0.669 ± 0.008 |
| PA1G2.5D | 0.653 ± 0.002 |
| PA0.02DEH | 0.666 ± 0.012 |
| PA0.08DEH | 0.664 ± 0.015 |
| PA1G2.5DEH | 0.664 ± 0.014 |

Los valores obtenidos fueron comparados con los reportados en la literatura para membranas de polisulfona y polisulfona modificada usadas en hemodiálisis, donde se reportan valores de porosidad de 0.4667 y 0.6246, respectivamente [101]. Es en ese sentido, las membranas de PVOH presentan valores ligeramente superiores, pero cercanos a los reportados, lo cual querría decir que serían útiles para llevar a cabo el proceso de hemodiálisis.

7.3.10 Ángulo de contacto

Con el propósito de determinar las propiedades superficiales en cuanto a naturaleza hidrofílica y humectabilidad de las membranas, se realizaron mediciones del ángulo de contacto.

De acuerdo con la literatura, es ampliamente aceptado que el valor de $\theta < 90^\circ$ corresponde a superficies con afinidad al líquido que se haya utilizado para realizar la medición, comúnmente agua, y se les denomina superficie hidrofílica. Por otro lado, un valor de $\theta > 90^\circ$ representa a las superficies que exhiben menos afinidad a dicho líquido, por lo que se les denomina hidrofóbicas. La Figura 37 ilustra lo mencionado anteriormente.

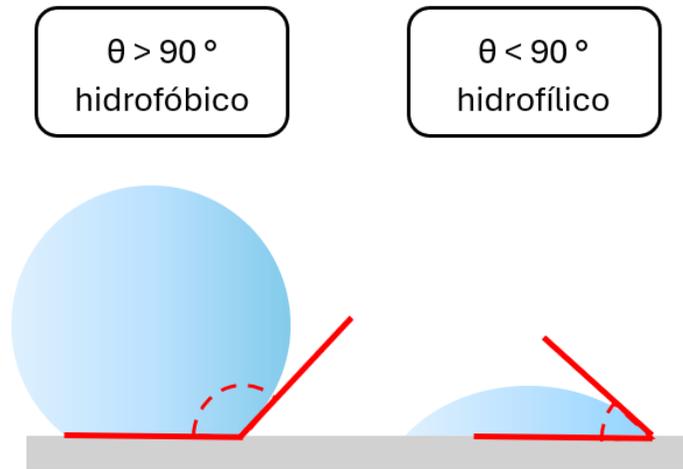
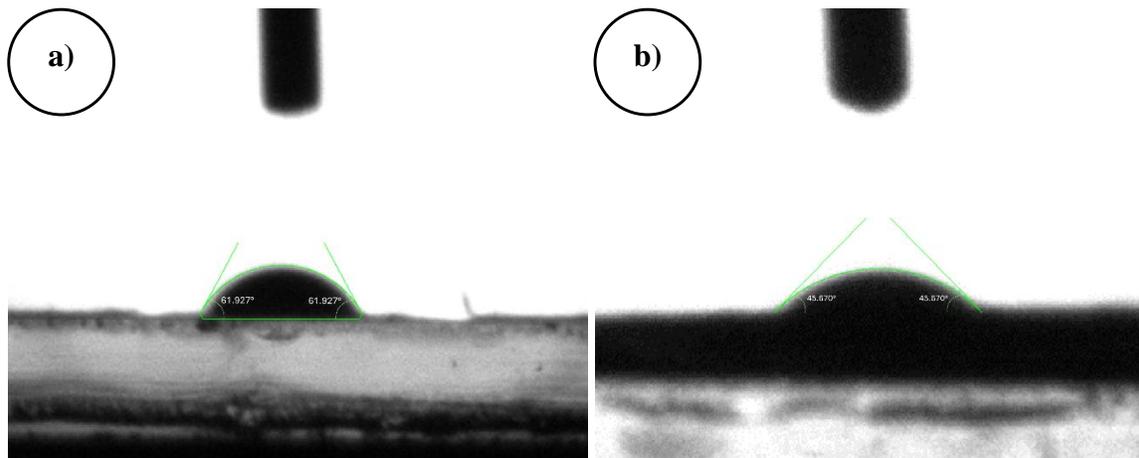


Figura 37. Esquema de una superficie con carácter hidrofílico o hidrofóbico (elaboración propia).

Tanto las membranas densas como las de dos capas mostraron tener naturaleza hidrofílica, ya que todas presentaron un ángulo de contacto menor a 90° , según los resultados mostrados en la Figura 38 y Figura 39. Esto se debe a la presencia de grupos funcionales como el hidroxilo (-OH) y carbonilo (-C=O), los cuales son polares y favorecen la interacción con el agua. Estos resultados son favorables debido a que en las membranas de hemodiálisis se busca que la superficie sea hidrofílica.



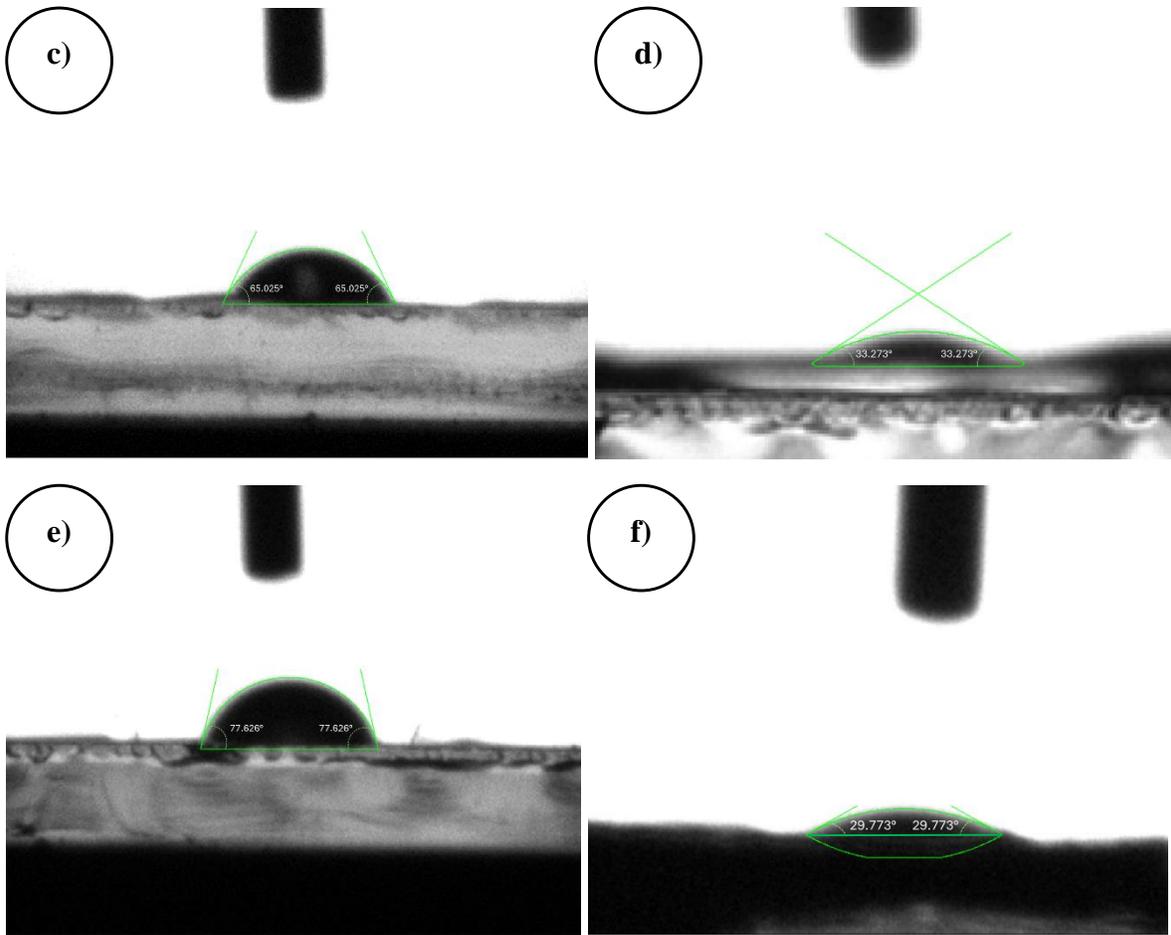


Figura 38. Fotografías de ángulo de contacto para las muestras: a) PA0.02D, b) PA0.02DEH, c) PA0.08D, d) PA0.08DEH, e) PA1G2.5D, f) PA1G2.5DEH.

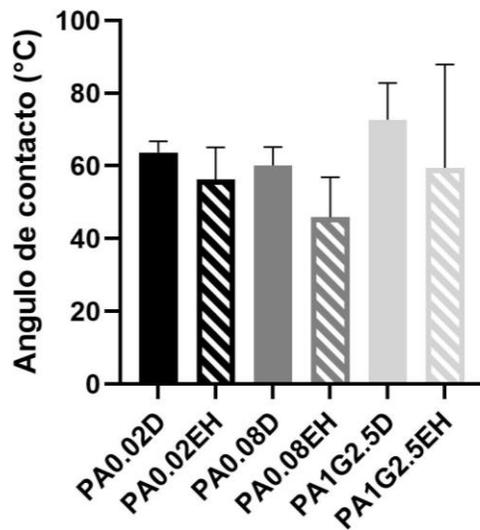


Figura 39. Ángulo de contacto de las diferentes membranas de PVOH. Las barras presentan su respectiva desviación estándar para un n=10.

Que la superficie presente una fuerte afinidad por las moléculas de agua hace que se forme una capa de hidratación sobre la misma, y de ese modo se puede reducir la interacción de las moléculas de proteínas con la membrana, lo que evitaría su ensuciamiento [105]. Además, una superficie hidrofílica mejora la hemocompatibilidad reduciendo la activación y pérdida plaquetaria [106].

Además, se observa que las membranas densas PA0.02D y PA0.08D presentan valores de ángulo de contacto similares, 63.67° y 60.10° mientras que la membrana PA1G.2.5D exhibe un ángulo de contacto mayor de 72.74° . Este comportamiento podría estar relacionado con la presencia de una menor densidad de poros, dado que, de acuerdo con las imágenes obtenidas mediante AFM, se revela una superficie predominantemente lisa (ver Tabla 8). Es notable que en las membranas de dos capas hubo una disminución en el ángulo de contacto, lo que implica que la capa electrohilada genera un cambio en las propiedades fisicoquímicas superficiales [105]. Ahora bien, también se aprecia una desviación amplia en las membranas con glicerol, esto indica que no se tiene una muestra superficialmente homogénea.

