



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

**Desarrollo de membranas de quitosano-aloe vera y
quitosano-*triticum vulgare* con posibles aplicaciones
biomédicas**

Tesis

**Que como parte de los requisitos para obtener el
grado de**

Ingeniero Biomédico

Presenta

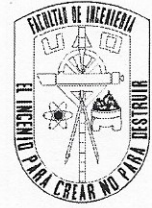
Fausto Sanabria Romero

Dirigido por

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña



**Desarrollo de membranas de quitosano-aloe vera y
quitosano-*triticum vulgare* con posibles aplicaciones
biomédicas**



Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Ingeniero Biomédico

Presenta

Fausto Sanabria Romero

Dirigido por

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Sinodales

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Presidente

Dr. Carlos Guzmán Martínez

Secretario

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Vocal

M.C. María Carolina Espinosa Arzate

Suplente

Resumen

Aunque existen muchos esfuerzos para desarrollar terapias y biomateriales que promuevan el proceso de cicatrización en una herida, los apósitos más comunes tienen un rol pasivo en dicho proceso de curación. El uso de la técnica de electrospinning para el desarrollo de materiales en la ingeniería de tejidos ha sido ampliamente utilizado debido a las características y propiedades de los materiales electrohilados. En el presente trabajo se realizó la síntesis de apósitos mediante la técnica de electrospinning, fabricados con Quitosano, PEO, *Aloe Vera* y *Triticum Vulgare*, materiales naturales biocompatibles cuyas propiedades han sido probadas en la ingeniería de tejidos. Se obtuvieron imágenes SEM que indican que la adición de PEO al quitosano mejora su capacidad para formar fibras más uniformes en el electrospinning obteniendo fibras uniformes con un diámetro promedio de 100 nm para las fibras de *Aloe Vera* y para el *Triticum Vulgare* de 119 nm resultado exitoso ya que está comprobado que apósitos diseñados con fibras en un rango de 50 a 300 nm son favorables para una buena viabilidad celular

Mediante el análisis del espectro FT-IR se comprobó la presencia de los precursores en los apósitos y con las interacciones observadas se observó la manera en la que relacionan los materiales, resultados que respaldan las caracterizaciones físicas de los materiales electrohilados.

Con el resultado obtenido de las pruebas de viabilidad celular es posible concluir que apósitos diseñados tienen una alta viabilidad celular, específicamente en el caso del *Triticum Vulgare* dentro de un periodo menor a 48 horas.

Palabras clave: Electrospinning, Quitosano, *Aloe Vera*, *Triticum Vulgare*

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mis papás y a mi hermana por su apoyo y cariño, en los momentos difíciles de toda la universidad, es gracias a ellos que llegué hasta aquí y son mi principal motivación para lo que siga.

Agradecer también al equipo de trabajo del laboratorio del Dr. Elizalde por brindarme el espacio, recursos, materiales y la ayuda necesaria para llevar a cabo la investigación.

Agradezco las facilidades otorgadas en el uso de la infraestructura de LIDTRA, a través de los proyectos: LN295261, LN254119 Y LN299082

En cuarto lugar, quiero agradecer al grupo 42 por haber sido unos amigos increíbles, fue una suerte coincidir con todos ellos.

Índice

Agradecimientos	2
Índice de Figuras	6
Capítulo I	
Introducción	7
Planteamiento del problema	7
Capítulo 2	
Marco teórico	9
2.1 Heridas	9
2.1.1 Proceso de cicatrización	11
2.1.2 Tratamiento de heridas	13
2.1.3 Antecedentes nacionales e internacionales	14
2.1.4 Biomateriales	15
2.1.5 Apósitos	16
2.2 Quitosano	18
2.3 Polióxido de etileno	20
2.4 <i>Aloe Vera</i>	21
2.5 <i>Triticum vulgare</i>	23
2.6 Nanofibras	24
2.7 Métodos de síntesis de nanofibras	25
2.7.1 Técnicas físicas	25
2.7.2 Técnicas químicas	25
2.7.3 Técnicas biológicas	26
2.8 Electrospinning	26
2.8.1 Ventajas	28
2.8.2 Desventajas	28
2.8.3 Apósitos diseñados mediante electrospinning	29
2.8.4 Parámetros para el electrospinning	30
2.9 Capacidad de electrospinning del quitosano	32
2.10 Surfactantes	33
2.11 Normas generales de bioseguridad en el laboratorio	34
2.12 Manejo y disposición de materiales	35

Capítulo 3	
Hipótesis y objetivos	36
3.1 Hipótesis.....	36
3.2 Objetivos	36
3.2.1 Objetivo general.....	36
3.2.2 Objetivos específicos.....	36
5. Justificación	37
Capítulo 4	
Metodología.....	39
4.1 Extracción de aceite de <i>Triticum Vulgare</i>	39
4.2 Extracción de gel de <i>Aloe vera</i>	39
4.3 Síntesis de apósito de quitosano - <i>aloe vera</i>	40
4.4 Síntesis de apósito de quitosano <i>triticum vulgare</i>	41
4.5 Caracterización <i>Aloe Vera</i>	41
4.6 Caracterización de las membranas.	41
4.6.1 Microscopía electrónica de barrido	42
4.6.2 Pruebas de hinchamiento	42
4.6.3 Pruebas mecánicas.....	42
4.6.4 Espectroscopía infrarroja	43
4.6.5 Pruebas de viabilidad celular (MTT).....	43
Capítulo 5	
Resultados y discusión	47
5.1 Espectroscopía UV-VIS	47
5.2 Microscopía electrónica de barrido	48
5.3 Hinchamiento	52
5.4 Pruebas mecánicas.....	54
5.5 Espectroscopía infrarroja	56
5.6 Viabilidad celular	61
Capítulo 6	
Conclusiones	63
Referencias.....	64

Índice de Figuras

Figura 1: Unidad del Quitosano (36)	18
Figura 2: Unidad del PEO (45)	20
Figura 3: Corte transversal planta de Aloe Vera.....	21
Figura 4: Esquema y componentes del electrospinning (67)	27
Figura 5: Diagrama de distribución de pozos.	45
Figura 6: Espectro UV-Vis Extracto de Aloe Vera	47
Figura 7: Apósito electro hilado de Quitosano- Aloe Vera.....	48
Figura 8: Apósito electrohilado de Quitosano - Triticum Vulgare.....	49
Figura 9: Apósito electro hilado Quitosano - PEO	49
Figura 10: a) Microscopía electrónica de barrido de apósito Quitosano – PEO – Aloe Vera b) Microscopía electrónica de barrido de apósito Quitosano – PEO – Triticum Vulgare	50
Figura 11: a) Distribución de diámetros de membrana Quitosano – PEO – Aloe Vera e b) Distribución de diámetros de membrana Quitosano – PEO – Triticum Vulgare.....	51
Figura 12: Porcentaje de hinchamiento en 24 horas QPA) Quitosano - PEO - Aloe Vera, QPT) Quitosano - PEO - Triticum Vulgare, QP) Quitosano PEO.....	52
Figura 13: Tensión en la ruptura de los apósitos diseñados QPA) Quitosano - PEO - Aloe Vera, QP) Quitosano - PEO, QPT) Quitosano - PEO - Triticum Vulgare.....	54
Figura 14: Espectro infrarrojo del Q) Quitosano puro PEO) Poli (óxido de etileno) puro y QP) Apósito electro hilado de Quitosano - PEO	56
Figura 15: Espectro FT-IR AV) Aloe Vera puro, QP) Apósito Quitosano – PEO, QPA) Apósito Quitosano – PEO – Aloe Vera	58
Figura 16: Espectro FTIR de, QP) Apósito Quitosano – PEO, QPT) Apósito Qutosano - PEO - Triticum vulgare.....	59
Figura 17: Porcentaje de viabilidad celular evaluado mediante el ensayo MTT	61

Índice de fórmulas

(1) Porcentaje de hinchamiento	42
(2) Tensión en la ruptura.....	42
(3) Densidad Celular en cámara Neubauer	45
(4) STOCK de células para cada uno de los pozos	46

Capítulo I

Introducción

Planteamiento del problema

La cicatrización es un proceso dinámico multicelular que tiene como objetivo la restauración de la barrera que representa la piel (1); consta de cuatro fases continuas que se superponen; los eventos en cada fase deben de ocurrir en el orden preciso, interrupciones, aberraciones o prolongaciones en dichas fases pueden provocar un retraso en la cicatrización de una herida o una herida crónica que no cicatrice (2). Es una preocupación médica global con varios desafíos incluida la creciente incidencia de obesidad, una población que envejece y la necesidad de apósitos más efectivos, pero a su vez rentables (3).

En un intento para reducir el impacto que tienen las heridas y su cuidado, el esfuerzo se ha concentrado en comprender el mecanismo de cicatrización en busca de nuevos enfoques terapéuticos y el desarrollo continuo de tecnologías para su tratamiento, es por lo que en la última década el cuidado de las heridas ha progresado, de utilizarse tratamientos convencionales como ungüentos y gasas al uso de apósitos, substitutos de tejido, cámaras hiperbáricas, etc.

El Instituto Nacional de Imágenes Biomédicas y Bioingeniería define a la ingeniería de tejidos como “un área de rápido crecimiento que busca crear, reparar y/o reemplazar tejidos y órganos mediante el uso de combinaciones de células, biomateriales y/o moléculas biológicamente activas”. El uso de apósitos para mejorar el proceso de cicatrización ha sido un campo estudiado desde hace cientos de años, pasaron de ser materiales que sólo cubrían la herida para evitar des-hidratación y prevenir infecciones, a materiales que mejoran todas las condiciones para potenciar el proceso de cicatrización (4).

Los apósitos y distintos métodos para tratamiento de heridas forman un importante segmento del sector farmacéutico en el mundo. En el pasado se utilizaban apósitos

tradicionales, como vendajes naturales o sintéticos, algodones y gasas; y su función principal formar una barrera para la herida permitiendo la evaporación de exudados (5). Actualmente existen distintos tipos de apósitos, membranas, hidrocoloides, hidrogeles, micro / nano fibras, etc., y se han desarrollado con la intención de proporcionar un mejor ambiente para la herida, que produzca la proliferación celular para mejorar el proceso de cicatrización.

En esta investigación se pretende establecer una metodología para la síntesis de membranas nano fibrosas de quitosano – aloe vera y quitosano *triticum vulgare* para que sean utilizadas como apósitos ya que los precursores han sido utilizados, por separado como parte de la medicina tradicional desde hace cientos de años dando resultados favorables. El proyecto se centra en el desarrollo del material, su caracterización y acondicionamiento para su aplicación como apósitos.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1 Heridas

La piel está compuesta de dos capas, la epidermis, capa superficial de epitelio estratificado que consiste principalmente en queratinocitos, y la dermis, capa más profunda compuesta de tejido conectivo rico en colágeno. El papel de la epidermis es el de proteger el cuerpo de agentes externos y el de la dermis brindar soporte mecánico.

Una herida puede definirse como una lesión o disrupción de la estructura anatómica y función resultantes de una ruptura simple o severa de una o las dos capas de la piel; es una discontinuidad en el tejido, provocada por una laceración externa en la piel causando un trauma (6); este puede extenderse a otros tejidos y estructuras como tejido subcutáneo, músculos, tendones, nervios, vasos e incluso huesos (1,7).

Las heridas suelen clasificarse en dos categorías: heridas agudas y crónicas; las del primer tipo son causadas por traumas, pero el tiempo de recuperación varía de 8 a 12 semanas (8), siendo provocadas por daño mecánico, exposición a calor extremo, irradiación, descargas eléctricas y exposición a químicos corrosivos (9). Las heridas crónicas son aquellas resultantes de enfermedades específicas como diabetes, tumores, etc. El proceso de cicatrización de estas heridas puede durar más de 12 semanas (10) y es posible que las heridas de este tipo se vuelvan a abrir.

Cuando se produce una lesión cutánea la cicatrización permite la reconstrucción de los tejidos dañados y su vascularización, la aparición de una alteración durante la cicatrización puede conducir a un retraso en el proceso, generar una herida crónica, o la formación de una cicatriz patológica (11).

Las infecciones en la piel y tejido blando son el tipo más común de infecciones y afectan a millones de personas en el mundo; dependiendo de la severidad del daño, las infecciones pueden ser desde superficiales hasta poner en riesgo extremidades o la vida.

En un humano sano, las infecciones son evitadas mediante la activación del sistema inmune para eliminar los agentes patógenos, aunque si el sistema inmune no es capaz de remover el patógeno ocurre la infección causando daño y granulación al tejido, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular (colágeno, elastina y fibrina) son agentes que comprometen un proceso de cicatrización normal (12).

2.1.1 Proceso de cicatrización

La respuesta a una lesión cutánea desencadena un proceso complejo con la finalidad de reparar los tejidos dañados y recuperar las funciones de la piel; dicho proceso está compuesto de cuatro fases que se solapan, hemostasis, fase inflamatoria, proliferación y remodelación; en estas fases intervienen muchos tipos de células, procesos celulares y moléculas; estas se describen a continuación:

- Hemostasis

Esta fase comienza inmediatamente después de la lesión, su objetivo provocar el cese de la hemorragia mediante la coagulación, para proteger el sistema vascular, tiene una duración de 15 minutos; las plaquetas circulantes al tejido dañado lo que provoca su activación, y adhesión al endotelio (13); se activa el proceso de coagulación donde participa fibrinógeno en la formación del trombo. El trombo formado propicia la activación celular y sirve de andamiaje para las células que intervienen en la fase de inflamación y regeneración del tejido (12).

- Inflamación

La siguiente fase comienza aproximadamente a los 16 minutos de que se originó la herida y puede durar hasta seis días, esta etapa es una respuesta protectora del tejido en la cual se activan macrófagos para eliminar bacterias, cuerpos extraños y componentes del tejido dañado (13). Otras células que participan en esta etapa son los mastocitos y linfocitos T, que se encargan de modular la actividad de remodelación de la matriz extracelular (14).

- Proliferación

La tercera etapa es derivada de la inflamación inicia en el tercer día y dura de 15 a 25 días, se caracteriza por dos procesos angiogénesis y migración de fibroblastos (15), comienza con la disminución de la inflamación con la acción de macrófagos, la angiogénesis depende de factores pro angiogénicos como el factor del crecimiento de fibroblastos y de factores anti angiogénicos que actúan sobre las células endoteliales.

Los fibroblastos a través de un proceso llamado fibroplasia dan lugar al tejido de granulación, este es un agregado temporal de células y proteínas que actúan como material de fusión (13).

- Remodelación

Fase caracterizada por la formación, organización y resistencia que obtiene el tejido al formar la cicatriz, comienza después de 2 o 3 semanas del daño inicial; el tejido de granulación evoluciona gradualmente en un tejido maduro que cicatriza y disminuyen los vasos sanguíneos (16).

Para asegurar una correcta cicatrización de la herida es muy importante que se controlen las condiciones en el tejido dañado; sin embargo, heridas crónicas, quemaduras, úlceras diabéticas, y heridas post cirugía suelen tener tiempos de recuperación más tardados y presentan situaciones que requieren más control; por ejemplo, las quemaduras, generalmente tienen niveles más altos de exudado, lo que provoca un ambiente propicio para la proliferación bacteriana (12).

2.1.2 Tratamiento de heridas

El concepto de mantener una herida limpia y cubierta se ha conocido por mucho tiempo; documentación que data del 2100 a.C. en las famosas tablas Sumerias indica que las heridas se lavaban con agua caliente y se untaban con mezclas de hierbas, aceites y ungüentos (17). En 1550 a.C. el papiro de Ebers, documentaba una mezcla de grasa (como barrera), miel (como antibacterial) y pelusas (como absorbente) como un ungüento para el tratamiento de heridas (18). En el 600 a.C. está documentado que en la india se usaba un ungüento a base de semillas de mostaza, hojas de Neem (una planta originaria de la zona), y mantequilla de vaca con sal, que en estudios recientes está mostrado que tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas (19).

Así es como desde la antigüedad los humanos han reconocido la importancia del tratamiento de las heridas utilizando materiales para cubrirlas; estos vendajes si promovían una mejor cicatrización, pero al requerir cambios frecuentemente para prevenir maceración en la piel, en algunas ocasiones se provocaban nuevas lesiones al ser reemplazados constantemente (20).

El uso de matrices de coberturas de heridas data desde 1880, cuando Joseph Gamgee usó un apósito absorbente de lana de algodón en medio de capas de gasa (21) y desde 1980 como membranas/esponjas, hidrogeles, películas, nano geles y micro geles, andamios/vendajes han sido investigados en el campo del tratamiento de heridas. No fue hasta los sucesos de la primera y segunda guerra mundial en donde el uso de proyectiles metálicos dio origen a nuevos tipos de heridas y los contaminados campos de batalla hacían más susceptibles las infecciones donde la demanda apósitos quirúrgicos incrementó por el uso de armas y municiones más peligrosas (17).

De entre los ejemplos mencionados, las nano y microfibras reúnen las características necesarias para un material efectivo en el tratamiento de heridas, como absorción de exudado, permeabilidad de oxígeno y propiedades antibacterianas, lo cual ha sido atribuido a la evolución de la nanotecnología (6).

2.1.3 Antecedentes nacionales e internacionales

Aunque existen muchos estudios realizados por clínicas e instituciones de salud de varios países alrededor del mundo, las heridas son en varios aspectos un problema de salud poco reportado (22), y dependiendo del tipo de herida del que se esté hablando se han vuelto un desafío para los sistemas de salud de todo el mundo.

El costo promedio anual global para el cuidado de heridas en 2014 fue de \$2.8 Billones de dólares y se proyecta que para 2021 suba a \$3.5 billones (23); por otro lado, un estudio de mercado realizado en 2018 predice que el mercado de productos para el cuidado de heridas exceda los \$15 billones de dólares en 2022 (24).

En México de acuerdo con un estudio realizado en 2017 en el que se describen los costos de atención de heridas en una muestra de 357 pacientes de 14 unidades médicas de primer nivel de atención, muestran que el mayor porcentaje de atención está orientado al cuidado de heridas traumáticas (59%), después dehiscencias quirúrgicas (12%), úlceras de pierna (11%), úlceras de pie diabético (10%), quemaduras (4%), lesiones por presión (3%) y heridas de ano y periné (1%)(25).

En este contexto es evidente que la incidencia de heridas agudas y crónicas representa un problema de salud para la población y para el sistema de salud.

2.1.4 Biomateriales

Los biomateriales se definen como materiales con la capacidad de restaurar o reemplazar funciones naturales de los tejidos y órganos del cuerpo humano sin causar daños en este. Estos materiales muchas ocasiones tienen un papel importante para solucionar distintos problemas de salud y su estudio ha propiciado mejoras en distintas aplicaciones biomédicas, como ingeniería de tejidos, implantes, liberación de fármacos, etc.

El uso de materiales exógenos al cuerpo para aplicaciones de salud puede rastrearse hasta la prehistoria, desde la civilización Maya usando prótesis dentales hechas de conchas marinas (26); hasta las prótesis diseñadas con la tecnología actual. Durante cientos de años la implementación de estos materiales se realizó sin el conocimiento necesario de las limitaciones y problemas que implica (27), pero su uso exitoso muestra la capacidad del cuerpo de adaptarse a materiales externos.

2.1.4.1 Biomateriales poliméricos

Debido a su gran versatilidad, abundancia y a características, mecánicas, fisicoquímicas y biológicas los polímeros naturales o sintéticos han sido de relevante importancia en los últimos años; además, la trascendencia del estudio en este tipo de materiales se puede observar en el mercado de polímeros para aplicaciones médicas, valuado en 1 mil millones de dólares anuales con un crecimiento anual del 10 al 20% (28).

El uso de polímeros naturales para aplicaciones biomédicas es altamente benéfico debido a su alta biocompatibilidad, su cinética de biodegradación y su fácil manipulación de propiedades químicas (29).

En contraste los polímeros sintéticos son fácilmente producidos en gran escala, tienen bajo costo de producción, sin embargo, el principal inconveniente es la no biocompatibilidad que presentan en ocasiones estos materiales

2.1.5 Apósitos

Un apósito es cualquier material empleado para cubrir, proteger y curar heridas, están diseñados para estar en contacto con el tejido dañado (20,30), lo cual es distinto de un vendaje ya que este último sostiene el apósito en su lugar. Los apósitos tradicionales incluyen gasas, vendajes (naturales o sintéticos) y son utilizados comúnmente para proteger a las heridas de agentes contaminantes; las gasas hechas de fibras de algodón, rayón y poliéster ofrecen cierta protección contra infecciones bacterianas.

Debe de contar con las siguientes propiedades: absorber exudados y componentes tóxicos, preservar un alto nivel de humedad en la superficie de la herida, permitir el intercambio gaseoso, proporcionar aislamiento térmico, proteger a la herida de entrada de bacterias, ser no tóxico, promover la regeneración y el crecimiento del tejido nuevo y ser eliminado fácilmente sin causar más daño a la herida y el tejido circundante (30).

El avance de la tecnología ha permitido que los apósitos modernos se desarrollen con el objetivo no sólo de cubrir la herida sino de proporcionar un ambiente que acelere el proceso de cicatrización y elimine organismos que puedan causar latentes infecciones. Generalmente están basados en polímeros sintéticos y naturales y están clasificados en pasivos, interactivos y bioactivos (20).

2.1.5.1 Apósitos de polímeros naturales

Los materiales para apósitos incluyen naturales y sintéticos, así como sus combinaciones, en la forma de películas, esponjas, hidrogeles e hidrocoloides (31). Recientemente los polímeros naturales han recibido mucha atención debido a su alta biocompatibilidad, gran existencia en todo el mundo y propiedades ambientales.

Los apósitos preparados con materiales naturales son elaborados principalmente con polisacáridos, proteínas y lípidos, y son generalmente biodegradables. Los polisacáridos poliméricos son los más importantes de estos sistemas, porque su uso no representa problemas ambientales ni económicos (32), por sus propiedades mecánicas, químicas, biológicas, su similitud con la matriz extracelular y porque no tienen reacciones inmunológicas frecuentemente detectadas por polímeros sintéticos (30,32).

Actualmente existe una gran variedad de polímeros utilizados para preparar apósitos, quitina, quitosano, gelatin, celulosa, ácido hialurónico, colágeno y sus derivados, con estos se ha logrado imitar la matriz de la piel, obteniendo mejores resultados en el cuidado de heridas

2.2 Quitosano

Entre los derivados de polímeros naturales se presta especial atención a un derivado de la quitina, el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa y tiene una estructura similar (33), el quitosano, el cual es un polímero semisintético de la familia de las poliaminogluosas obtenido mediante la desacetilación parcial de la quitina (34).

Químicamente el quitosano se trata de un polímero lineal compuesto por unidades ensambladas covalentemente de D-glucosamina (unidad desacetilada) unida aleatoriamente a la N-Acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) (2-Amino-2-deoxy- β -D-glucopiranososa), Figura 1. Cuando el número de unidades desacetiladas en la quitina es $\geq 50\%$, pasa de ser completamente insoluble a soluble en medios acuosos ácidos, siendo entonces considerado quitosano. La presencia de grupos amino le brinda al quitosano características singulares haciendo a este material uno de los recursos más prometedores para sustituir polímeros sintéticos en muchas aplicaciones tecnológicas, biomédicas y farmacéuticas (35).

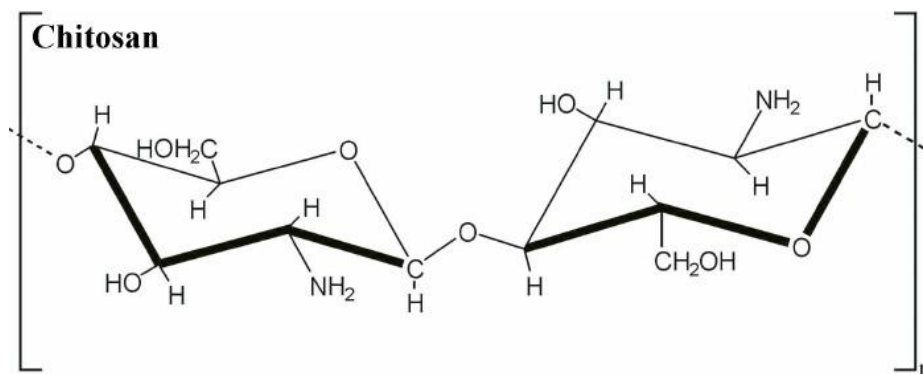


Figura 1: Unidad del Quitosano (36)

Presenta biocompatibilidad, capacidad quelante, efectos antimicrobianos contra una amplia gama de bacterias gram positivas y gram negativas y hongos (37); tiene también propiedades autoadhesivas, analgésicas y hemostáticas (38). Otras de las ventajas del quitosano son su rápida degradación, no es tóxico, es biodegradable y promueve la unión celular, es un polímero que contiene citosina, un compuesto que promueve la regeneración de tejidos (39); fue aprobado por la FDA para ser utilizado como piel artificial y como material para apósitos (38). Uno de los efectos más interesantes del quitosano es la formación de tejido de granulación con angiogénesis (40). Se ha comprobado que el quitosano induce fibroblastos a liberar interleucina, sustancia vinculada a la migración y proliferación de fibroblastos (41).

Los solventes comúnmente usados para disolver quitosano son ácidos diluidos debido a la protonación de los grupos amino (38); ácido fórmico, acético, oxálico, láctico e hidrocórico, la solubilidad depende del peso molecular del quitosano, la concentración del polímero en la solución y de la concentración del ácido, generalmente disminuye con la concentración.

2.3 Polióxido de etileno

El Polióxido de etileno es un polímero sintético, neutral, no tóxico, biocompatible y biodegradable que es soluble en agua al que se le han encontrado muchas aplicaciones como en compuestos conductivos, cosmetología, ingeniería de tejidos, sistemas de liberación de fármacos e implantes biomédicos (42,43).

Sus propiedades químicas son apropiadas para las aplicaciones médicas debido a que es resistente a la adhesión de proteínas, por lo tanto, no interfiere con funciones celulares o que su objetivo sean células del sistema inmune (42). Las propiedades no inmunológicas del material reducen el riesgo a presentar citotoxicidad y que sea rechazado por el cuerpo, además se ha demostrado que suprime la adherencia plaquetaria y la formación de trombos (44).

Existen numerosos estudios donde se ha combinado con quitosano para aplicaciones como las mencionadas anteriormente, sobre todo en la fabricación de nano fibras; esto debido a que mejora las propiedades de las soluciones utilizadas en los procesos de hilado.

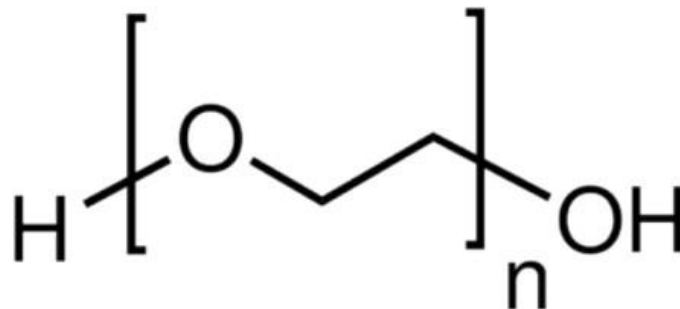


Figura 2: Unidad del PEO (45)

2.4 Aloe Vera

Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller), es conocido como la hoja terapéutica más antigua, es una especie de suculenta de la familia de las Xantoroáceas proveniente de África meridional, esta planta crece adaptada a regiones semiáridas donde las temperaturas van desde los 6°C en las noches hasta 32° como temperatura máxima del día. Es uno de los biopolímeros más abundantes en la tierra y ha sido utilizado por cientos de años para propósitos farmacéuticos, cosmetología, medicación y efectos nutricionales (46). Existen más de 200 especies de aloe vera en el mundo, de las cuales la barbadensis Miller es conocida por ser la más utilizada en materiales para curación (47).