7.3.11 Porcentaje de absorción de agua

El hinchamiento del material ocurre debido a la difusión de solvente que promueve la expansión de la red polimérica porque las interacciones polímero-polímero predominan sobre las interacciones polímero-solvente, lo que evita que se dé la disolución del material (ver Figura 40) [107]. El grado de absorción del fluido en el material se ve influenciado por el grado de entrecruzamiento, la cristalinidad, las fuerzas intermoleculares involucradas, el pH y temperatura [107], [108]. La selección y combinación de los materiales pueden influir en los eventos de hinchamiento y hacer que el rendimiento de la membrana sea predecible a nivel macroscópico [107].

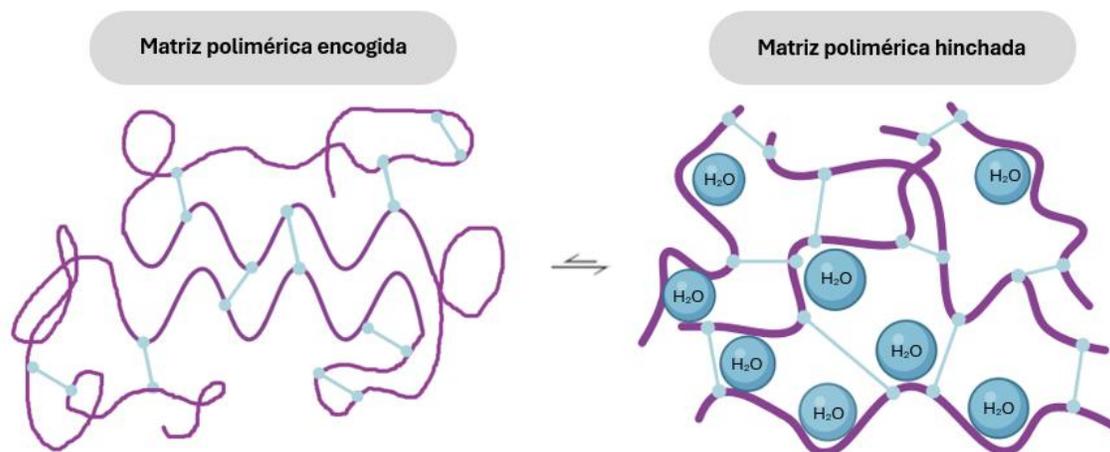


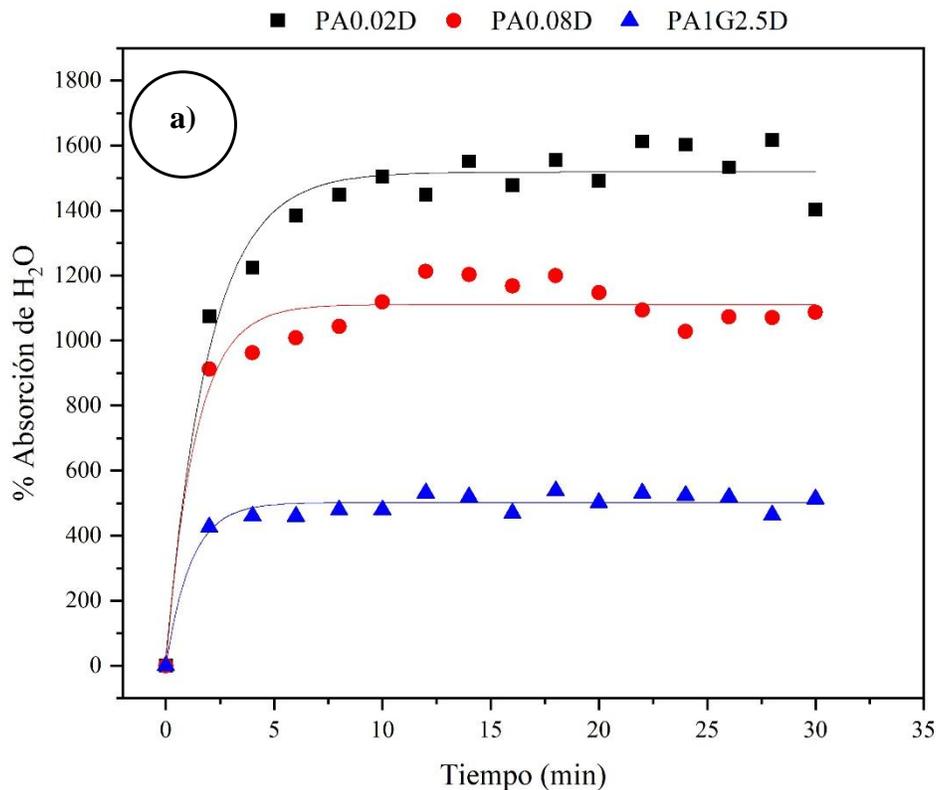
Figura 40. Esquema del hinchamiento de la matriz polimérica de PVOH entrecruzada (elaboración propia).

Los resultados obtenidos de investigar las características de absorción en las membranas de PVOH modificado se muestran en la Figura 41. El comportamiento observado indica que, en

los primeros instantes en que las membranas entran en contacto con el agua, la red comienza a hincharse debido a la compatibilidad termodinámica de las cadenas poliméricas con el agua. Este hinchamiento aumentó hasta alcanzar un punto de equilibrio, que en todos los casos se logró después de 4 minutos. El equilibrio se alcanza cuando las fuerzas de hinchamiento son contrarrestadas por las fuerzas retráctiles inducidas por el entrecruzamiento de la red polimérica [108].

Las membranas densas PA0.02, PA0.08 y PA1G2.5 absorbieron 13.83, 11.47 y 5.87 veces su propio peso. Por otro lado, las membranas con capa electrohilada absorbieron 16.99, 15.73 y 8.23 veces su propio peso. El grado de absorción de agua disminuye en ambos casos a medida que aumenta la cantidad de entrecruzante, esto se debe que el grado de entrecruzamiento del material modifica la capacidad de hinchamiento como se mencionaba anteriormente.

De esta manera, se observa que la capa electrohilada aumenta la absorción de agua, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en ángulo de contacto, donde se aprecia un incremento en la afinidad hidrofílica.



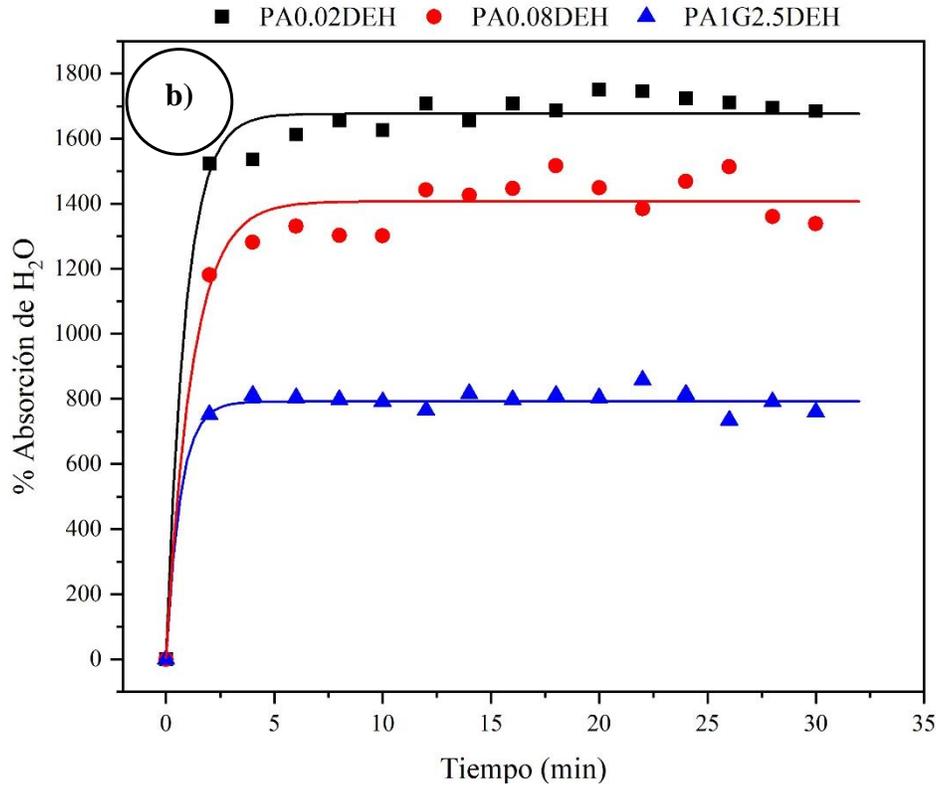


Figura 41. Gráficas de porcentaje de absorción de agua para a) las membranas densas, b) las membranas densas con una capa de electrohilado.

7.3.12 Evaluación de la permeación de las membranas

Las celdas de Franz se utilizan ampliamente para evaluar la penetración transepitelial y la liberación de fármacos, ya que permiten analizar la cinética de liberación. Una de las ventajas de este método es que requiere una pequeña cantidad del compuesto a liberar (menos de 1 g) en cada evaluación, y las variables que se controlan son la temperatura y la velocidad de agitación [109]. El uso de una celda de Franz es una excelente aproximación inicial para evaluar la eficiencia de las membranas fabricadas para su aplicación en hemodiálisis. Esto se debe en parte a la configuración de las membranas, que son planas en lugar de tubulares, siendo esta última la forma en que suelen presentarse comercialmente para las máquinas de hemodiálisis. Al ser planas, resultan adecuadas para su uso en la celda de Franz, y la cantidad de muestra requerida es mínima, con un área aproximada de 17.35 cm². Además, la celda de Franz permite simular el transporte por difusión de solutos a través de una membrana bajo condiciones controladas de laboratorio, midiendo con precisión la permeabilidad y selectividad. Asimismo, utiliza pequeños volúmenes de muestra fisiológica, suero en este caso, lo que la convierte en una opción ideal para pruebas preliminares de bajo costo. De este modo, la celda de Franz es una herramienta eficiente para estudios iniciales antes de avanzar a sistemas más complejos.

En este contexto, el suero se utiliza como medio donador para simular las condiciones fisiológicas. El suero es el líquido que se separa de la sangre una vez que ha ocurrido la

coagulación, es decir, es el plasma sin fibrinógeno ni factores de coagulación. Está compuesto principalmente por agua, electrolitos, anticuerpos, proteínas (excepto los agentes coagulantes), hormonas, lípidos y productos de desecho metabólicos, como urea, ácido úrico y creatinina [110]. Como se señaló en el marco teórico, los riñones tienen un rol esencial en la excreción de desechos como son la urea, creatinina y ácido úrico [111].

Es así que se optó por utilizar suero diluido en una proporción 1:5 con PBS para obtener los 5 mL necesarios para llenar el compartimiento donador. Los analitos, como el ácido úrico, la urea y la creatinina, se cuantificaron mediante una técnica de análisis clínico denominada química seca utilizando tiras reactivas para pruebas de función renal. A continuación, se presentan las gráficas correspondientes a cada uno de los analitos (ver Figura 42, Figura 43, Figura 44).

El primer analito cuantificado fue el ácido úrico, el cual es el producto final del catabolismo de purinas en humanos. Este ácido orgánico débil se presenta principalmente como sal monosódica en condiciones fisiológicas. En estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos, se ha establecido un límite superior de 7.0 mg/dL en hombres adultos y 6.0 mg/dL en mujeres adultas. Niveles superiores a estos valores conducen a la formación de cristales [112]. En el análisis realizado, se incluyó un control sano con un valor de 1.513 mg/dL y un control enfermo con valor de 20.172 mg/dL, estos valores servirán como parámetros de referencia.

En la Figura 42 se presenta el gráfico de las concentraciones de ácido úrico registradas y se puede observar que todas las membranas tienen un comportamiento lineal con ligeros aumentos en dicha concentración. Dado que las muestras provienen de sangre sin antecedentes de enfermedades renales, los valores obtenidos están cerca del nivel considerado como control sano (1.513 mg/dL). En todas las membranas se permite el paso de ácido úrico, lo cual es positivo considerando que la sangre circula continuamente en el proceso de hemodiálisis. Incluso, los valores parecen coincidir con el control sano, lo que sugiere que las membranas están dejando pasar casi todo el ácido úrico desde los primeros momentos. La membrana PA0.08 mostró una mayor concentración de ácido úrico en las alícuotas, lo que podría deberse a la cantidad de analito presente en esa muestra específica de suero, considerando que las muestras fueron tomadas en diferentes días.

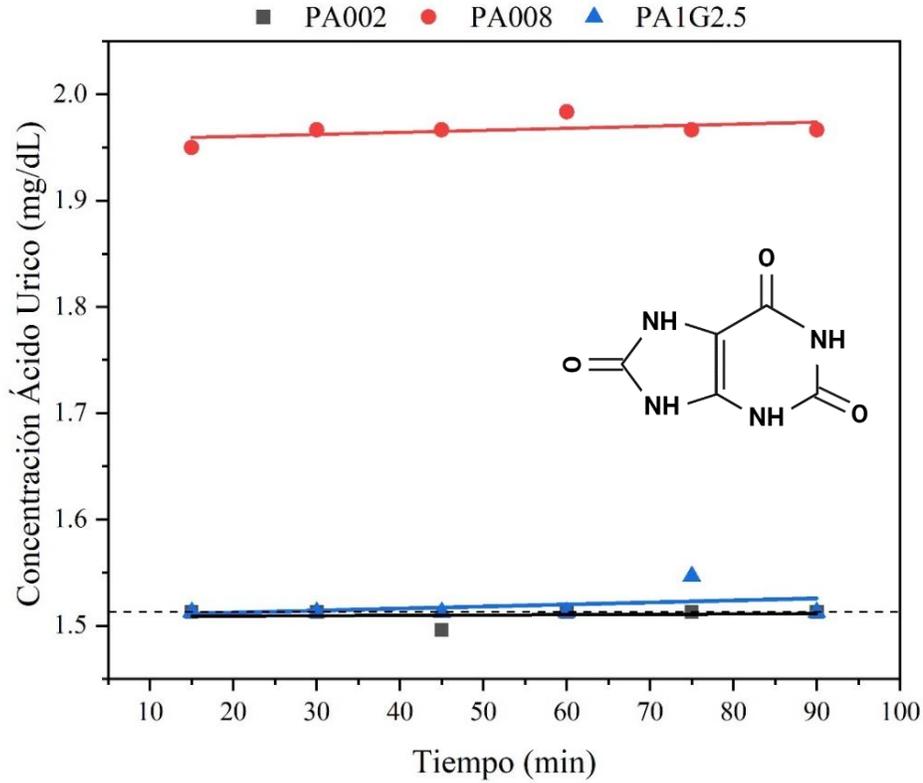


Figura 42. Gráfica de la concentración de ácido úrico registrado en plazos de tiempo de 15 minutos.

Respecto a la creatinina, que es un compuesto nitrogenado no proteico producido por la descomposición de la creatina en los músculos, se encuentra en el suero, plasma y orina, y es excretada mediante filtración glomerular [113]. En este análisis, el control sano registra un valor de 0.633 mg/dL, mientras que el control enfermo es de 14.703 mg/dL. Las membranas PA0.02 y PA1G2.5 muestran valores por debajo del control sano, lo que sugiere que permiten el paso de la creatinina, aunque no en su totalidad. Por otro lado, la membrana PA0.08 presenta un valor superior al control sano, lo que indicaría que permite el paso total de la creatinina en la muestra de suero.

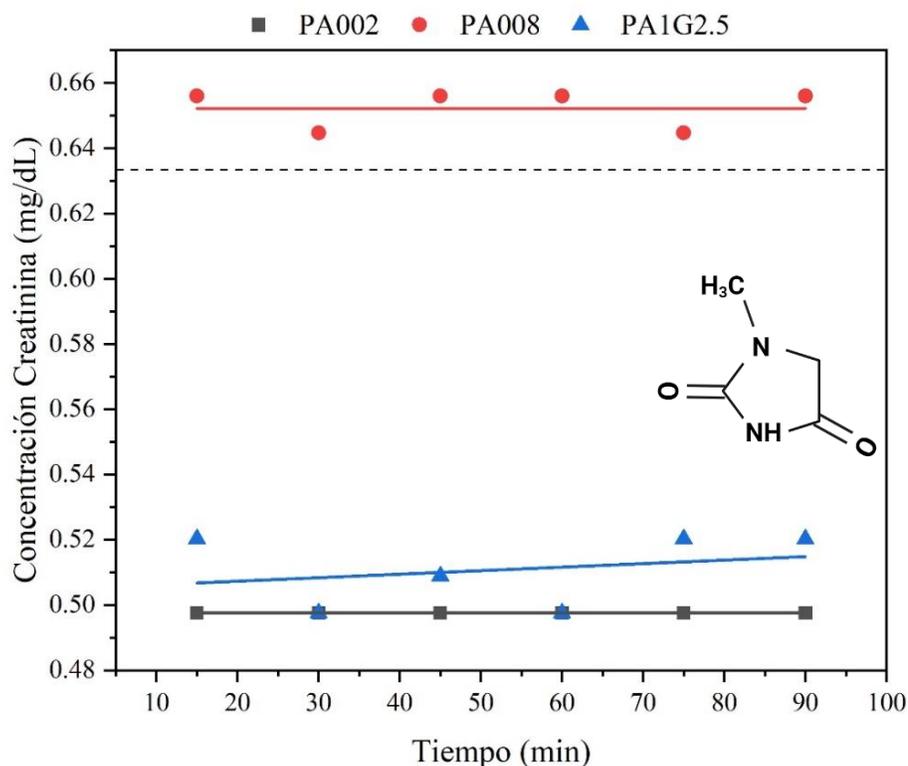


Figura 43. Gráfica de la concentración de creatinina registrado en plazos de tiempo de 15 minutos

Finalmente, el último analito evaluado fue la urea, el principal metabolito derivado de la proteína dietética y del recambio de proteínas tisulares. El rango normal de urea nitrogenada en sangre o suero es de 5 a 20 mg/dL [112]. En este caso, el control sano presentó un valor de 5.405 mg/dL, mientras que el control enfermo fue de 240.24 mg/dL. Se observó un patrón similar al de los otros analitos: la membrana PA0.08 mostró la mayor concentración de urea, lo que podría deberse a que la muestra de suero contenía una mayor cantidad de este compuesto. Sin embargo, en las tres membranas los valores obtenidos superaron el control sano, lo que sugiere que permitieron el paso total de la urea a través de ellas.

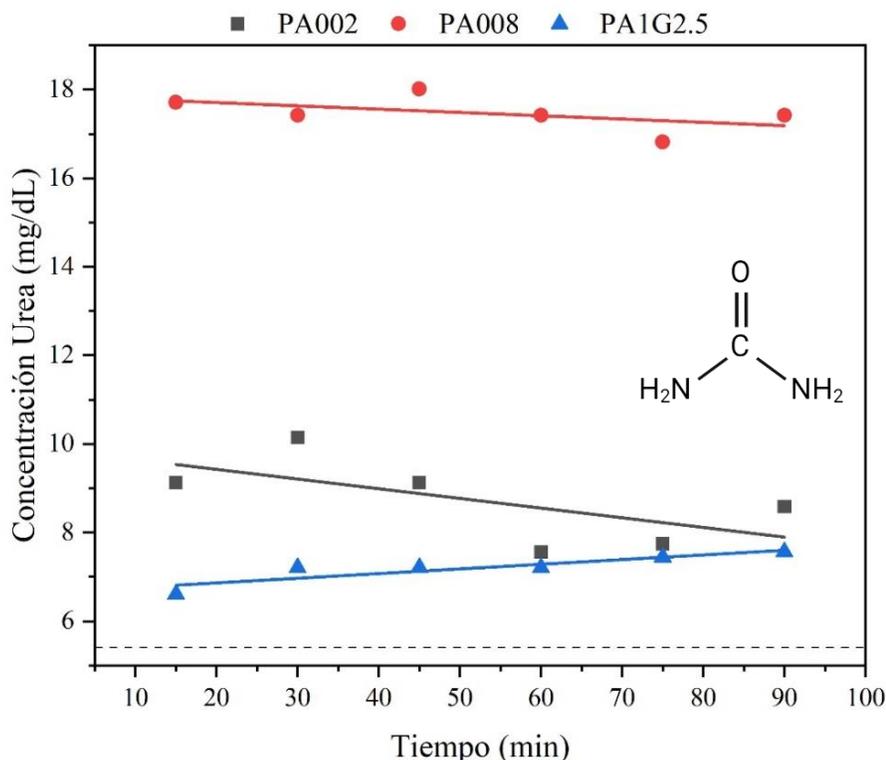


Figura 44. Gráfica de la concentración de urea registrado en plazos de tiempo de 15 minutos

Los resultados obtenidos demuestran que las membranas fabricadas permiten el paso de ácido úrico, creatinina y urea, proporcionando una aproximación sobre su eficiencia y comportamiento en contacto con fluidos fisiológicos. Es importante seguir evaluando las membranas en condiciones que se asemejen lo más posible al proceso de hemodiálisis, así como analizar sus propiedades mecánicas en un entorno real. Además, las membranas utilizadas en este ensayo fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido para analizar el ensuciamiento causado por la acumulación de proteínas o la posible saturación de su superficie.