Las hojas de aloe consisten en una epidermis (piel) gruesa cubierta por una cutícula que rodea el mesófilo que incluye células de clorénquima y células de paredes más delgadas que forman el parénquima (filete), como se puede apreciar en la Figura 3. El mesófilo las células contienen una gelatina mucilaginosa transparente llamada gel de Aloe vera (46), este gel cristalino está compuesto 99.5% por agua y el resto son ingredientes activos como pectina, celulosa, hemicelulosa, glucomanano, acemanano, y derivados de la manosa (48). La cantidad de agua y de ingredientes activos en el gel depende de la distribución geográfica, la calidad del suelo, radiación solar, temperatura, y disponibilidad del agua en el ambiente.



Figura 3: Corte transversal planta de Aloe Vera

En biomateriales ha sido utilizado como aditivo en apósitos para promover la cicatrización, también ha sido utilizado en tratamiento de quemaduras por muchas décadas, como antimicrobiano y para fármacos con efectos antiinflamatorios (49); además derivados del Aloe Vera son aplicados en actividades antitumorales para ocho líneas de cáncer junto con pectina cítrica modificada por pH y por alta temperatura (50). Se usa además con propósitos de protección de la piel contra rayos UV y gamma, tratamiento de psoriasis y efectos laxantes (51). El gel de aloe vera es comercializado como polvo concentrado y se utiliza como agente curativo en heridas y estimulante del sistema inmunológico (52).

Los componentes del gel como el acemanano y el lactato de magnesio tienen efectos antiinflamatorios, debido a que bloquean la producción de prostaglandina y tromboxano (37). El gel muestra también efectos benéficos en la formación de tejidos de granulación para producir cicatrices con una mejor forma (37); incrementa la actividad de macrófagos, monocitos y linfocitos T, células que secretan moléculas que controlan la respuesta inmunitaria específica y contribuyen a la reparación del daño tisular eliminando tejido muerto o dañado.

2.5 *Triticum vulgare*

Triticum vulgare es el nombre científico de una planta de la familia de las gramíneas, que es comúnmente conocida como trigo. La planta tiene una envergadura de 30 hasta 150 cm El extracto se obtiene mediante un procedimiento de germinado bajo condiciones controladas patentado por Riccio (2012).

El extracto de *Triticum vulgare* ha sido extensamente utilizado en la medicina tradicional en el tratamiento de diferentes condiciones patológicas de la piel, úlceras, quemaduras y enfermedades distróficas (53)

Existe un extracto de *Triticum vulgare* manufacturado por la farmacéutica DAMOR (Nápoles, Italia) que es un componente activo en el producto farmacéutico llamado Fitoestimulina®, es utilizado comúnmente para el tratamiento de problemas en la re-epitelialización o regeneración del tejido (54). Existe también evidencia científica que documenta que aceite de brotes de trigo se ha utilizado en la medicina tradicional iraní para tratamientos dermatónicos, reparación de poros en la piel y pecas (55).

Está demostrado que el extracto de *triticum vulgare* tiene la capacidad de promover la proliferación y maduración de fibroblastos (56) y de células endoteliales, puntos cruciales para el proceso de reparación de tejidos dañados; existe también evidencias de que el extracto es capaz de reducir la reacción inflamatoria para prevenir daños en el proceso de cicatrización. (57).

2.6 Nanofibras

Las nanofibras son uno de los grupos más interesantes de materiales en la actualidad, son filamentos que tienen diámetros que van desde unas cuantas decenas hasta 100 nm. La industria textil define fibra como un filamento natural o sintético como el nylon y algodón con la capacidad de ser hilado (58).

Han sido ampliamente estudiadas en la actualidad debido a sus propiedades químicas, eléctricas, térmicas, mecánicas, su amplio rango de selección de material y a sus remarcables características como su gran área, fácil funcionalización, porosidad, rendimiento mecánico superior y similitud con la matriz extracelular lo cual promueve su uso como apósito (58–60).

La tecnología de nano fibras ha sido incorporada en distintas áreas como baterías y celdas de combustibles, diodos y transistores, sistemas de transferencia de energía, compuestos para estructuras aeroespaciales (58); en el área de la salud las aplicaciones incluyen ingeniería de tejidos (61–63), sistemas de liberación de fármacos (64), biosensores, filtración (60), etc.

Han sido ampliamente utilizadas en el área de ingeniería de tejidos y tratamiento de heridas debido a que existe una gran variedad de materiales biodegradables y no degradables que pueden elegirse para hilar nanofibras, esto facilita su uso como material para liberación de fármacos. Presentan también facilidad para ser cargadas o inmovilizar en ellas componentes bioactivos lo cual promueve un buen ambiente para tratar infecciones de heridas, evitar la proliferación bacteriana, controlar el tiempo de liberación de fármacos, etc.

2.7 Métodos de síntesis de nanofibras

Existen muchos métodos de fabricación de nanofibras y a su vez distintas clasificaciones de estas técnicas; una de las maneras de clasificarlas en técnicas físicas, químicas y biológicas basados en la fuerza o acción aplicada para producir las fibras, cada una de las técnicas tiene ventajas y desventajas.

2.7.1 Técnicas físicas

Estas técnicas provocan la fabricación de fibras aprovechando distintos fenómenos que ocurren por la aplicación de energía de radiación, presión mecánica, energía eléctrica o energía térmica.

Usando estos métodos es posible obtener distinta morfología, tamaño, porosidad y superficie mediante la manipulación de los parámetros del proceso, dependiendo del tipo de energía que se esté aplicando. Algunos de los métodos más comunes son: deposición por vapor, ablación láser y técnicas de hilado (60).

2.7.2 Técnicas químicas

Los métodos químicos involucran reacciones entre dos o más especies para formar las fibras, la reacción puede ocurrir simultáneamente o necesitar de alguna energía externa como térmica o eléctrica (59).

Algunas de las técnicas más comunes son: microemulsión, método sol-gel, deposición de vapor químico, deposición electroquímica, separación de fase, microemulsión, etc.

2.7.3 Técnicas biológicas

Los métodos biológicos funcionan con reacciones entre el material del que estarán fabricadas las fibras y especies bioactivas como bacterias o enzimas en presencia o no de fuerzas externas que intervengan en el proceso como presión mecánica, radiación, energía térmica, etc.

Se han realizado numerosos estudios donde nanofibras realizadas mediante este tipo de técnicas han sido usadas para distintas aplicaciones, entre ellas aplicaciones biomédicas

2.8 Electrospinning

Los métodos tradicionales de producción de fibras poliméricas como electrospinning por fusión, hilado en seco, hilado húmedo y en gel se basan en utilizar fuerzas mecánicas para extruir un polímero fundido a través de una hilera y posteriormente estirar los filamentos restantes a medida que se solidifican o coagulan, los métodos mencionados permiten la producción de fibras con diámetros de entre 5 y 500 μm . En cambio, la tecnología de electrospinning permite la producción de fibras con dimensiones más pequeñas, estas fibras pueden tener diámetros en el rango de nanómetros a micrones (típicamente de 100 nm- 1 micrómetro) y longitudes de hasta kilómetros. (65)

El electrospinning es una técnica que utiliza un campo electromagnético para controlar la deposición de fibras de un polímero, ha sido ampliamente utilizada en las décadas pasadas para preparar andamios de nanofibras que imiten matrices celulares. Se considera que las fibras electrohiladas sirven, en ingeniería de tejidos, como andamios ideales por su gran área de superficie, topología y su facilidad de funcionalización (66); las fibras electrohiladas también tienen aplicaciones en el diseño de catalizadores, baterías, sensores electrónicos, membranas de filtración, implantes médicos, y sistemas de administración de fármacos.

El proceso de electrospinning fue patentado por primera vez en 1902 por Morton y Cooley en dos trabajos separados; desde entonces el proceso ha ido mejorando y fue modificado por Formhals en 1930 (63,64).

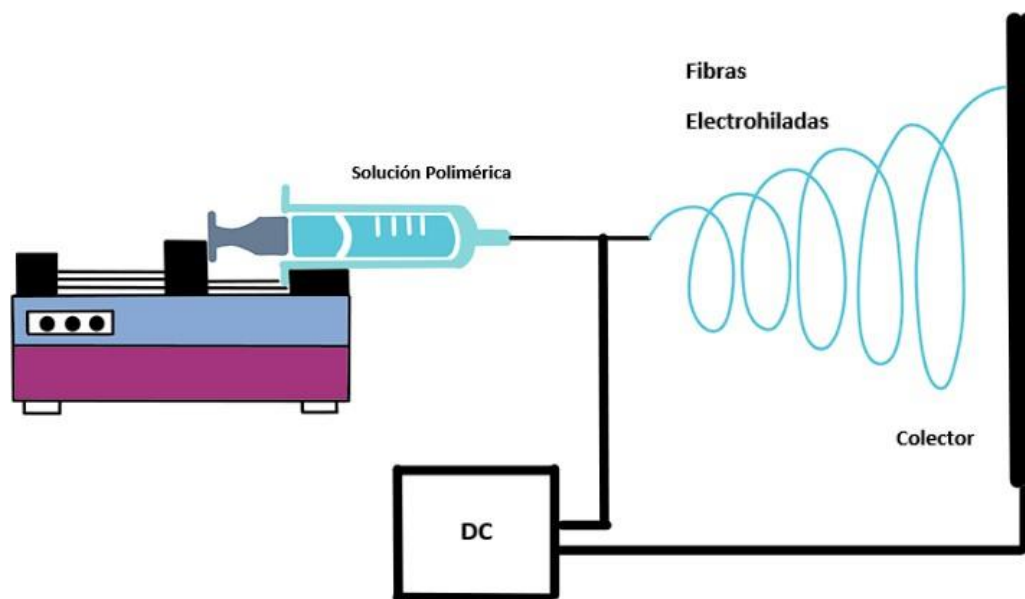


Figura 4: Esquema y componentes del electrospinning (67)

Los elementos requeridos para el electrospinning incluyen, como puede observarse en la figura 4 fuente de alto voltaje, solución polimérica, jeringa eyectora con bomba y un plato colector. Durante el proceso se utiliza la fuente de alto voltaje para polarizar una solución polimérica. El alto voltaje es aplicado para estirar la solución viscoelástica a una forma de cono llamada "Cono de Taylor". Cuando la fuerza del campo eléctrico sobrepasa la tensión superficial de la solución, del menisco se expulsa un chorro de fibra que viaja de la jeringa al colector permitiendo que el solvente de la solución se evapore provocando la deposición de las nano fibras poliméricas en el colector.

2.8.1 Ventajas

Entre las ventajas del electrospinning se encuentra que no requiere ningún proceso de funcionalización, únicamente se requiere el solvente que pueda dispersar nanopartículas y el polímero (68).

Mediante el control de los parámetros del proceso de electrospinning como el voltaje aplicado o el flujo de bombeo de la jeringa, se puede controlar la porosidad, área superficial específica, fuerza mecánica, y morfología de las fibras electrohiladas (61).

2.8.2 Desventajas

La efectividad del proceso depende de muchas variables que dificultan la replicación de resultados.

En la ingeniería de tejidos y apósitos para heridas la elección del polímero a ser electrospinning es crítica para lograr la función objetivo. A pesar de que muchos polímeros sintéticos son mecánicamente robustos, carecen de las propiedades intrínsecas de los polímeros naturales que favorecen la unión, el crecimiento y la diferenciación celular (38).

2.8.3 Apósitos diseñados mediante electrospinning.

Los apósitos diseñados con nanofibras permiten una gran flexibilidad de selección de materiales que proporcionen distintas propiedades como liberación controlada de fármacos; inmovilizar o cargar las fibras con enzimas, péptidos, antibióticos y hormonas (60), esta última característica es importante ya que los apósitos diseñados previenen infecciones.

En comparación a los apósitos tradicionales, los materiales electrohilados pueden promover la fase de hemostasis del proceso de cicatrización debido a la estructura y porosidad de las membranas sin la necesidad del uso de agentes hemostáticos. Su capacidad de absorber exudados y semi-permeabilidad permiten mantener un ambiente controlado que mantenga húmeda la herida, pero permitiendo los procesos celulares presentes en la cicatrización (9).

Una de las características más prometedoras se ha observado en diversos estudios que analizan el tejido regenerado con apósitos electrohilados con el objetivo de generar cicatrices lo más pequeñas posibles.

La tecnología del electrospinning aplicada a apósitos ha atraído a gran cantidad de investigadores e interés industrial en las últimas décadas.

2.8.4 Parámetros para el electrospinning

A pesar de que el proceso del electrospinning es simple, existen una serie de parámetros que afectan la formación y estructura de las fibras obtenidas mediante esta técnica.

Los parámetros controlados en la técnica son voltaje aplicado, tasa de flujo de la solución y distancia entre el colector y la aguja capilar.

El voltaje y el flujo son menos eficaces en el control de la morfología de las fibras en comparación de las características de la solución, intensidades de campo electromagnético por debajo de la necesaria puede provocar defectos de aglomeraciones en las fibras o fallas en la formación del chorro (64). También pueden ocurrir cambios morfológicos al cambiar la distancia entre la aguja y el colector.

Las condiciones ambientales incluyen factores como humedad, temperatura, presión atmosférica, la humedad influye principalmente en la formación de poros debido a la evaporación del solvente. El aumento de la temperatura afecta la velocidad del proceso, dependiendo de la volatilidad del solvente, aunque puede provocar la formación de aglomeraciones (61).