7.3.13 SEM: Caracterización de membranas empleadas en la evaluación de eficiencia con celda de Franz.

Las membranas que estuvieron en contacto con el suero, en la celda Franz, fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para identificar su ensuciamiento. Además, se llevaron a cabo análisis EDS en ciertas áreas para identificar la composición de los aglomerados observados. Las imágenes obtenidas se presentan en la Figura 45.

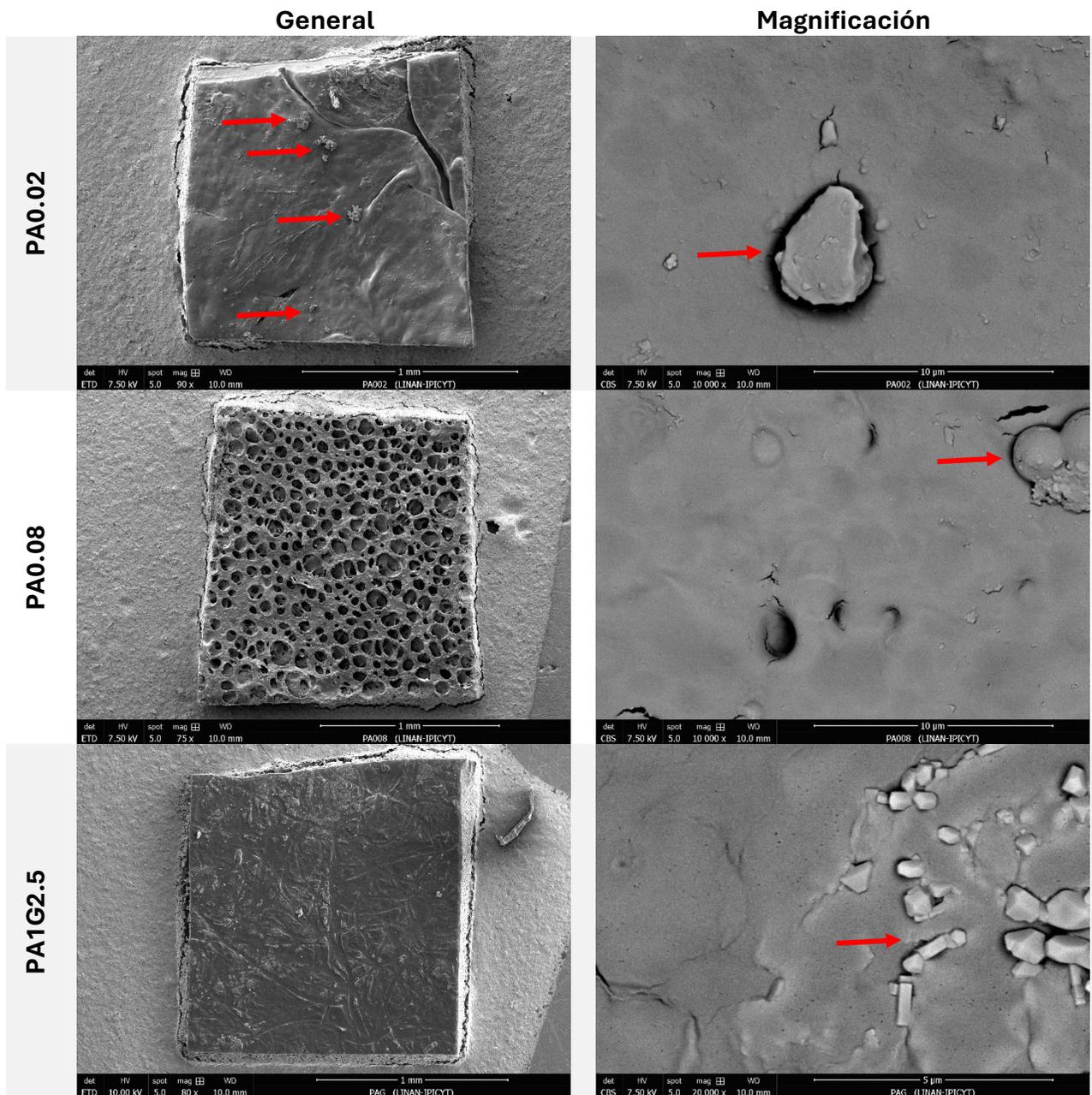


Figura 45. Las imágenes obtenidas mediante SEM incluyen vistas generales capturadas con electrones secundarios. En cuanto a las imágenes con una ampliación de 10 000x, éstas fueron generadas por electrones retrodispersados para resaltar la presencia de composiciones diferentes a la matriz polimérica.

La membrana PA0.02 se observa una imagen con una apariencia lisa, aunque se distinguen pequeñas protuberancias marcadas con flechas rojas, en la magnificación realizada (ver Figura 45 sección “Magnificación”) se puede distinguir con mayor nitidez una de estas aglomeraciones. A este aglomerado se decidió realizar un análisis EDS para obtener un perfil elemental semicuantitativo (ver Figura 46). El análisis reveló que la protuberancia está compuesta principalmente de carbono y oxígeno, seguido de silicio, sodio, aluminio y hierro. Dado que no se detectó nitrógeno, es poco probable que se trate de un aglomerado proteico, ya que las proteínas están formadas por aminoácidos que contienen grupos amino (NH_2) y

[114]. En el suero, el calcio se presenta de tres formas: unido a proteínas, en estado ionizado y en forma de complejos o quelados. El calcio unido a proteínas, que representa el 40% del calcio sérico, no es utilizable por los tejidos. Las principales proteínas que se unen al calcio en el suero son la albúmina y las globulinas. El calcio quelado, que representa el 9% del calcio sérico, facilita la absorción del calcio por diversos tejidos o su transporte entre las distintas partes del cuerpo. A menudo, el calcio sérico se encuentra quelado en complejos iónicos de fosfato de calcio, carbonato de calcio y oxalato de calcio. Por último, el calcio libre, que constituye el 51% del calcio sérico, es utilizado por el organismo para mantener funciones fisiológicas [117].

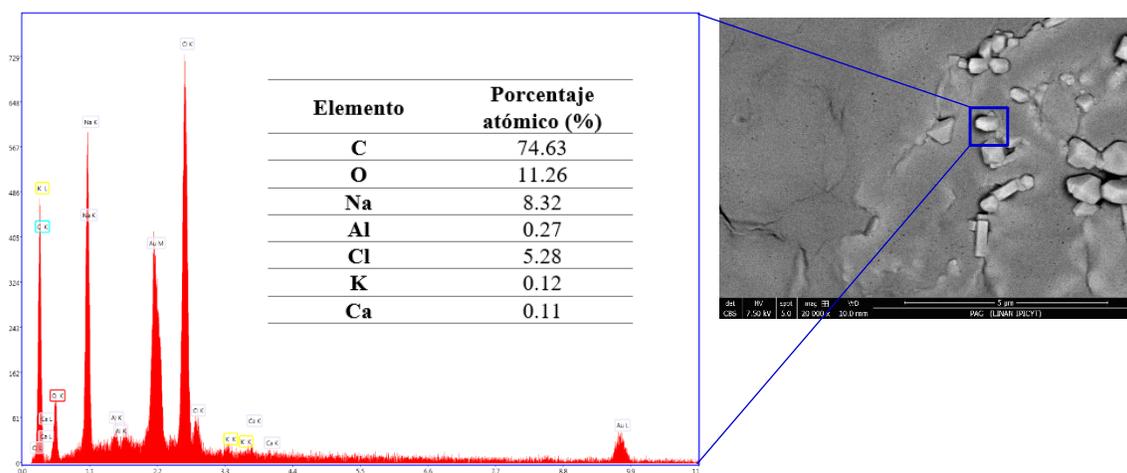


Figura 47. Imagen de la membrana PA1G2.5 obtenida por SEM mediante electrones retrodispersados con una magnificación de 10 000x en donde se señala la zona en donde se realizó el análisis EDS con los respectivos porcentajes atómicos.

En resumen, no se observan cúmulos de proteínas séricas (como albúmina y globulina) [114], lo que sugiere que no hay evidencia de ensuciamiento ni adherencia de proteínas en las membranas. Sin embargo, las membranas muestran lo que parecen ser cristalizaciones de los electrolitos presentes en el suero. Estas cristalizaciones podrían haberse formado después del proceso de secado, lo que indicaría que las sales no necesariamente afectaron el rendimiento de las membranas durante su uso.

7.4 Notas finales del capítulo

Dado los resultados obtenidos, podemos dar paso a las notas finales del capítulo. Es posible fabricar membranas densas de PVOH entrecruzado utilizando bajas cantidades molares de ácido cítrico o altas cantidades molares de ácido cítrico, pero con la adición de un agente entrecruzante como el glicerol. Esto se debe a que un exceso de ácido cítrico favorece la funcionalización de las cadenas de PVOH, lo cual favorece su solubilización, pero en presencia de glicerol se lleva a cabo una segunda esterificación que resulta en el entrecruzamiento. De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de MTT y hemólisis, se puede afirmar que las soluciones con baja relación molar del ácido cítrico muestran una mayor citocompatibilidad, ya que presentaron una mayor absorbancia que el control negativo. Además, también muestran buena hemocompatibilidad, con un porcentaje de

hemólisis inferior al 2%, lo que las categoriza como materiales no hemolíticos de acuerdo con la norma ASTM F756-17. Las soluciones con bajas relaciones molares PVOH:AC se pueden procesar mediante electrohilado, mientras que las soluciones que contienen glicerol tienen una alta humectabilidad que no les permite formar fibras. La formación de fibras en las membranas electrohiladas, así como la presencia de poros en la capa densa, fue confirmada mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). Se determinó que el tamaño de poro en las membranas PA0.02 fue de 487 nm, mientras que la membrana PA0.08 presentó un comportamiento bimodal, con tamaños de poro de 355.76 nm y 606.25 nm. De manera similar, la membrana PA1G2.5 mostró una distribución bimodal, con tamaños de poro de 5.923 y 13.212 micras. Esta diferencia significativa en el tamaño de los poros entre las membranas con únicamente ácido cítrico y las que contienen glicerol podría atribuirse al efecto plastificante del glicerol, que inhibe la formación de poros pequeños.

Respecto al diámetro de las fibras, se observaron valores de 68 nm para PA0.02, 71 nm para PA0.08 y 80 nm para PA1G2.5. Finalmente, el espesor de las membranas fue de 76 micras para PA0.02, 63 micras para PA0.08 y 66 micras para PA1G2.5. Estos resultados evidencian cómo la composición de la solución y la adición de aditivos como el glicerol influyen directamente en la morfología y estructura de las membranas, lo cual puede tener un impacto significativo en su eficiencia.

La cantidad de ácido cítrico modifica las propiedades térmicas; puntualmente, se observa un incremento de la T_g y la desaparición de la región regular, como consecuencia del entrecruzamiento que promueve con los grupos -OH del PVOH. Las membranas fabricadas son de naturaleza hidrofílica, lo cual es favorable para su aplicación en el proceso de hemodiálisis.

Se observó que las muestras presentan una alta rugosidad superficial y una topografía heterogénea. En el caso de las membranas densas, el lado en contacto con la placa de vidrio fue más liso, mientras que el lado expuesto al ambiente presentó mayor rugosidad y porosidad. Este comportamiento es relevante, ya que superficies más rugosas tienden a acumular suciedad con mayor facilidad, lo cual puede afectar negativamente el rendimiento de la membrana. Entre todas las composiciones analizadas, la formulación PA0.08 mostró los menores valores de rugosidad, tanto en su versión densa como con capa electrohilada, lo que sugiere una mejor estabilidad superficial.

Todas las formulaciones de membranas presentaron un nivel de porosidad en torno al 66%, valor similar a los reportados en la literatura para membranas de polisulfona utilizadas en aplicaciones como la hemodiálisis. Este resultado indica que las condiciones de fabricación permitieron obtener estructuras porosas adecuadas.

Las membranas alcanzaron el equilibrio de absorción de agua a los 4 minutos, con una capacidad de retención equivalente a entre 6 y 17 veces su propio peso. Se evidenció que las membranas con capa electrohilada mostraron una mayor hidrofiliidad, reflejada en el

aumento de agua absorbida, lo cual respalda los resultados obtenidos en la medición del ángulo de contacto.

En conjunto, estos hallazgos demuestran cómo la configuración estructural (como la adición de una capa electrohilada) y la formulación influyen directamente en las propiedades fisicoquímicas de las membranas.

En cuanto a la eficiencia de las membranas, se observó que permiten el paso de ácido úrico, creatinina y urea, y que el ensuciamiento aparente se debe a la cristalización de electrolitos tras el proceso de secado, sin evidencia de adherencia de proteínas. Estos resultados proporcionan una buena aproximación del comportamiento de las membranas; sin embargo, aún se requieren mayores esfuerzos para confirmar esta tendencia y realizar más evaluaciones bajo condiciones que se asemejen al proceso real de hemodiálisis.

CAPÍTULO VIII

Una mirada al futuro

“We are curious, we want to understand the world, we want to become scientists”

- Benjamin List

Como se mencionó en el marco teórico, las membranas utilizadas en hemodiálisis han representado una alternativa vital para los pacientes con insuficiencia renal. No obstante, este tratamiento aún presenta áreas de oportunidad, ya que la tasa de mortalidad entre los pacientes sigue siendo elevada. A ello se suman diversas complicaciones asociadas, como enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, enfermedad vascular periférica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica [10].

Esto evidencia que el proceso de hemodiálisis aún no logra emular completamente la función natural del riñón. Por esta razón, se han explorado nuevas tecnologías emergentes como los riñones artificiales portátiles, las terapias basadas en células madre, los riñones bioartificiales y los sistemas Organ-on-a-Chip [118]. Esta última tecnología se presenta como una alternativa prometedora debido a su capacidad para mimetizar órganos y tejidos humanos mediante el control de pequeñas cantidades de flujo. Esto permite la observación directa del comportamiento celular y tisular fuera del cuerpo [119]. Estos dispositivos están diseñados para emular el entorno in vivo de los órganos, lo que habilita estudios en tiempo real sobre interacciones celulares, respuestas a fármacos y progresión de enfermedades. Esta tecnología impulsa avances en medicina personalizada, reduce la dependencia de modelos animales y mejora la eficiencia en el descubrimiento y evaluación de fármacos [119], [120].

Es así que haciendo uso de esta tecnología, se busca imitar las funciones del riñón, recreando las tres capas del capilar glomerular. En este sistema, una membrana se posiciona entre canales microfluídicos y actúa como soporte para el cultivo de células [121].

En este contexto, durante mi estancia en la University of Saskatchewan, tuve la oportunidad de contribuir en este campo mediante la caracterización de membranas e incorporación de células para su uso en un chip. Los resultados de esta investigación serán próximamente publicados y forman parte de una investigación liderada por la Dr. Amira Abdelrasoul.

Conclusiones generales

“Everything starts as somebody’s daydream”

Larry Niven

9.1 Conclusiones generales

En el Capítulo 1 se establece el contexto y justificación del estudio, al evidenciar la gravedad de la enfermedad renal crónica y la importancia de la hemodiálisis como tratamiento. Desafortunadamente existen limitaciones en las membranas actuales, especialmente en términos de biocompatibilidad, lo que nos lleva a proponer una membrana basada en PVOH modificado con ácido cítrico y glicerol. Esta membrana está orientada a mejorar la eficiencia, biocompatibilidad y hemocompatibilidad.

En el Capítulo 2, se llevó a cabo una revisión bibliográfica que abarcó desde aspectos generales, como la anatomía y fisiología del riñón, hasta temas específicos relacionados con la hemodiálisis como tratamiento para pacientes con insuficiencia renal. Se revisaron las clasificaciones de las membranas según su tamaño de exclusión, así como las distintas técnicas de fabricación. Lo anterior brindó una base sólida para comprender los desafíos asociados a la fabricación de la membrana. Este capítulo permitió concluir que las membranas comerciales, principalmente fabricadas con PES y PSF, presentan problemas de compatibilidad. Asimismo, se observó que existen pocos esfuerzos dirigidos al uso del PVOH, a pesar de que este polímero es no tóxico, biodegradable y formador de membranas, presentando un perfil adecuado para aplicaciones en hemodiálisis.

Además, se realizó un análisis bibliométrico sobre investigaciones relacionadas con membranas de hemodiálisis, el cual mostró que el PVOH ha sido utilizado en aplicaciones biomédicas por su inocuidad en el cuerpo. También se identificó que las membranas esterificadas tienen potencial para su aplicación en este contexto. La revisión de patentes reveló una notable actividad científica, especialmente en países como Estados Unidos. Este panorama representa una valiosa oportunidad para el desarrollo e innovación tecnológica en México.

En el Capítulo 3 se detalló el uso de PVOH, ácido cítrico y glicerol en la generación de membranas mediante los métodos de inversión de fase y electrohilado. Las pruebas y técnicas

de caracterización, divididas en biológicas y fisicoquímicas, fueron seleccionadas con el objetivo de analizar las propiedades térmicas, químicas y biológicas del material.

En el Capítulo 4, se confirmó mediante espectroscopía FTIR, que la reacción entre el PVOH y el ácido cítrico procedió adecuadamente, a través de la formación del enlace éster entre ambas entidades, ya que se lograron identificar las bandas características de dicho enlace en 1215 y 1080 cm^{-1} . Además, la presencia de señales correspondientes a grupos carboxílicos (C=O en 1700 cm^{-1} y O-H en 1380 cm^{-1}) sugiere que la funcionalización fue exitosa, ya que se demostró la persistencia de estos grupos carboxílicos, aunado al hecho de que ocurrió la solubilidad del PVOH en agua, a temperatura ambiente, comportamiento que no presenta el PVOH sin funcionalizar.

Por otro lado, se requiere el entrecruzamiento del PVOH funcionalizado para generar membranas mecánicamente estables y resistentes. Lo anterior se consigue mediante la adición de ácido cítrico en bajas proporciones molares (1:0.02 y 1:0.08) favorece el entrecruzamiento de las cadenas de PVOH. Esto se atribuye a la menor cantidad de moléculas de ácido cítrico disponibles, lo que permite una reacción más eficiente de los tres grupos carboxílicos con los grupos hidroxilo del PVOH. De tal forma que hubo soluciones (PA0.02 y PA0.08) que sí generaron membranas al ser sometidas a un baño de coagulación, lo que indica un comportamiento prometedor para su aplicación.

En cuanto al uso de glicerol, se concluyó que la adición excesiva de éste favorece la generación de una segunda esterificación de los grupos carboxílicos que pudieran quedar libres. Además, las soluciones con glicerol fueron sometidas a pruebas en un baño de coagulación, donde se observó que no todas las soluciones lograron formar membranas. Esto sugiere que, en algunas relaciones, el glicerol no solo influye en el entrecruzamiento, sino que también puede afectar la capacidad de formación de membranas, debido al aumento en la solubilidad de la solución por puentes de hidrógeno entre el glicerol y el agua.

Se puede afirmar que las soluciones con baja relación molar del ácido cítrico exhiben mayor citocompatibilidad, y también muestran buena hemocompatibilidad, con un porcentaje de hemólisis inferior al 2%, lo que las categoriza como materiales no hemolíticos.

También, las soluciones con baja relación molar pueden ser procesadas mediante electrohilado, mientras que las soluciones que contienen glicerol presentan una alta humectabilidad que dificulta la formación de fibras. Se observó que la adición de una capa electrohilada sobre una membrana densa no presenta características superiores en comparación con la membrana exclusivamente densa.