2.8.4.1 Propiedades de la solución

Propiedades como viscosidad, conductividad, constante dieléctrica, tensión determinan la facilidad de electrohilar del material. La concentración de la solución afecta tanto a la viscosidad como a la tensión superficial, parámetros que son muy importantes en el proceso; la solución debe de estar lo suficientemente concentrada para la formación de las fibras, si la concentración es baja la fibra se puede romper debido a la fuerza del campo electromagnético, al contrario, si la concentración es tan alta que aumenta la viscosidad, la fuerza del campo no puede vencer la tensión superficial.

El diámetro de las fibras producidas depende directamente de la concentración, si la concentración es baja se producen fibras más delgadas; si la concentración disminuye mucho provoca que la uniformidad de la fibra se rompa y se formen aglomeraciones. Se ha demostrado que los factores principales que provocan la formación de aglomeraciones en el proceso de electrohilado son viscosidad, tensión superficial y la densidad de carga neta (65).

La elección del solvente es importante para las características de las fibras electrohiladas, para que se produzca evaporación suficiente del disolvente entre la punta capilar y el colector se debe usar un solvente volátil.

2.9 Capacidad de electrospinning del quitosano

Es muy común en el electrospinning que utilizando algunos polímeros se presenten irregularidades como la formación de cúmulos o un inadecuado estiramiento de las fibras electrohiladas provocando rupturas (69).

La capacidad de electrospinning del quitosano está limitada debido a su naturaleza poliónica la cual genera insolubilidad en la mayoría de solventes orgánicos comunes; es prácticamente soluble únicamente en soluciones ácidas (70). La formación de enlaces de hidrógeno en la estructura del quitosano limita el movimiento libre de la cadena polimérica, provocando que la fibra se rompa durante el proceso de electrospinning (71).

Existen pocos reportes donde el quitosano puro ha sido utilizado en electrospinning con éxito utilizando distintos solventes basados en ácido acético como el ácido trifluoroácido acético (TFA) (50,51) en distintas concentraciones, 1,1,1,3,3,3-hexaflúor-2-propanol también ha sido usado como solvente (73) donde se necesitó una posterior purificación para retirar el solvente de las fibras (74).

Una de las soluciones comúnmente usadas para este problema ha sido agregar agentes de ayuda para electrospinning como sales u otros polímeros; en concreto, se han logrado obtener fibras combinando el quitosano con bajas concentraciones de otros polímeros como el polivinil alcohol (PVA)(69,75), gelatin o colágeno, fibroína, policaprolactona (75,76), pero principalmente con poli óxido de etileno (77). Estos agentes de ayuda pueden proveer mayor entrelazamiento de cadenas poliméricas y/o reducir interacciones electrostáticas repulsivas.

2.10 Surfactantes

Uno de los principales factores que afectan a la morfología de las fibras resultantes del electrospinning es la tensión superficial de la solución polimérica que se utilizará ya que de eso dependerá la magnitud de la diferencia de voltaje aplicada entre la aguja y el colector; con un inadecuado estiramiento de la solución polimérica, se producen aglomeraciones del material que se pueden identificar como defectos en las fibras.

Los surfactantes son moléculas anfifílicas o anfipáticas que se absorben fácilmente en las superficies y por lo tanto disminuyen la tensión superficial del medio en el que se encuentran disueltos (78).

Han sido utilizados en el electrospinning como un componente que ayuda a reducir la tensión superficial y aumentar la densidad de carga neta de las soluciones poliméricas usadas (79); varios estudios han demostrado que la incorporación de surfactantes catiónicos a dichas soluciones mejoran considerablemente la morfología de las nanofibras; y en algunos casos se ha encontrado que el voltaje requerido para electrohilar una solución polimérica disminuye con la adición de éste tipo de compuestos (80).

Si bien son de gran ayuda para mejorar las condiciones de la técnica, es importante tener en cuenta que por encima de una concentración crítica de surfactante en una solución se forman estructuras coloidales.

2.11 Normas generales de bioseguridad en el laboratorio

- 1.-Reconocer que la salud del personal es lo más importante.
2. Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo al iniciar y finalizar la jornada de trabajo.
3. Está prohibido comer, beber, fumar y/o almacenar comida dentro del área de trabajo.
4. Mantener el cabello corto o recogido.
5. No pipetear sustancia alguna con la boca. En lugar de ello utilizar peras de plástico o pipetas automáticos.
6. Los tubos que se introduzcan a la centrífuga deben ir tapados; no se debe detener manualmente la centrífuga ni destaparla antes de que cese de girar.
7. Evitar contacto con agujas y elementos punzocortantes.
8. No permitir la entrada de personas ajenas al laboratorio y/o que no tengan sus implementos de bioseguridad adecuados.
9. Cualquier accidente, por pequeño que sea debe comunicarse al responsable del laboratorio.
10. Todos los desechos biológicos, ya sean líquidos o sólidos, tienen que ser descontaminados por el personal del laboratorio antes de su recolección y eliminación por personal especializado.
11. Todos los desechos químicos tóxicos deben almacenarse en contenedores debidamente etiquetados y mantenidos en un lugar especificado del laboratorio, mientras son removidos del área por personal especializado (81).

2.12 Manejo y disposición de materiales

Es responsabilidad de todo el personal del laboratorio separar, manipular y eliminar adecuadamente todos los desechos desde que se generan hasta su disposición final; de esta manera, se previene que el personal auxiliar, que normalmente transporta estos desechos, esté sujeto a riesgos no controlados (82).

El laboratorio donde se llevará a cabo la investigación cuenta con el personal capacitado para la disposición final de los materiales de desecho del laboratorio, el papel de los estudiantes es el de hacer la correcta clasificación de los residuos para su adecuado manejo en el laboratorio.

Debe de determinarse el contenedor en el que será eliminado de acuerdo con el tipo de residuo que se esté desechando: de origen biológico, ácidos, bases, orgánicos e inorgánicos. Para poder eliminarse los residuos, en los contenedores apropiados para cada caso el volumen ocupado no debe de ser mayor a $\frac{3}{4}$ de la capacidad del contenedor, esto con el fin de evitar rupturas forzadas o derrames (82).

Capítulo 3

Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

Las combinaciones de quitosano con aloe vera, y quitosano con *triticum vulgare*, en forma de membranas, generadas a partir de la técnica de electrospinning, tendrán bajo porcentaje de citotoxicidad y una alta viabilidad celular, que permitan sugerirlos como candidato potencial para su aplicación como acelerador de la cicatrización.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Desarrollar membranas basadas en mezcla de quitosano por la técnica de electrospinning que permitan alta viabilidad celular comprobada mediante pruebas *in vitro*

3.2.2 Objetivos específicos

- 1.-Sintetizar nanofibras de Quitosano – Aloe Vera y Quitosano – Triticum Vulgare, mediante la técnica de electrospinning para obtener las membranas.
- 2.-Síntesis de nano fibras de Quitosano-*Triticum vulgare* mediante la técnica de electrospinning para obtener la membrana.
- 3.-Caracterizar las membranas mediante microscopía electrónica de barrido, espectroscopía de infrarrojo y espectroscopía de ultravioleta visible para determinar la morfología y propiedades químicas.
- 4.-Evaluar las membranas mediante pruebas *in vitro* para comprobar la viabilidad y citotoxicidad del material.

5. Justificación

El cuidado de las heridas cutáneas es de gran importancia para la salud ya que la función principal de la piel es servir como barrera protectora contra el medio ambiente (83), regular la temperatura, participar en el funcionamiento del sistema nervioso, regulación del contenido de agua y proteger al organismo de lesiones mecánicas (84); por lo tanto, el tratamiento de las heridas debe de ser realizado de la manera más eficiente para que las heridas cutáneas sanen y la piel cumpla con sus funciones normales.

Aunque existen muchos esfuerzos en el tema del cuidado de una herida, actualmente no se ha desarrollado una terapia ideal que promueva proceso de curación un rápido y eficiente; los apósitos más comunes disponibles comercialmente están elaborados de polímeros sintéticos o naturales en forma de gasas y vendajes que tiene un papel pasivo en el proceso de cicatrización (85), es decir, solamente protegen el sitio herido de agentes contaminantes y absorben exudados de manera no controlada.

La regeneración de tejidos epiteliales abordada desde las nanofibras es ampliamente utilizada debido a las similitudes entre las nano fibras y la membrana basal, la técnica del electrospinning se ha convertido en un método sencillo, rápido y de bajo costo para sintetizar membranas con una microestructura semejante a la matriz extracelular. En comparación con las membranas micro fibrosas y los andamios tradicionales los andamios nano fibrosos pueden minimizar la respuesta inflamatoria cuando se implantan en el sitio de defecto, acelerando así la curación y la regeneración del tejido (66).

Para este tipo de aplicaciones es necesario que los apósitos cubran ciertos requerimientos para que funcionen, para mejorar la cicatrización deben de ser no tóxicos, no alergénicos y presentar efectos antimicrobianos, además deben de promover la migración y proliferación celular, previniendo el crecimiento celular dentro de las nano fibras ya que deben de estar diseñados para ser removidos una vez que la herida sane.

Tanto el quitosano como Aloe Vera y el extracto de *triticum vulgare* tienen propiedades que permiten la proliferación y maduración de muchas de las células involucradas en el proceso de cicatrización en sus distintas etapas como fibroblastos y macrófagos y está demostrado que los compuestos utilizados no muestran problemas de biocompatibilidad.

Capítulo 4

Metodología

Para el procedimiento se usaron quitosano (CH) de medio peso molecular, poli (óxido de etileno) (PEO), ambos de la marca Sigma Aldrich, Aloe Vera liofilizado y pulverizado sin purificación adicional, aceite de *Triticum Vulgare* sin purificación adicional, el ácido acético glacial de la marca MEYER fue utilizado como solvente para las soluciones preparadas.

4.1 Extracción de aceite de *Triticum Vulgare*

Triticum Vulgare es el nombre científico de la planta comúnmente llamada trigo, por lo cual se utilizaron semillas de trigo comercial y fueron germinadas usando condiciones controladas durante tres semanas.

Pasados los días del crecimiento del germen se prensó en frío usando una prensa manual hasta que se extrajera el aceite.

4.2 Extracción de gel de Aloe vera

Se obtuvieron plantas de Aloe Vera comúnmente llamado sábila en México, posteriormente se separó con una espátula el gel de la corteza de la planta para liofilizarlo.

- Liofilización

Acorde con la literatura el gel de aloe vera tiene un porcentaje de agua que fluctúa entre 96-99 % (46,48,51,52) dependiendo de varios factores; para poder obtener un porcentaje exacto el gel extraído se liofilizó.

Con el material (gel) previamente congelado y almacenado en recipientes tapadas con Parafilm agujerado; utilizando el modo de refrigeración manual, con temperatura de -32°F y una presión menor a 0.5 Torr

El material resultante fue pulverizado y guardado para su posterior uso en un espacio seco para evitar que absorbiera humedad.

4.3 Síntesis de apósito de quitosano - aloe vera:

Para el procedimiento se usaron quitosano (CH) de medio peso molecular, poli (óxido de etileno) (PEO), y polvo de aloe vera (AV) (previamente descrito). Ácido acético glacial y agua destilada fueron usados como solventes para las soluciones preparadas.

La solución de quitosano al 1% (m/v) fue preparada disolviendo CH de bajo medio molecular en ácido acético al 70% y manteniéndolo en agitación hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se preparó una solución de PEO al 2.5% usando como solvente ácido acético al 70%. Las soluciones de CH y PEO fueron mezcladas en una relación 9:1 (v/v). Además, se utilizó la misma solución de CH para electrohilar sin añadir PEO para utilizar como punto de comparación entre las membranas.

La solución de Aloe Vera fue preparada al 2.5% en agua destilada usando el polvo liofilizado; posteriormente se mezcló con la solución anterior en una relación CH-PEO y CH 5:1 AV (v/v) respectivamente y se agregaron 0.15 mL de Triton x-100 por cada 2mL de solución. Se mantuvieron bajo agitación constante hasta obtener una mezcla homogénea.

Para el electrohilar se utilizó una bomba New Era Pump Systems modelo NE-300, una fuente DC con un máximo de 30 kV y un colector diseñado para el experimento. Se utilizaron los siguientes parámetros para la configuración del equipo:

- Jeringa de plástico de 10 mL con un diámetro interno de 15mm y una punta de aguja de Gauge (calibre) de 18 G.
- Distancia entre la punta de la aguja y el colector: 15 cm
- Velocidad del flujo: 0.89 mL/h
- Voltaje de la fuente: 23 KV.

Después de fabricar la membrana se expusieron durante 15 minutos en luz UV para realizar entrecruzamiento.

4.4 Síntesis de apósito de quitosano *triticum vulgare*:

Para el procedimiento se usaron quitosano (CH) de medio peso molecular, poli (óxido de etileno) (PEO), aceite de *Triticum Vulgare* (previamente descrito). Ácido acético glacial y agua destilada fueron usados como solventes para las soluciones preparadas.

Las soluciones de CH, PEO y CH-PEO se realizaron siguiendo el mismo método que el apartado anterior.

Las soluciones a electrohilar se prepararon al 1% de aceite de *Triticum Vulgare*, disolviéndolo en las soluciones previamente preparada de CH-PEO y CH agregando 0.15 mL de Triton X-100 por cada 2mL de solución. Se mantuvieron bajo agitación constante hasta obtener una mezcla homogénea.

Para el proceso de electrohilado se utiliza el equipo descrito previamente, con los siguientes parámetros. Se utilizaron mismos parámetros mencionados en la configuración del equipo:

Después de fabricar la membrana se expusieron durante 15 minutos en luz UV para realizar entrecruzamiento

4.5 Caracterización Aloe Vera.

Para comparar el Aloe Vera extraído con el reportado en la literatura se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis en un rango de 200 a 400 nm y una resolución de 2nm.

4.6 Caracterización de las membranas.

Las muestras utilizadas fueron las siguientes:

Q – Membrana de quitosano

QP – Membrana de Quitosano, PEO

QPA – Membrana de Quitosano, PEO y Aloe Vera

QPT – Membrana de Quitosano, PEO y *Triticum Vulgare*

Se hicieron las siguientes pruebas:

4.6.1 Microscopía electrónica de barrido

Para analizar la morfología de las fibras obtenidas se utilizó un microscopio electrónico de barrido con una potencia de 10 kV WD10 mmss45.

4.6.2 Pruebas de hinchamiento

El comportamiento del hinchamiento de los apósitos diseñados fue probado introduciendo las membranas del mismo tamaño aproximadamente en agua destilada durante 0, 1, 2, 3, y 24 horas; antes de pesar cada una de las muestras hinchadas se retiró la mayor cantidad de agua superficial posible y el índice de hinchamiento se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de hinchamiento} = \frac{W_h - W_m}{W_m} \times 100 \quad (1)$$

4.6.3 Pruebas mecánicas

Para observar el comportamiento mecánico de los apósitos diseñados se realizaron pruebas de resistencia a la ruptura observando así el esfuerzo máximo que pueden soportar antes de romperse.

El análisis fue realizado usando tiras de 20 mm x 8 mm, se colgaron de ellas distintos pesos hasta que la estructura del apósito cediera y se realizaron los cálculos usando la siguiente fórmula.

$$\text{Tensión en la ruptura (MPa)} = \frac{F (N)}{\text{Grosor(mm)} \times \text{Ancho(mm)}} \quad (2)$$

4.6.4 Espectroscopía infrarroja

Para estudiar las características químicas y composicionales de las membranas diseñadas se realizaron estudios de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier en modo reflexión total atenuada (ATR) usando un espectrómetro Spectrum Two™ FT-IR de la marca PerkinElmer. Las muestras fueron montadas en el espejo y cada espécimen fue escaneado entre 4000 y 400 cm^{-1} con una resolución de 4cm^{-1}

4.6.5 Pruebas de viabilidad celular (MTT)

Para evaluar la viabilidad de las membranas de nanofibras de quitosano, aloe vera y *Triticum vulgare*.

En el estudio se analizaron 2 membranas contra un control, por 4 tiempos tiempos y por triplicado cada uno: 24, 48, 96 y 168 horas.

Los materiales necesarios para el desarrollo del experimento fueron:

- Placas de 24 pozos realizar ensayo
- MTT
- Solvente MTT (isopropanol, reactivo común)
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Placa de 96 pozos para medición ELISA
- Medidor ELISA con longitudes de onda de 596 y 655 nm.
- Puntas de micropipeta (todos los tamaños) estériles.
- Cámara de Neubauer (hemocitómetro), pipeteador automático, bote para desechos de puntas y medio de cultivo.
- Medio de cultivo DMEM, suero bovino, gentamicina y PBS.
- Pinzas estériles para manipular membranas.

Preparación de membranas:

Se cortaron membranas en cuadros de 1.0 cm² aproximadamente; posteriormente se lavó en solución de buffer de fosfato **(PBS) con 1% v/v gentamicina (X2).**

Membranas analizadas:

Quitano/PEO y aloe vera (QPA)

Quitano/PEO y Triticum (QPT)

Material de control:

Membrana de Quitano/PEO (QP)

Un día previo a la realización del experimento se descongeló y sembró un vial de células de interés (fibroblastos). Llevar a cabo su crecimiento hasta que se alcanzó la densidad celular deseada para el experimento (mínimo de 12×10^4).

Preparación de placa para experimento:

- I. Se atemperó el medio de cultivo (previamente esterilizado).
- II. Se realizó el **lavado** de los trozos de membranas **en medio de cultivo** DMEM (X2) o hasta que no se observó ningún cambio de pH (**pH neutro**), es decir, se mantuvo la coloración roja del medio o ligeramente naranja.
- III. Se colocaron las membranas previamente lavadas con PBS y antibiótico en la caja de 24 pozos, de acuerdo con el diagrama de la figura 5:

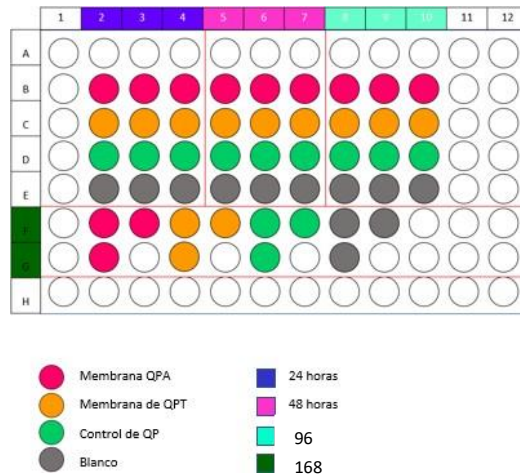


Figura 5: Diagrama de distribución de pozos.

- IV. Después se colocaron las muestras en **luz UV de la campana por 10 min** (5 min de un lado y 5 min con la caja volteada la caja)
- V. Densidad celular: Para realizar el conteo previo se centrifugó la suspensión celular a 2000 rpm durante 8 min. Posteriormente se resuspendió el pellet en 5 ml de medio nuevo y se realizó el conteo por método directo (cámara de Neubauer, por triplicado).

$$\frac{\# \text{ de células vivas}}{\# \text{ de campos}} * 1000 = \text{células vivas/ml} \quad (3)$$

Densidad celular total: _____ células/ml

- VI. **Preparación de células:** Para **obtener la densidad celular deseada (2×10^3)** se procedió a calcular el volumen necesario de STOCK de células que se requirió para cada uno de los pozos (ocupando un volumen de **0.1 ml c/u**):

$$\frac{2 \times 10^3 * 0.1 \text{ ml}}{\text{Concentración STOCK} \times 10^4} = \text{_____ ml de STOCK} \quad (4)$$

- VII. Para cada pozo se colocaron **100 µL de la suspensión celular sobre la membrana y 500 µL de medio de cultivo** suplementado con suero bovino (medio complementado) para dejarlos incubar por los tiempos mencionado anteriormente en los diagramas de colocación: **24,48, 96 y 168 horas.**

Evaluación MTT:

*Se atemperó medio de cultivo suplementario, solución MTT y solvente MTT (isopropanol).

- I. Pasado el tiempo determinado se retiró el medio de los pozos a evaluar y se desechó.
- II. Se agregaron **10 µL de solución MTT y 90 µL de medio de cultivo** suplementario, para dejarlo encubar **por 4 horas a 37 °C en ausencia de luz.**
- III. Pasado el tiempo se retiró la solución sin quitar la membrana y se agregaron **100 µL de solvente MTT (isopropanol).**

*Se agitó suavemente para retirar el MTT formazan de la mitocondria celular, si la membrana lo permite, se puede resuspender por un lado sin romperla.

- IV. Se retiró la solución de cada pozo para después medir la absorbancia en un lector de microplacas ELISA a las longitudes de onda **de 595 y 655 nm.**
- V. Se realizó cambio de medio de cultivo de los pozos que se conservaran por más tiempo.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1 Espectroscopía UV-VIS

En la figura 6 puede observarse el espectro UV-VIS de el extracto de aloe vera antes de ser liofilizado y pulverizado.

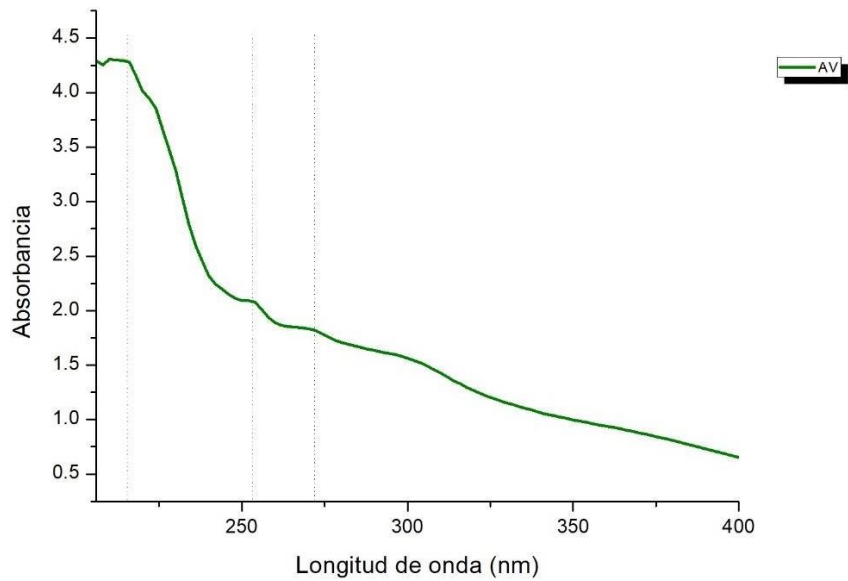


Figura 6: Espectro UV-Vis Extracto de Aloe Vera

En el espectro UV-VIS es posible observar tres zonas donde el Aloe Vera presenta absorbancia a 250, 270 nm , longitudes de onda que posiblemente pertenezcan a la Aloína y que han sido anteriormente reportadas (92) además de la mayor absorbancia alrededor de los 210 nm debido a la presencia de moléculas de agua.

Es mediante este análisis que es posible confirmar que el gel extraído es Aloe Vera puro ya que las características principales coinciden con las reportadas

5.2 Microscopía electrónica de barrido

En las figuras 7 y 8 correspondientes a las micrografías de las muestras electrohiladas de Quitosano-Aloe Vera y Quitosano-Triticum Vulgare se pueden observar marcadas en círculos rojos claras imperfecciones en las fibras, como acumulación de material, grandes zonas con residuos y fibras con morfología poco uniforme; esto provocado por la incapacidad de las condiciones utilizadas de propiciar un estiramiento uniforme del material al no ser capaz el campo magnético de romper la tensión superficial de la solución polimérica bombeada debido a la naturaleza de las cargas del quitosano impidiendo la correcta polarización del material para la técnica del electrospinning.

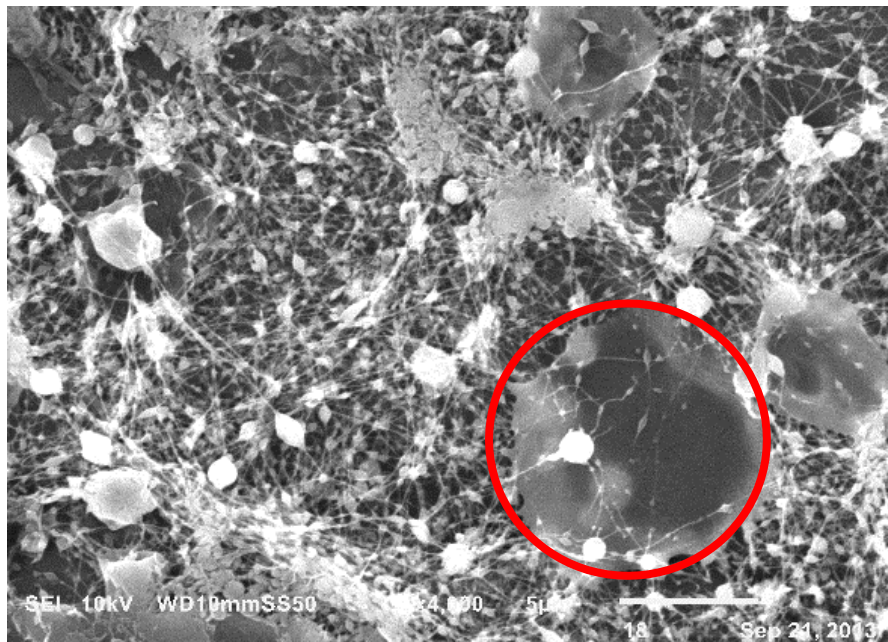


Figura 7: Apósito electro hilado de Quitosano- Aloe Vera

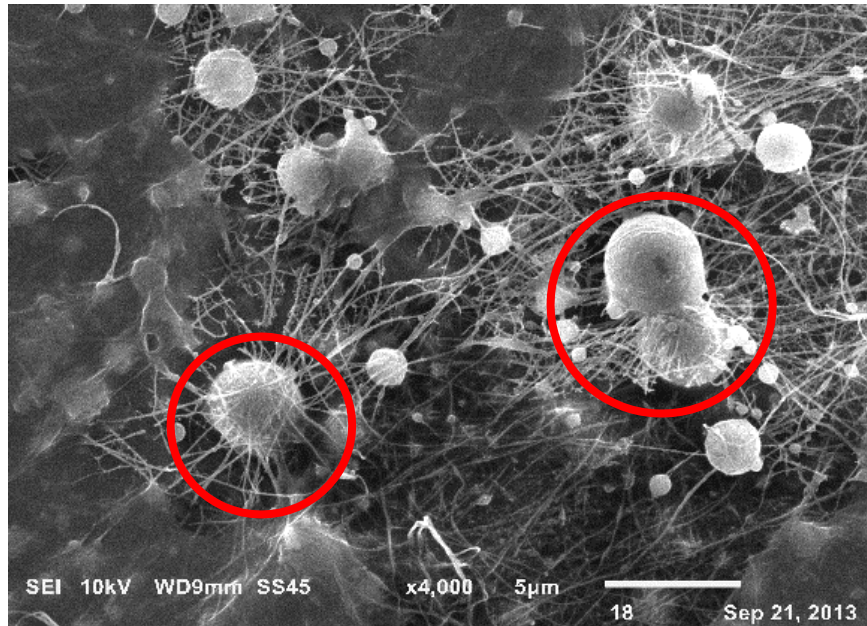


Figura 8: Apósito electrohilado de Quitosano - Triticum Vulgare

Para intentar solucionar el problema de la capacidad de electrospinning se agregó poli (óxido de etileno), en la figura 9 se muestran las fibras electro hiladas de este apósito pudiendo observar muy pocas imperfecciones y fibras con diámetros uniformes con un promedio de 128 nm y una distribución mayoritaria entre los 50 y los 100 nm.