La cantidad de ácido cítrico modifica las propiedades térmicas, como consecuencia del entrecruzamiento que promueve con los grupos -OH del PVOH. Las membranas fabricadas son de naturaleza hidrofílica, lo cual es favorable para su aplicación en el proceso de hemodiálisis.

En cuanto a la eficiencia de las membranas, se observó que permiten el paso de ácido úrico, creatinina y urea, y que el ensuciamiento aparente se debe a la cristalización de electrolitos tras el proceso de secado, sin evidencia de adherencia de proteínas. Estos resultados proporcionan una aproximación del comportamiento de las membranas; sin embargo, aún se requieren mayores esfuerzos para confirmar esta tendencia y realizar más evaluaciones bajo condiciones que se asemejen al proceso real de hemodiálisis.

9.2 Notas finales

Las contribuciones de esta tesis incluyen la creación de una membrana a base de PVOH, entrecruzada con ácido cítrico o funcionalizada con ácido cítrico y entrecruzada con glicerol, cuya composición presenta una mayor biocompatibilidad y hemocompatibilidad, según los resultados de las pruebas biológicas.

Aunque la hemodiálisis es un proceso imperfecto, la propuesta de una nueva membrana podría representar una mejora inmediata mientras se desarrollan tratamientos más seguros.

Además, la membrana fabricada podría utilizarse en nuevas aproximaciones que buscan mimetizar la función renal, al servir como soporte celular y, al mismo tiempo, realizar funciones de filtración.

9.3 Retos y recomendaciones

En esta sección se presentan los principales retos asociados a las membranas de PVOH entrecruzada con ácido cítrico o funcionalizada con ácido cítrico y entrecruzada con glicerol.

Uno de los desafíos identificados es la necesidad de estandarizar la técnica de fabricación, con el fin de obtener membranas con una rugosidad uniforme y características superficiales consistentes.

Otro reto importante consiste en realizar ensayos mecánicos para verificar que el material cumpla con las propiedades necesarias para soportar la presión ejercida por los flujos presentes en un entorno real.

Además, sería recomendable comenzar a desarrollar un prototipo que permita avanzar en esta línea de investigación, al mismo tiempo que se exploran vías para incorporar tecnologías más avanzadas, como la incorporación de células *ad-hoc*.

9.4 Productos científicos

9.4.1 Lista de publicaciones

Muñoz-Macías J.J., Al Hassan M., Abdelrasoul A. Advancing Biocompatible Membranes (Manuscrito en proceso)

Muñoz-Macías J.J., Alcántara-Quintana, L.E., Escobar-Barríos, V.A. Effect of Chemical Modifications on the Structure and Biocompatibility of PVOH-Based Membranes for Potential Use in Hemodialysis. (Manuscrito en proceso)

9.4.2 Presentación oral en Congreso Internacional

Muñoz-Macías JJ; Escobar-Barrios, VA. The effect of type of processing in obtaining membranes based on esterified Poly(vinyl alcohol) (PVOH). 39th International Conference of the Polymer Processing Society, 19-23 Mayo 2024, Cartagena de Indias, Colombia.

10.1 Referencias

- [1] N. Said, W. J. Lau, Y. C. Ho, S. K. Lim, M. N. Zainol Abidin, and A. F. Ismail, “A review of commercial developments and recent laboratory research of dialyzers and membranes for hemodialysis application,” Oct. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/membranes11100767.
- [2] D. C. Crews *et al.*, “Burden, access, and disparities in kidney disease,” *Kidney Int*, vol. 95, no. 2, pp. 242–248, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.KINT.2018.11.007.
- [3] K. J. Jager, C. Kovesdy, R. Langham, M. Rosenberg, V. Jha, and C. Zoccali, “A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases,” *Kidney Int*, vol. 96, no. 5, pp. 1048–1050, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.KINT.2019.07.012.
- [4] K. J. Foreman *et al.*, “Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories,” *The Lancet*, vol. 392, no. 10159, pp. 2052–2090, 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)31694-5.
- [5] A. Treviño-Becerra, “Editorial Insuficiencia renal crónica: enfermedad emergente, catastrófica y por ello prioritaria,” *Cir Cir*, vol. 72, no. 1, pp. 3–4, 2004.
- [6] INEGI, “ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS (EDR) 2022,” Jul. 2023. Accessed: Feb. 17, 2024. [Online]. Available: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/EDR/EDR2022.pdf>
- [7] Instituto Mexicano del Seguro Social, “Informe al Ejecutivo Federal y al Congreso de la Unión sobre la Situación Financiera y los Riesgos del Instituto Mexicano del Seguro Social 2022-2023,” Ciudad de México, 2023. Accessed: Feb. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/pdf/informes/20222023/19-informe-completo.pdf>
- [8] Naciones Unidas, “Objetivo 3: Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades.” Accessed: Mar. 28, 2024. [Online]. Available: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/health/>
- [9] I. Geremia and D. Stamatialis, “Innovations in dialysis membranes for improved kidney replacement therapy,” Oct. 01, 2020, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41581-020-0293-6.
- [10] A. Mollahosseini, A. Abdelrasoul, and A. Shoker, “Challenges and Advances in Hemodialysis Membranes,” in *Advances in Membrane Technologies*, A. Abdelrasoul, Ed., Rijeka: IntechOpen, 2020, ch. 7. doi: 10.5772/intechopen.90643.

- [11] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, and G. M. Whitesides, “A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein,” Sep. 04, 2001. doi: 10.1021/la010384m.
- [12] P. Thevenot, W. Hu, and L. Tang, “Surface chemistry influences implant biocompatibility,” *Curr Top Med Chem*, vol. 8, no. 4, pp. 270–280, 2008, doi: 10.2174/156802608783790901.
- [13] E. R. Radu, S. I. Voicu, and V. K. Thakur, “Polymeric Membranes for Biomedical Applications,” Feb. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/polym15030619.
- [14] R. Soriano, D. Penfold, and S. Leslie, “Anatomy, Abdomen and Pelvis: Kidneys.” Accessed: Aug. 08, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482385/>
- [15] G. J. Tortora and B. Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiology*, 13th ed. John Wiley & Sons, Inc, 2013.
- [16] J. Hall and M. Hall, *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, 14th ed. Canada: Elsevier, 2021.
- [17] A. Gautham, M. Muhammed, M. Manavalan, and A. Mansoor, “HEMODIALYSIS MEMBRANES: PAST, PRESENT AND FUTURE TRENDS,” *International Research Journal of Pharmacy*, vol. 4, no. 5, pp. 16–19, May 2013, doi: 10.7897/2230-8407.04505.
- [18] O. Swift, E. Vilar, and K. Farrington, “Haemodialysis,” in *Medicine*, vol. 47, 2019, pp. 596–602. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.06.004>.
- [19] J. Himmelfarb and M. H. Sayegh, *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation: companion to Brenner & Rector’s the kidney*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2010.
- [20] A. T. Azar, Ed., *Modeling and Control of Dialysis Systems*, vol. 405. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. doi: 10.1007/978-3-642-27558-6.
- [21] K. Sakai, “Dialysis membranes for blood purification,” *Frontiers Med. Biol. Engng*, vol. 10, no. 2, pp. 117–129, Oct. 2000, doi: 10.1163/15685570052061973.
- [22] D. Ponce, M. Gobo-Oliveira, and A. L. Balbi, “Peritoneal Dialysis Treatment Modality Option in Acute Kidney Injury,” Mar. 01, 2017, *S. Karger AG*. doi: 10.1159/000452703.
- [23] Y. A. Chen, S. M. Ou, and C. C. Lin, “Influence of Dialysis Membranes on Clinical Outcomes: From History to Innovation,” Feb. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/membranes12020152.

- [24] F. Mohammadi, F. Mohammadi, and Z. Yavari, “Characterization of the cylindrical electrospun nanofibrous polysulfone membrane for hemodialysis with modelling approach,” *Med Biol Eng Comput*, vol. 59, no. 7–8, pp. 1629–1641, Aug. 2021, doi: 10.1007/s11517-021-02404-z.
- [25] C. Ronco and W. R. Clark, “Haemodialysis membranes,” Jun. 01, 2018, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/s41581-018-0002-x.
- [26] J. Daugirdas, P. Blake, and T. Ing, Eds., *Handbook of dialysis*, 5th ed. 2015.
- [27] R. Vanholder *et al.*, “Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability,” *Kidney Int*, vol. 63, no. 5, pp. 1934–1943, May 2003, doi: 10.1046/J.1523-1755.2003.00924.X.
- [28] A. Mehta, R. Chandiramani, A. Spirito, B. Vogel, and R. Mehran, “Significance of Kidney Disease in Cardiovascular Disease Patients,” *Interv Cardiol Clin*, vol. 12, no. 4, pp. 453–467, Oct. 2023, doi: 10.1016/J.ICCL.2023.06.006.
- [29] E. R. Radu and S. I. Voicu, “Functionalized Hemodialysis Polysulfone Membranes with Improved Hemocompatibility,” Mar. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/polym14061130.
- [30] R. Vanholder, “Biocompatibility Issues in Hemodialysis,” *Clin Mater*, vol. 10, pp. 87–133, 1992.
- [31] H. Strathmann and H. Göhl, “Membranes for Blood Purification: State of the Art and New Developments,” 1990.
- [32] U. Eduok, A. Abdelrasoul, A. Shoker, and H. Doan, “Recent developments, current challenges and future perspectives on cellulosic hemodialysis membranes for highly efficient clearance of uremic toxins,” *Mater Today Commun*, vol. 27, p. 102183, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.MTCOMM.2021.102183.
- [33] H. Schiffli, S. M. Lang, and M. Haider, “Bioincompatibility of Dialyzer Membranes May Have a Negative Impact on Outcome of Acute Renal Failure, Independent of the Dose of Dialysis Delivered,” *ASAIO Journal*, vol. 44, no. 5, pp. 418–422, 1998, doi: 10.1097/00002480-199809000-00019.
- [34] “SUREFLUX™ DIALYZER.” Accessed: Mar. 26, 2024. [Online]. Available: <https://niproasia.com.sg/product/sureflux-dialyzer/>
- [35] D. Zhong, Z. Wang, J. Zhou, and Y. Wang, “Additive-free preparation of hemodialysis membranes from block copolymers of polysulfone and polyethylene glycol,” *J Memb Sci*, vol. 618, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.memsci.2020.118690.
- [36] N. J. Kaleekkal, A. Thanigaivelan, M. Tarun, and D. Mohan, “A functional PES membrane for hemodialysis - Preparation, Characterization and Biocompatibility,”