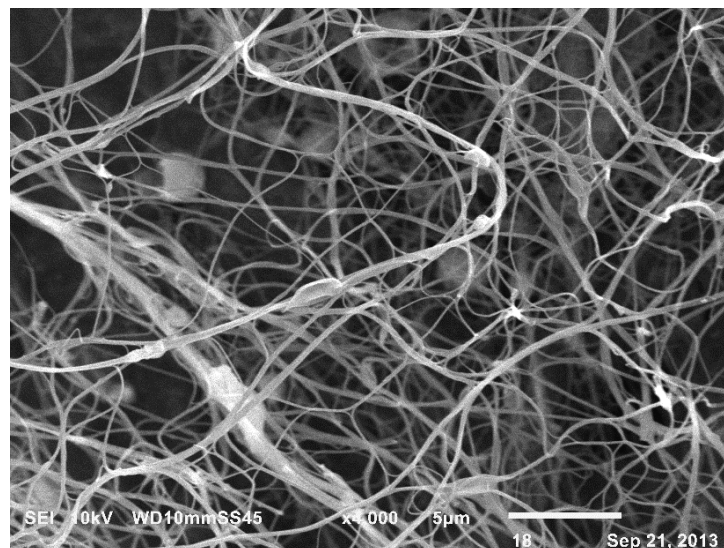


Figura 9: Apósito electro hilado Quitosano - PEO

En las figuras 10 a) y 10 b) correspondientes a las imágenes SEM de los apósitos electrohilados de Quitosano-PEO- Aloe Vera y Quitosano-PEO-Triticum Vulgare respectivamente; las nano fibras electrohiladas para ambos apósitos muestran diámetros uniformes con muchas menos imperfecciones y una alta porosidad.

El diámetro de las fibras fue analizado usando el software ImageJ haciendo 100 mediciones en cada una de las imágenes SEM, los resultados se pueden observar en la figuras 11 a) y 11 b) que corresponden a los apósitos electrohilados QPA y QPT respectivamente; el diámetro promedio de las fibras de Aloe Vera es de 100 nm y la mayor concentración de diámetros se encuentra por debajo de los 110 nm; para las fibras de Triticum Vulgare el diámetro promedio es de 119 nm y la mayor concentración de diámetros se encuentra por debajo de los 110 nm. Este resultado es favorable debido a que está reportado por distintas investigaciones que fibras de hasta en el rango de 50 a 300 nm promueven la proliferación celular significativamente en comparación con fibras de mayor tamaño, posiblemente por su parecido con los componentes de la matriz extracelular (86–88).

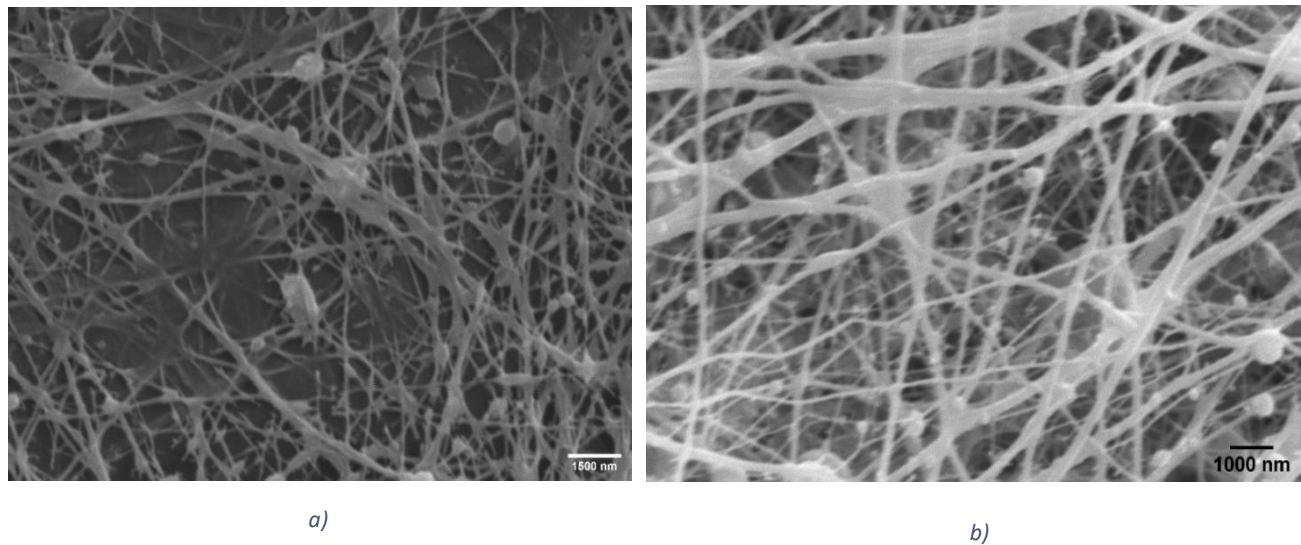
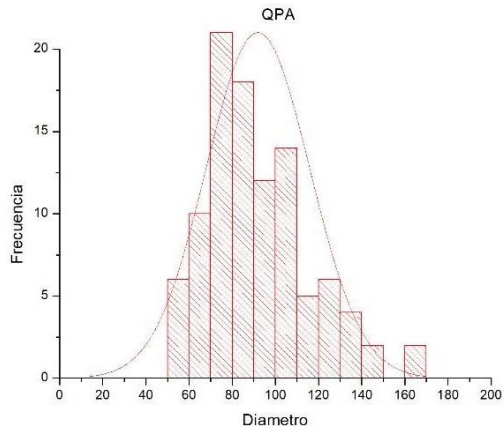
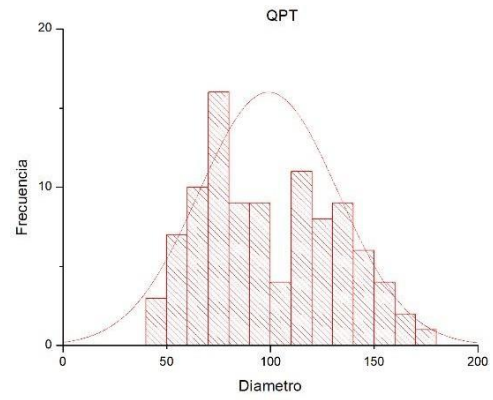


Figura 10: a) Microscopía electrónica de barrido de apósito Quitosano – PEO – Aloe Vera b) Microscopía electrónica de barrido de apósito Quitosano – PEO – Triticum Vulgare



a)



b)

Figura 11: a) Distribución de diámetros de membrana Quitosano – PEO – Aloe Vera e b) Distribución de diámetros de membrana Quitosano – PEO – *Triticum Vulgare*

5.3 Hinchamiento

La capacidad de absorber agua para un biomaterial es específicamente importante para este tipo de aplicaciones; es un factor importante ya que afecta la distribución de la suspensión celular y la transferencia de nutrientes, es por eso por lo que entre mayor sea la capacidad de hinchamiento de un apósito se espera una mejora en su desempeño.

Se puede observar en los apósitos diseñados un comportamiento en el que absorben grandes cantidades de agua, esto debido a la presencia del quitosano cuyas propiedades de hinchamiento han sido reportadas anteriormente, además de que los valores de hinchamiento obtenidos para el blanco QP concuerdan con los valores reportados para el quitosano. Como se puede apreciar en la figura 12 donde se muestra el porcentaje de hinchamiento a distintos tiempos éste aumenta en grandes cantidades desde el momento

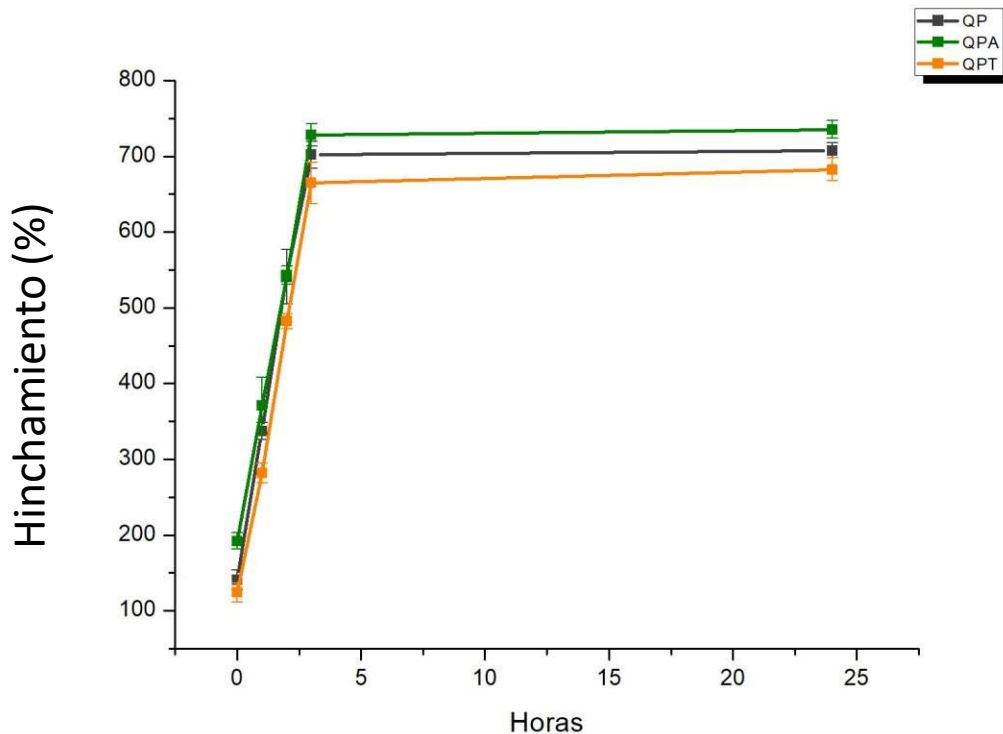


Figura 12: Porcentaje de hinchamiento en 24 horas QPA) Quitosano - PEO - Aloe Vera, QPT) Quitosano - PEO - Triticum Vulgare, QP) Quitosano PEO

0 llegando a tener un hinchamiento del 701% para el caso del apósito QP, un 737% para el apósito QPA y un 682% para QPT.

Existe evidencia de que las nanofibras fabricadas con quitosano mediante esta técnica pierden su estructura fibrosa debido a la alta capacidad de hinchamiento; este comportamiento las vuelve inapropiadas para ser utilizados en sistemas biológicos sin tener un tratamiento de entrecruzamiento para mejorar las propiedades mecánicas de las fibras fabricadas; el entrecruzamiento es una manera de mejorar la estabilidad en medios acuosos de las nanofibras de quitosano.

A pesar de que ambos apósitos tienen un alto índice de hinchamiento, es notorio un mayor incremento de este índice en el caso de las muestras de Quitosano – PEO – Aloe Vera; este comportamiento es debido a la naturaleza hidrofílica del extracto de Aloe Vera, el cual por sí mismo tiene un alto porcentaje de hinchamiento al contrario del aceite extraído del germen de trigo.

El porcentaje y el índice de hinchamiento mostrados indican que ambos apósitos tienen la capacidad de absorber gran cantidad de exudados en un corto periodo de tiempo y de propiciar un ambiente húmedo necesario para la regeneración del tejido durante el proceso de cicatrización.

5.4 Pruebas mecánicas

La figura 13 muestra la gráfica donde se pueden observar las tensiones en la ruptura de los apósitos diseñados, QP) para el apósito usado como blanco (Quitosano - PEO) con una tensión de 0.115 MPa, QPA) para el caso del Aloe vera con 0.112 y QPT) para el caso de Triticum Vulgare con 0.097 MPa;

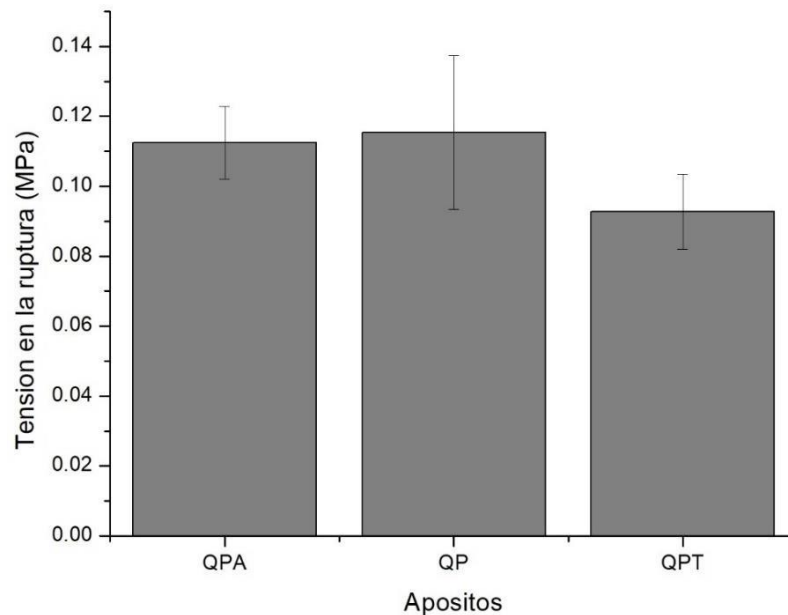


Figura 13: Tensión en la ruptura de los apósitos diseñados QPA) Quitosano - PEO - Aloe Vera, QP) Quitosano - PEO, QPT) Quitosano - PEO - Triticum Vulgare

Aunque el desempeño de los tres es muy parecido, el apósito con mejor comportamiento mecánico es el QP esta propiedad puede ser atribuida a la homogeneidad de las fibras mostrada en la figura 6, en el apartado de microscopía electrónica de barrido.

Diversos estudios reportan propiedades mecánicas similares de las nanofibras fabricadas mediante electrospinning con quitosano cuando éste interactúa con bajas concentraciones de otros materiales (89,90), obteniendo la menor tensión en la ruptura cuando las nanofibras se fabrican con quitosano puro. Por lo que es comprensible que las propiedades

mecánicas de los apósitos diseñados concuerden con esta afirmación ya que el contenido de PEO, agente utilizado para mejorar la capacidad de electrospinning del quitosano, es muy bajo (0.25%).

La reducción de la tensión en la ruptura en el caso del apósito QPA puede deberse a la interferencia de los grupos funcionales con la cadena polimérica de quitosano – PEO, fenómeno que presenta la adición de Aloe Vera con quitosano y otros polímeros usando la técnica de electrospinning (91) .

Observando las imágenes SEM (figuras 6 – 8) se puede observar la relación de la morfología de las fibras diseñadas con la tensión en la ruptura reportando que las fibras con diámetros más uniformes correspondientes al apósito QP tiene una mayor tensión en la ruptura. Comparando los apósitos QPA y QPT se observa que el que tiene una distribución de diámetros menos concentrada, es decir, que tiene diámetros muy delgados y gruesos (figura 9) tiene una tensión en la ruptura más débil.

5.5 Espectroscopía infrarroja

Los espectros infrarrojos del apósito electro hilado de Quitosano - PEO y del Quitosano puro se muestran en la Figura 14: Analizando el espectro del Quitosano puro se pueden identificar bandas características y los grupos funcionales a los que corresponden principalmente una amplia banda de 3000 a 3500 cm^{-1} atribuida principalmente a vibraciones de estiramiento de grupos -OH y posibles enlaces de hidrógeno intermoleculares (93), dos bandas a 1650 y 1590 cm^{-1} correspondientes a C=O-NHR y NH_2 o amida I y II respectivamente (78,94).

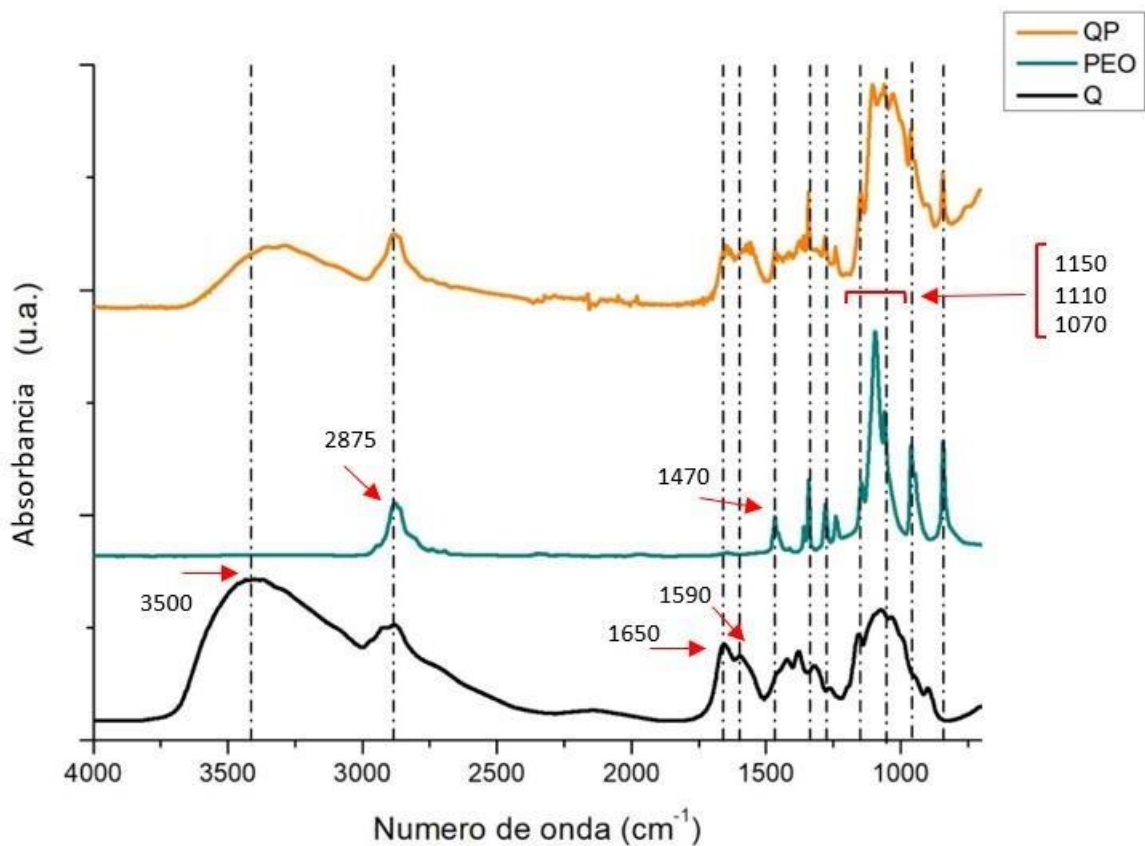


Figura 14: Espectro infrarrojo del Q) Quitosano puro PEO) Poli (óxido de etileno) puro y QP)

Apósito electro hilado de Quitosano - PEO

En el caso del PEO las bandas características empezando por la banda a 2875 que corresponden a estiramientos simétricos y asimétricos de grupos CH_2 (95), a 1470 banda atribuida a grupos CH (78) y a 1150, 1110 y 1070 correspondientes a estiramientos C-O-C de la cadena del polímero (93).

Una de las interacciones más importantes observadas en la comparación de los espectros de Quitosano y Quitosano PEO, es la disminución de la absorbancia y el desplazamiento a número de onda menores en la banda de 3500 a 3100 cm^{-1} la cual puede ser atribuida a la formación de enlaces de hidrógeno entre los dos componentes disminuyendo la cantidad de grupos -OH. De la misma manera es observable una disminución de la banda en 1650 cm^{-1} de los grupos amida I además un desplazamiento de la banda en 1590 cm^{-1} en el espectro del quitosano, correspondiente a grupos NH_2 (amida II), hacia número de onda menor (1567 cm^{-1}), fenómeno que indica la reacción de estos dos grupos con el PEO (71).

Estas interacciones son las causantes del mejoramiento de la capacidad de electrospinning del Quitosano, debido a la naturaleza de sus cargas que sin presencia del PEO interactúan con la misma cadena polimérica evitando un correcto estiramiento con la técnica utilizada; al contrario que en presencia de éste con los enlaces mencionados evita que el Quitosano tenga interacciones con su misma cadena y la polarización sea correcta para la técnica.

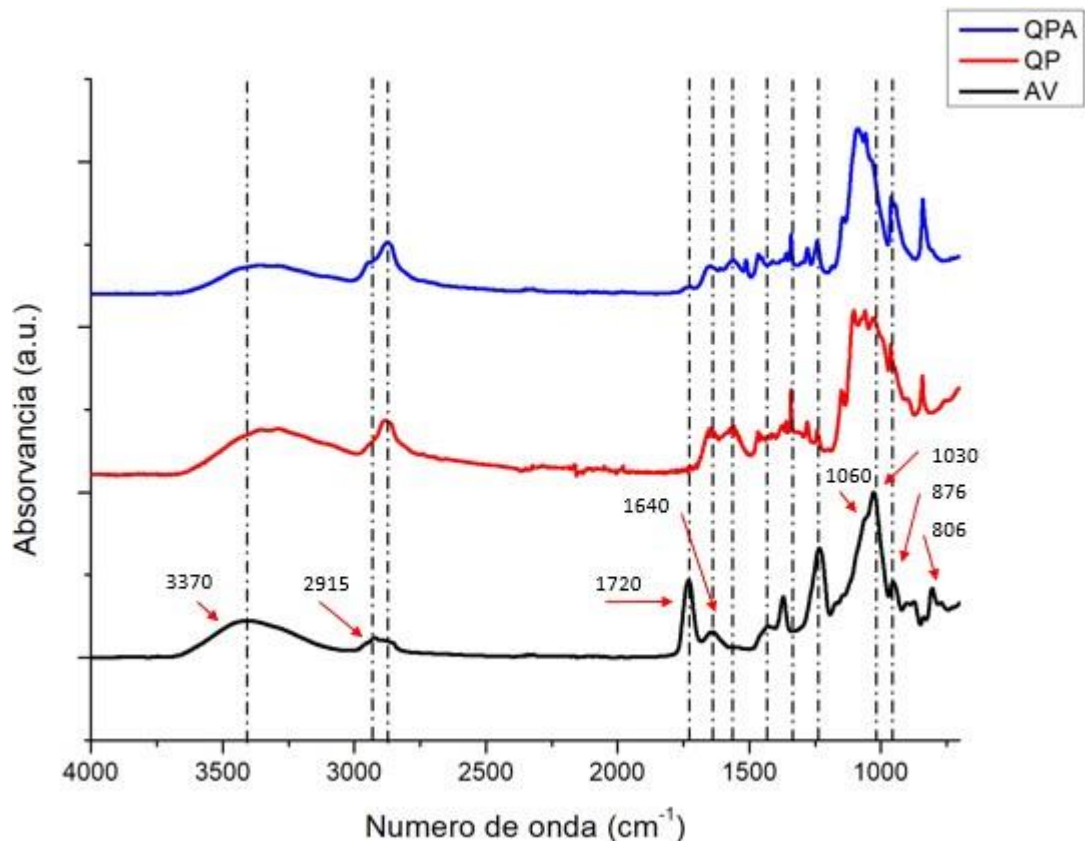


Figura 15: Espectro FT-IR AV) Aloe Vera puro, QP) Apósito Quitosano – PEO, QPA) Apósito Quitosano – PEO – Aloe Vera

La figura 15 muestra los espectros IR del Aloe Vera Puro, el apósito diseñado con Quitosano – PEO y el apósito Quitosano – PEO – Aloe Vera.

Las bandas características del Aloe Vera se encuentran: alrededor de los 3370 cm^{-1} usualmente atribuida al estiramiento de enlaces N-H, característico de aminoácidos presentes en el gel extraído de la planta (91) además del estiramiento de grupos OH característico de los monómeros en los carbohidratos como la manosa y el ácido galacturónico (96). Una banda a 2915 cm^{-1} correspondiente a estiramientos simétricos y asimétricos de C-H (97); otra banda en 1640 cm^{-1} la cual es característica del estiramiento doble enlace C=O indicando la presencia de grupos carbonilos (91) presentes en los derivados antraquinónicos en macerados acuosos de las plantas como el Aloe Vera, en éste

caso la aloína (98) y a los 1720 cm^{-1} una fuerte banda atribuida al estiramiento los enlaces C=C presentes en los mismos compuestos. La fuerte banda a 1646 cm^{-1} indica el estiramiento de enlaces C=C presentes en compuestos como la aloína, un monosacárido presente en el gel; y a 1030 debido a las unidades de glucanos (99), la banda a 1060 puede deberse a enlaces C-O asociados a los distintos polisacáridos que se encuentran en el gel como ramnogalacturonan (96). Está también reportada una banda a 876 cm^{-1} correspondiente la vibración C-H en el anillo de las piranosas y a 806 cm^{-1} asociada a la manosa (99).

La principal interacción mostrada es la disminución de la absorbancia en la banda correspondiente al C=O indicando de esta manera su interacción con el Quitosano y el PEO, posiblemente con los grupos amino cuya intensidad de absorbancia se ve disminuida cuando está en contacto con el Aloe Vera. Además de presentar también un corrimiento hacia números de onda menor en la zona de los grupos -OH relacionado con la interacción mediante enlaces de hidrógeno.

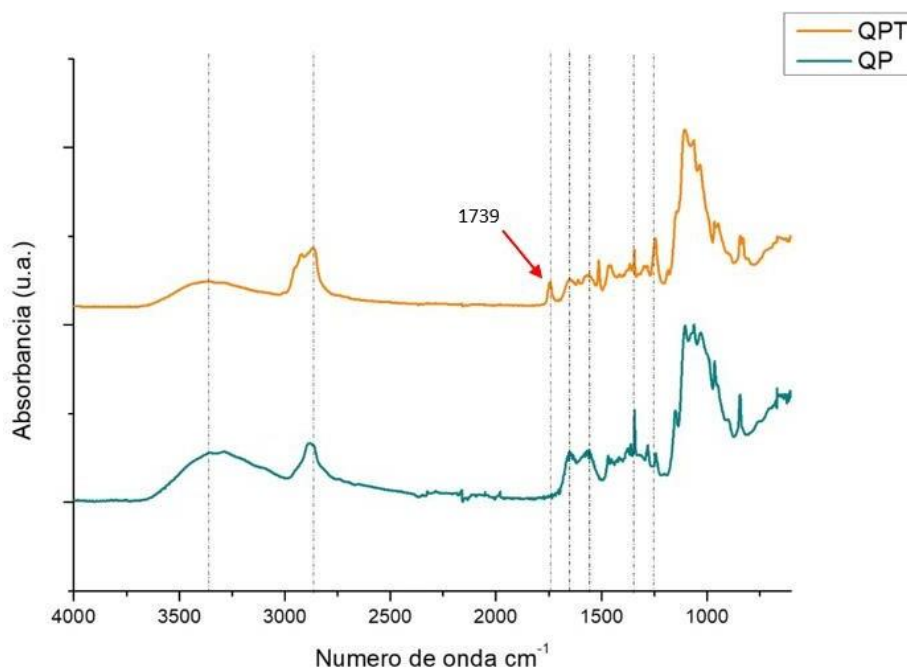


Figura 16: Espectro FTIR de, QP) Apósito Quitosano – PEO, QPT) Apósito Qutosano - PEO - Triticum vulgare

En el caso del apósito Quitosano – PEO – Triticum Vulgare, mostrado en la figura 16 es importante analizar las diferencias encontradas en la región de 1750 a 1700 cm^{-1} , la banda presente en 1745 cm^{-1} atribuida a las vibraciones de enlace C=O del enlace tipo éster de los lípidos (100).