- Chin J Chem Eng*, vol. 23, no. 7, pp. 1236–1244, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.cjche.2015.04.009.
- [37] Fresenius Medical Care, “FX high-flux and FX low-flux dialyzers.” Accessed: Sep. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.freseniusmedicalcare.com/en/healthcare-professionals/hemodialysis/dialyzers/fx-high-and-low-flux-dialyzers>
- [38] BBraun, “Xevonta® Dialyzer.” Accessed: Mar. 27, 2024. [Online]. Available: <https://www.bbraunusa.com/en/products/b4/xevonta-syntheticdialyzer.html>
- [39] WEGO, “Low Flux High Performance Series.” Accessed: Mar. 27, 2024. [Online]. Available: <https://www.wego-healthcare.com/en/pdf/201611231729414828.jpg>
- [40] “ELISIO.” Accessed: Sep. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.nipro-group.com/sites/default/files/2023-06/MM-2270%20-%20Elisio%20A3%20-%20Trifold%20-%20ES%20-%2004Jan2022%20-%20Approved.pdf>
- [41] W. Oshihara, H. Fujieda, and Y. Ueno, “A New Poly(Methyl Methacrylate) Membrane Dialyzer, NF, with Adsorptive and Antithrombotic Properties,” in *Contributions to Nephrology*, S. Karger AG, 2016, pp. 230–236. doi: 10.1159/000450806.
- [42] Toray, “Hollow Fiber Dialyzer: Filtryzer BG-U Series .” Accessed: Mar. 26, 2024. [Online]. Available: <https://pdf.medicalexpo.es/pdf-en/toray/new-pmma-membrane-better-quality-life/95057-258817.html#open779700>
- [43] W. Zhang *et al.*, “Surface modification of AO-PAN@OHeC nanofiber membranes with amino acid for antifouling and hemocompatible properties,” *Appl Surf Sci*, vol. 475, pp. 934–941, May 2019, doi: 10.1016/J.APSUSC.2018.12.179.
- [44] A. B. Da Silva and R. E. S. Bretas, “Preparation and characterization of PA6/PAni-TSA nanofibers,” *Synth Met*, vol. 162, no. 17–18, pp. 1537–1545, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.synthmet.2012.07.018.
- [45] “Polyflux L,” Baxter. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: <https://renalcare.baxterhealthcare.co.uk/products/hd-product-portfolio>
- [46] F. Galiano, K. Briceño, T. Marino, A. Molino, K. V. Christensen, and A. Figoli, “Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications,” *J Memb Sci*, vol. 564, pp. 562–586, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2018.07.059.
- [47] O. Azhar, Z. Jahan, F. Sher, M. B. K. Niazi, S. J. Kakar, and M. Shahid, “Cellulose acetate-polyvinyl alcohol blend hemodialysis membranes integrated with dialysis performance and high biocompatibility,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 126, p. 112127, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.MSEC.2021.112127.

- [48] C. Amri, M. Mudasir, D. Siswanta, and R. Roto, "In vitro hemocompatibility of PVA-alginate ester as a candidate for hemodialysis membrane," *Int J Biol Macromol*, vol. 82, pp. 48–53, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.021.
- [49] E. G. Bowry, J. Vienken, and K. Sudhir, "Contribution of Polysulfone Membranes to the Success of Convective Dialysis Therapies," *Contrib Nephrol. Basel, Karger*, vol. 173, pp. 110–118, 2011, doi: 10.1159/000328960.
- [50] A. Boschetti-De-Fierro, W. Beck, H. Hildwein, B. Krause, M. Storr, and C. Zweigart, "Membrane Innovation in Dialysis," *Contrib Nephrol*, vol. 191, pp. 100–114, 2017, doi: 10.1159/000479259.
- [51] J. Ren and R. Wang, "Preparation of Polymeric Membranes," in *Membrane and Desalination Technologies*, Humana Press, 2011, pp. 47–100. doi: 10.1007/978-1-59745-278-6_2.
- [52] M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, Second. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996.
- [53] H. S. Lau *et al.*, "State-of-the-Art Organic-and Inorganic-Based Hollow Fiber Membranes in Liquid and Gas Applications: Looking Back and Beyond," May 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/membranes12050539.
- [54] A. Mollahosseini, A. Abdelrasoul, and A. Shoker, "A critical review of recent advances in hemodialysis membranes hemocompatibility and guidelines for future development," *Mater Chem Phys*, vol. 248, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.122911.
- [55] McGill University, "What is Sustainability?" Accessed: Jul. 28, 2024. [Online]. Available: <https://www.mcgill.ca/sustainability/files/sustainability/what-is-sustainability.pdf>
- [56] Naciones Unidas, "Objetivo 12: Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles." Accessed: Jul. 28, 2024. [Online]. Available: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-consumption-production/>
- [57] O. W. Guirguis and M. T. H. Moselhey, "Thermal and structural studies of poly (vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends," *Nat Sci (Irvine)*, vol. 04, no. 01, pp. 57–67, 2012, doi: 10.4236/ns.2012.41009.
- [58] J. H. Jiang, L. P. Zhu, X. L. Li, Y. Y. Xu, and B. K. Zhu, "Surface modification of PE porous membranes based on the strong adhesion of polydopamine and covalent immobilization of heparin," *J Memb Sci*, vol. 364, no. 1–2, pp. 194–202, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.memsci.2010.08.017.

- [59] L. Li *et al.*, “Modification of polyethersulfone hemodialysis membrane by blending citric acid grafted polyurethane and its anticoagulant activity,” *J Memb Sci*, vol. 405–406, pp. 261–274, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.memsci.2012.03.015.
- [60] V. Scaravilli *et al.*, “Effects of sodium citrate, citric acid and lactic acid on human blood coagulation,” *Perfusion (United Kingdom)*, vol. 33, no. 7, pp. 577–583, Oct. 2018, doi: 10.1177/0267659118777441.
- [61] H. Poerwono *et al.*, “Citric Acid,” in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, vol. 28, no. C, Elsevier Inc., 2001, pp. 1–76. doi: 10.1016/S1075-6280(01)28002-1.
- [62] M. Wrzecionek, G. Matyszczyk, A. Bandzerewicz, P. Ruśkowski, and A. Gadomska-Gajadur, “Kinetics of Polycondensation of Citric Acid with Glycerol Based on a Genetic Algorithm,” *Org Process Res Dev*, vol. 25, no. 2, pp. 271–281, Feb. 2021, doi: 10.1021/acs.oprd.0c00492.
- [63] E. Olsson, C. Menzel, C. Johansson, R. Andersson, K. Koch, and L. Järnström, “The effect of pH on hydrolysis, cross-linking and barrier properties of starch barriers containing citric acid,” *Carbohydr Polym*, vol. 98, no. 2, pp. 1505–1513, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2013.07.040.
- [64] A. G. Gereziher and T. Szabó, “Crosslinking of Starch Using Citric Acid,” in *Journal of Physics: Conference Series*, Institute of Physics, 2022. doi: 10.1088/1742-6596/2315/1/012036.
- [65] K.-J. Kim, S.-B. Lee, and N.-W. Han, “Effects of the Degree of Crosslinking on Properties of Poly(vinyl alcohol) Membranes,” *Polym J*, vol. 25, no. 12, pp. 1295–1302, 1993, doi: <https://doi.org/10.1295/polymj.25.1295>.
- [66] J. Zanol, C. Suliani, J. Duarte, C. Baldasso, J. da Silva Crespo, and M. Giovanela, “Development of poly(vinyl alcohol)-based membranes by the response surface methodology for environmental applications,” *REGET*, vol. 24, no. 5, 2020, Accessed: Mar. 30, 2024. [Online]. Available: <https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/62660/html>
- [67] M. L. N. Oliveira, R. A. Malagoni, and M. R. Franco, “Solubility of citric acid in water, ethanol, n-propanol and in mixtures of ethanol + water,” *Fluid Phase Equilib*, vol. 352, pp. 110–113, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.FLUID.2013.05.014.
- [68] N. Colthup, L. Daly, and S. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman spectroscopy*, 3rd ed. London: ACADEMIC PRESS LIMITED, 1990.
- [69] Y. L. Wang, H. Yang, and Z. L. Xu, “Influence of post-treatments on the properties of porous poly(vinyl alcohol) membranes,” *J Appl Polym Sci*, vol. 107, no. 3, pp. 1423–1429, Feb. 2008, doi: 10.1002/app.24712.

- [70] Y. B. Truong *et al.*, “Functional Cross-Linked Electrospun Polyvinyl Alcohol Membranes and Their Potential Applications,” *Macromol Mater Eng*, vol. 302, no. 8, Aug. 2017, doi: 10.1002/mame.201700024.
- [71] International Organization for Standardization, “ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity,” 2009.
- [72] Lehmann C. A., *Saunders Manual of Clinical Laboratory Science*, First edition. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1998.
- [73] N. W. Tietz, *Clinical Guide to Laboratory Tests (ELISA)*, 3 era. Philadelphia: W.B. Saunders, Co., 1995.
- [74] T. Lothar, *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory results*, vol. 45. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998.
- [75] C. Liu, N. Wei, S. Wang, and Y. Xu, “Preparation and characterization superporous hydroxypropyl methylcellulose gel beads,” *Carbohydr Polym*, vol. 78, no. 1, pp. 1–4, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.02.024.
- [76] A. M. Zawada, T. Lang, B. Ottilinger, F. Kircelli, M. Stauss-Grabo, and J. P. Kennedy, “Impact of Hydrophilic Modification of Synthetic Dialysis Membranes on Hemocompatibility and Performance,” Oct. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/membranes12100932.
- [77] S. Hasheminasab, J. Barzin, and R. Dehghan, “High-performance hemodialysis membrane: Influence of polyethylene glycol and polyvinylpyrrolidone in the polyethersulfone membrane,” *Journal of Membrane Science and Research*, vol. 6, no. 4, pp. 438–448, Sep. 2020, doi: 10.22079/JMSR.2020.128323.1391.
- [78] A. F. Stalder, T. Melchior, M. Müller, D. Sage, T. Blu, and M. Unser, “Low-bond axisymmetric drop shape analysis for surface tension and contact angle measurements of sessile drops,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 364, no. 1–3, pp. 72–81, 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.04.040.
- [79] E. Hopkins, S. Sharma, and T. Sanvictores, “Physiology, Acid Base Balance.,” In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29939584/>
- [80] FDA, *Guidance for Industry. Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation*. 1997.
- [81] V. Galván-Romero *et al.*, “Development and evaluation of ciprofloxacin local controlled release materials based on molecularly imprinted polymers,” *European*

Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, vol. 195, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.ejpb.2024.114178.

- [82] A. A. Shitole, P. W. Raut, N. Sharma, P. Giram, A. P. Khandwekar, and B. Garnaik, “Electrospun polycaprolactone/hydroxyapatite/ZnO nanofibers as potential biomaterials for bone tissue regeneration,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 30, no. 5, May 2019, doi: 10.1007/s10856-019-6255-5.
- [83] ASTM international, “Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials,” 2017.
- [84] M. Tomaiuolo, L. F. Brass, and T. J. Stalker, “Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis,” Jan. 01, 2017, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.iccl.2016.08.001.
- [85] F. Molica, S. Nolli, P. Fontana, and B. R. Kwak, “Turbidimetry on human washed platelets: The effect of the pannexin1-inhibitor Brilliant Blue FCF on collagen-induced aggregation,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2017, no. 122, Apr. 2017, doi: 10.3791/55525.
- [86] G. E. Jarvis, “Platelet aggregation: turbidimetric measurements.,” *Methods Mol Biol*, vol. 272, pp. 65–76, 2004, doi: 10.1385/1-59259-782-3:065.
- [87] J. A. Malinski and G. L. Nelsestuen, “Relationship of turbidity to the stages of platelet aggregation,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 882, pp. 177–182, Nov. 1986, doi: 10.1016/0304-4165(86)90152-2.
- [88] A. M. Hvas and E. J. Favalaro, “Platelet function analyzed by light transmission aggregometry,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1646, Humana Press Inc., 2017, pp. 321–331. doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1_25.
- [89] J. Clemetson and K. Clemetson, “Platelet Collagen Receptors,” *Thromb Haemost*, vol. 86, no. 7, pp. 189–197, 2001, doi: 10.1055/s-0037-1616217.
- [90] R. Paniccia, R. Priora, A. A. Liotta, and R. Abbate, “Platelet Function tests: A Comparative Review,” 2015, *Dove Medical Press Ltd.* doi: 10.2147/VHRM.S44469.
- [91] R. Chadha, P. Arora, S. Chanda, R. Chadha, A. Saini, and A. Dharamvirsinghain, “Cocrystals of efavirenz with selected conformers: Preparation and characterization COCRYSTALS OF EFAVIRENZ WITH SELECTED COFORMERS: PREPARATION AND CHARACTERIZATION.” [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/288702828>
- [92] E. A. Arik Kibar and F. Us, “Thermal, mechanical and water adsorption properties of corn starch-carboxymethylcellulose/methylcellulose biodegradable films,” *J Food Eng*, vol. 114, no. 1, pp. 123–131, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.07.034.

- [93] J. Fried, *Polymer science and technology*, Third edition. USA: Pearson Education , 2014.
- [94] O. Vega-Vega, C. Ronco, and A. J. Martínez-Rueda, “Pushing the boundaries of hemodialysis: innovations in membranes and sorbents,” Dec. 18, 2023. doi: 10.24875/RIC.23000223.
- [95] H. Westphalen *et al.*, “Case studies of clinical hemodialysis membranes: influences of membrane morphology and biocompatibility on uremic blood-membrane interactions and inflammatory biomarkers,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-71755-8.
- [96] Z. Eslami, S. Elkoun, M. Robert, and K. Adjallé, “A Review of the Effect of Plasticizers on the Physical and Mechanical Properties of Alginate-Based Films,” Sep. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/molecules28186637.
- [97] H. Zhao and H. Chi, “Electrospun Bead-on-String Fibers: Useless or Something of Value?,” in *Novel Aspects of Nanofibers*, T. Lin, Ed., Rijeka: IntechOpen, 2018, p. Ch. 5. doi: 10.5772/intechopen.74661.
- [98] T. Roodbar Shojaei, A. Hajalilou, M. Tabatabaei, H. Mobli, and M. Aghbashlo, “Characterization and Evaluation of Nanofiber Materials,” in *Handbook of Nanofibers*, A. Barhoum, M. Bechelany, and A. S. H. Makhoulf, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 491–522. doi: 10.1007/978-3-319-53655-2_15.
- [99] D. Semnani, “Geometrical characterization of electrospun nanofibers,” in *Electrospun Nanofibers*, A. Mehdi, Ed., Woodhead Publishing, 2017, pp. 151–180. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100907-9.00007-6>.
- [100] P. C. Y. Wong, Y. N. Kwon, and C. S. Criddle, “Use of atomic force microscopy and fractal geometry to characterize the roughness of nano-, micro-, and ultrafiltration membranes,” *J Memb Sci*, vol. 340, no. 1–2, pp. 117–132, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.memsci.2009.05.018.
- [101] N. Said *et al.*, “Enhanced hydrophilic polysulfone hollow fiber membranes with addition of iron oxide nanoparticles,” *Polym Int*, vol. 66, no. 11, pp. 1424–1429, Nov. 2017, doi: 10.1002/pi.5401.
- [102] D. Kalugin, J. Bahig, A. Shoker, H. Doan, S. Kirychuk, and A. Abdelrasoul, “Superhydrophobic polyether sulfone (PES) dialysis membrane with enhanced hemocompatibility and reduced human serum protein interactions: Ex vivo, in situ synchrotron imaging, experimental, and computational studies,” *Sep Purif Technol*, vol. 335, p. 126071, May 2024, doi: 10.1016/J.SEPPUR.2023.126071.

- [103] M. M. Ba-Abbad, N. Mahmud, A. Benamor, E. Mahmoudi, M. S. Takriff, and A. W. Mohammad, "Improved properties and salt rejection of polysulfone membrane by incorporation of hydrophilic cobalt-doped ZnO nanoparticles," *Emergent Mater*, vol. 7, no. 2, pp. 509–519, Apr. 2024, doi: 10.1007/s42247-023-00613-w.
- [104] P. Glover, "Formation Evaluation MSc Course Notes. Chapter 5: Porosity." Accessed: Jul. 27, 2024. [Online]. Available: https://homepages.see.leeds.ac.uk/~earpwjg/PG_EN/CD%20Contents/Formation%20Evaluation%20English/Chapter%205.PDF
- [105] R. S. Hebbbar, A. M. Isloor, and A. F. Ismail, "Contact Angle Measurements," in *Membrane Characterization*, Elsevier, 2017, pp. 219–255. doi: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00012-7.
- [106] A. M. Zawada, T. Lang, B. Ottlinger, F. Kircelli, M. Stauss-Grabo, and J. P. Kennedy, "Impact of Hydrophilic Modification of Synthetic Dialysis Membranes on Hemocompatibility and Performance," Oct. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/membranes12100932.
- [107] A. Gugliuzza, "Membrane Swelling," in *Encyclopedia of Membranes*, Springer Berlin Heidelberg, 2015, pp. 1–2. doi: 10.1007/978-3-642-40872-4_720-6.
- [108] N. A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J. H. Ward, and J. Zhang, "PHYSICO-CHEMICAL FOUNDATIONS AND STRUCTURAL DESIGN OF HYDROGELS IN MEDICINE AND BIOLOGY," 2000. [Online]. Available: www.annualreviews.org
- [109] S. C. Chattaraj, J. Swarbrick, and I. Kanfer, "international journal of pharmaceuticals A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms," 1995.
- [110] P. Winn, *Dictionary of Biological Psychology*. New York: Taylor & Francis e-Library, 2001.
- [111] V. Gounden, H. Bhatt, and I. Jialal, "Renal Function Tests," StatPearls. Accessed: Sep. 12, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507821/>
- [112] W. Barr, *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.*, 3rd ed. 1990. Accessed: Sep. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK273/>
- [113] I. M. Washington and G. Van Hoosier, "Clinical Biochemistry and Hematology," *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, pp. 57–116, Jan. 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1.
- [114] H. A. Krebs, "CHEMICAL COMPOSITION OF BLOOD PLASMA AND SERUM!" [Online]. Available: www.annualreviews.org

- [115] J. E. Fergusson, E. A. Forbes, R. J. Schroeder, and D. E. Ryan, "THE ELEMENTAL COMPOSITION AND SOURCES OF HOUSE DUST AND STREET DUST," *Sci Total Environ*, vol. 50, pp. 217–221, 1986, doi: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(86\)90363-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(86)90363-3).
- [116] J. F. W. Woittiez, "ELEMENTAL ANALYSIS OF HUMAN SERUM AND SERUM PROTEIN FRACTIONS BY THERMAL NEUTRON ACTIVATION," Amsterdam, Nov. 1964.
- [117] E. Yu and S. Sharma, "Physiology, Calcium," StatPearls. Accessed: Sep. 26, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482128/>
- [118] S. Copur *et al.*, "Novel strategies in nephrology: what to expect from the future?," *Clin Kidney J*, vol. 16, no. 2, pp. 230–244, Feb. 2023, doi: 10.1093/ckj/sfac212.
- [119] Y. Nishimura, "Revolutionizing renal research: The future of kidney-on-a-chip in biotechnology," Jun. 01, 2024, *Japanese Society of Regenerative Medicine*. doi: 10.1016/j.reth.2024.06.006.
- [120] J. Bahig, A. Shoker, H. Doan, K. Szaszi, and A. Abdelrasoul, "Advances and Challenges in 3D Modelling of Organ-on-a-Chip Devices with a Focus on the Glomerular Basement Membrane (GBM) and Tubular Systems: A Critical Review," 2025, *SpringerOpen*. doi: 10.1007/s13206-024-00187-7.
- [121] K. Doi, H. Kimura, Y. T. Matsunaga, T. Fujii, and M. Nangaku, "Glomerulus-on-a-Chip: Current Insights and Future Potential Towards Recapitulating Selectively Permeable Filtration Systems," 2022, *Dove Medical Press Ltd*. doi: 10.2147/IJNRD.S344725.