Comparando los espectros de los apósitos Quitosano – PEO – Aloe Vera y Quitosano – PEO – Triticum vulgare con respecto al Quitosano – PEO se puede observar disminución en la absorbancia a los números de onda correspondientes a los grupos aminos, grupos funcionales que en la estructura del quitosano son los responsables de la gran capacidad de hinchamiento del polímero, dicha disminución indica la cantidad de grupos disponibles por lo que disminuye su capacidad de retener agua; por otro lado el Aloe Vera tiene una gran capacidad de hinchamiento por sí sólo, esto comprueba los resultados obtenidos en las pruebas de hinchamiento realizadas mostrados en la figura 11.

5.6 Viabilidad celular

Para evaluar el potencial de los apósitos diseñados se realizó un ensayo MTT usando células 3T3 (fibroblastos) para comparar QP (Quitosano – PEO), QPA (Quitosano - PEO – Aloe Vera) y QPT (Quitosano - PEO – *Triticum Vulgare*); el ensayo se realizó a 4 tiempos 24, 48, 96 y 168 h. y los resultados se pueden observar en la Figura 17.

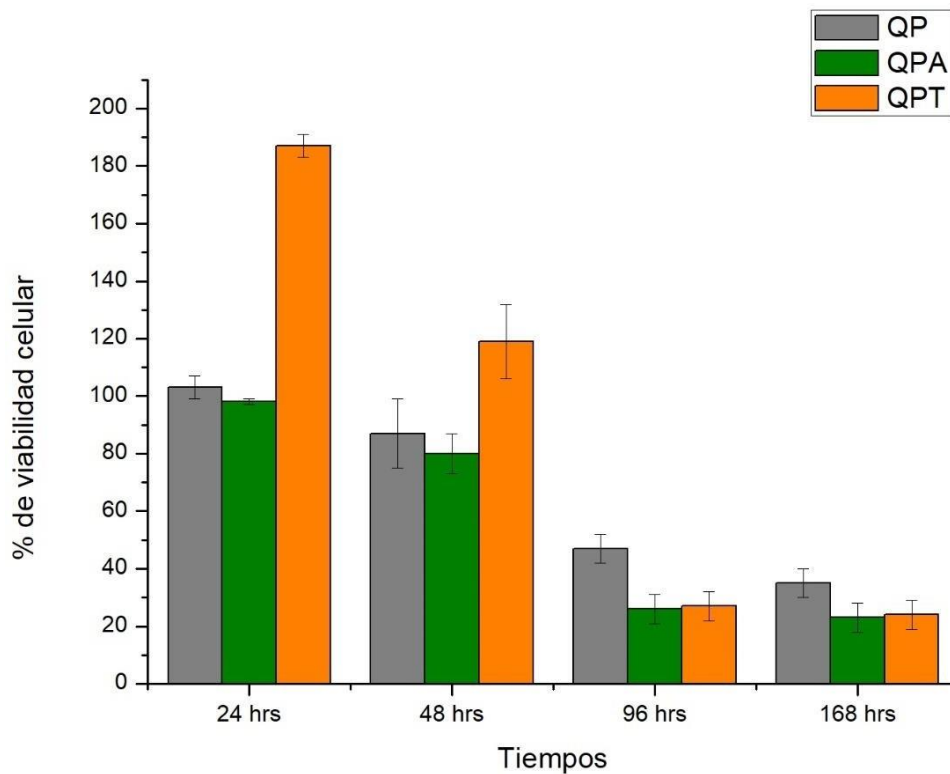


Figura 17: Porcentaje de viabilidad celular evaluado mediante el ensayo MTT

Como puede observarse en la figura durante las primeras 48 horas del experimento el material tiene altos porcentajes de viabilidad celular, a 24 horas, 119% para QP, 97% para QPA y 187% para QPT; a 48 horas 97% para QP, 76% para QPA y 119% para QPT, según la norma ISO 10993-5: 1999 muestras con un porcentaje de viabilidad celular mayor a 75% pueden ser consideradas como no tóxicas (101).

La primera característica notoria es que en los tiempos anteriormente mencionados el apósito QPT es el que muestra un mejor desempeño, un resultado esperado debido a que ha sido probado anteriormente su uso clínico y la alta capacidad de proliferación de fibroblastos que presenta.

Es importante observar también no existe una diferencia significativa entre la viabilidad celular de QP y QPA en las primeras 48 horas, lo cual indica que el Aloe Vera no induce citotoxicidad y mantiene un alto porcentaje de viabilidad celular como ha sido reportado por distintas investigaciones (91,102–104).

Debido a la naturaleza catiónica del quitosano, está esperado que la respuesta con cultivo celulares sea una viabilidad celular favorable y que el material presente una alta adhesión celular, sin embargo, ha habido pocos estudios donde el quitosano en conjunto con el PEO no presenta características tan prometedoras.

Existen algunos reportes donde el PEO en concentraciones en el rango de 0.25 a 0.4 % utilizado en conjunto con el Quitosano muestra una inhibición de la proliferación celular a una exposición mayor a 72 horas (105,106).

Por todo lo anterior es posible decir que los apósitos diseñados tienen una alta viabilidad celular, específicamente en el caso del *Triticum Vulgare* dentro de un periodo menor a 48 horas.

Capítulo 6

Conclusiones

En esta investigación se realizó el diseño exitoso de apósitos de nano fibras compuestos de Quitosano – PEO – Aloe Vera y Quitosano – PEO – *Triticum Vulgare* mediante la técnica de electrospinning; comparando las imágenes SEM de las membranas sin la presencia del polióxido de etileno se puede comprobar el efecto positivo que tiene para la fabricación de las nano fibras obteniendo pocas aglomeraciones de material no electro hilado y fibras con diámetros uniformes, para el caso de QPA con un diámetro promedio de 100 nm y para QPT de 119 nm resultado exitoso ya que está comprobado que apósitos diseñados con fibras en un rango de 50 a 300 nm son favorables para una buena viabilidad celular.

Haciendo uso de la espectroscopia UV-Vis es posible comprobar el uso de Aloe Vera puro comparando el espectro con el reportado en la literatura.

Mediante el análisis de espectroscopía infrarroja de los materiales utilizados y de los apósitos diseñados es posible observar sus interacciones siendo de las más importantes la disminución de la absorbancia en $3100-3500\text{ cm}^{-1}$, dicha interacción indica la disminución de grupos OH del quitosano y la formación de enlaces de hidrógeno con el PEO, de esta manera se ve mejorada la capacidad de electrospinning del quitosano confirmándolo con las imágenes SEM mencionadas (Figura 10).

Mediante las pruebas de hinchamiento se comprobó la alta capacidad de retención de agua de las membranas fabricadas los porcentajes de hinchamiento fueron: 737% para QPA, 701% para QPT y 682% para QPT; mostrando la alta capacidad de absorción de agua del Aloe vera, del quitosano y mediante el análisis del espectro FTIR del apósito QPT se observa la disminución de grupos amino relacionados a la alta capacidad de hinchamiento del quitosano pudiendo explicar la disminución en QPT. Debido al alto porcentaje de hinchamiento los apósitos diseñados tienen la capacidad de absorber gran cantidad de

exudados en un corto periodo de tiempo y de propiciar un ambiente húmedo necesario para la regeneración del tejido durante el proceso de cicatrización.

Con el resultado obtenido de las pruebas de viabilidad celular es posible concluir que apósitos diseñados tienen una alta viabilidad celular, específicamente en el caso del *Triticum Vulgare* dentro de un periodo menor a 48 horas, lo cual permite sugerirlos como candidatos potenciales para su aplicación como acelerador de cicatrización.

Referencias

1. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585–601.
2. Guo S, DiPietro LA. Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219–29.
3. Boateng J, Catanzano O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. *J Pharm Sci [Internet].* 2015;104(11):3653–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.24610>
4. Miguel SP, Sequeira RS, Moreira AF, Cabral CSD, Mendonça AG, Ferreira P, et al. An overview of electrospun membranes loaded with bioactive molecules for improving the wound healing process. *Eur J Pharm Biopharm [Internet].* 2019;139(March):1–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.03.010>
5. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J Pharm Sci [Internet].* 2008;97(8):2892–923. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21210>
6. Ambekar RS, Kandasubramanian B. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *Eur Polym J.* 2019;117(March):304–36.
7. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528–42.
8. Percival NJ. Classification of Wounds and their Management. *Surg.* 2002;20(5):114–7.
9. Zahedi P, Rezaeian I, Ranaei-Siadat SO, Jafari SH, Supaphol P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym Adv Technol.* 2010;21(2):77–95.
10. Steiner TJ, Fontebasso M, Brutto OHD. Clinical review. *Bmj.* 2002;325(7369):881.
11. Senet P. Fisiología de la cicatrización cutánea. EMC - Dermatología [Internet]. 2008;42(1):1–10. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1761-2896\(08\)70356-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1761-2896(08)70356-X)

12. Simões D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonça AG, Correia IJ. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2018;127(December 2017):130–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>
13. Bravo MG, Rivero NA, Pozos SG, Flores JK, Tapia Ramírez J, Acosta JB, et al. Cicatrización de heridas cutáneas y papel de los miofibroblastos. *Panor Cuba y Salud*. 2018;13(5):505–10.
14. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M, Weller K, et al. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J*. 2006;20(13):2366–8.
15. Kitami CE, Kurosaki I, Yokoyama N, Kosugi S, Hatakeyama K, Tsukada K. Hepatocellular carcinoma and splenic artery aneurysm arising in a patient with Budd–Chiari syndrome: A case report. *Japanese J Gastroenterol Surg*. 2004;37(11):1743–7.
16. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med*. 2006;23(6):594–608.
17. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. A brief history of wound care. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 SUPPL.):6–11.
18. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(2):185–206.
19. V S, Tripathy R, NJ AN, John NS, P S. Conventional care of wounded in *Susruta Samhita*—A Review. *Int J Ayurvedic Med*. 2016;7(1):21–3.
20. Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wound dressings - A review. *Biomed*. 2015;5(4):24–8.
21. Augustine R, Rehman SRU, Ahmed R, Zahid AA, Sharifi M, Falahati M, et al. Electrospun chitosan membranes containing bioactive and therapeutic agents for enhanced wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2020;156:153–70.
22. Martinengo L, Olsson M, Bajpai R, Soljak M, Upton Z, Schmidtchen A, et al. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Epidemiol* [Internet]. 2019;29:8–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.10.005>
23. Berger AG, Chou JJ, Hammond PT. Approaches to Modulate the Chronic Wound Environment Using Localized Nucleic Acid Delivery. *Adv Wound Care*. 2021;10(9):503–28.
24. Gazi U, Taylan-Ozkan A, Mumcuoglu KY. The effect of *Lucilia sericata* larval excretion/secretion (ES) products on cellular responses in wound healing. *Med Vet Entomol*. 2021;35(3):257–66.
25. Vela G, Stegensek E, Lejia C. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc* [Internet]. 2018;26(2):105–14. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf>
26. Todros S, Todesco M, Bagno A. Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration. *Processes*. 2021;9(11).
27. Ratner BD, Zhang G. A History of Biomaterials [Internet]. Fourth Edi. *Biomaterials Science*. Elsevier; 2020. 21–34 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00002-7>
28. He W, Benson R. 8 Polymeric Biomaterials [Internet]. Second Edi. *Applied Plastics Engineering Handbook*. Elsevier Inc.; 2017. 145–164 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-39040-8/00008-0>

29. Khan F, Tanaka M. Designing smart biomaterials for tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):1–14.
30. Gómez V, Estrada M, Requena V, González R, Armendariz O. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Rev Mex Ing Biomed*. 2016;37(3):235–49.
31. Moura LIF, Dias AMA, Carvalho E, De Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - A review. *Acta Biomater* [Internet]. 2013;9(7):7093–114. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.033>
32. Naseri-Nosar M, Ziora ZM. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites [Internet]. Vol. 189, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd.; 2018. 379–398 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.003>
33. Homayoni H, Ravandi SAH, Valizadeh M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2009;77(3):656–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.008>
34. Gallardo MGC, Barbosa RC, Fook MVL, Sabino MA. Síntesis y caracterización de un novedoso biomaterial a base de quitosano modificado con aminoácidos. *Matéria (Rio Janeiro)*. 2019;24(3).
35. Salzano de Luna M, Castaldo R, Altobelli R, Gioiella L, Filippone G, Gentile G, et al. Chitosan hydrogels embedding hyper-crosslinked polymer particles as reusable broad-spectrum adsorbents for dye removal. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2017;177(August):347–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.006>
36. Saha P. Functional Biomaterials HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates : Extent of Cytotoxicity , Cell Viability and Proliferation. 2014;(June).
37. Ranjbar R, Yousefi A. Effects of Aloe Vera and Chitosan Nanoparticle Thin-Film Membranes on Wound Healing in Full Thickness Infected Wounds with Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus. *Bull Emerg Trauma*. 2018;6(1 JAN):8–15.
38. Doderò A, Brunengo E, Alloisio M, Sionkowska A, Vicini S, Castellano M. Chitosan-based electrospun membranes: Effects of solution viscosity, coagulant and crosslinker. *Carbohydr Polym*. 2020;235(January).
39. Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine¹ This work was supported by “973” programs on severe trauma (NO. 1999054205 and NO. 2005CB522605) from the Ministry of Science and Technology of China. *J Surg Res*. 2006;133(2):185–92.
40. Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Banaprasert T, Damrongsakkul S. Properties of Collagen / Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering Fabrication of Collagen / Chitosan Scaffolds. *J Met Mater Miner*. 2006;16(1):37–44.
41. Wang XH, Li DP, Wang WJ, Feng QL, Cui FZ, Xu YX, et al. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*. 2003;24(19):3213–20.
42. Gasteier P, Reska A, Schulte P, Salber J, Offenhäusser A, Moeller M, et al. Surface grafting of PEO-based star-shaped molecules for bioanalytical and biomedical applications. *Macromol Biosci*. 2007;7(8):1010–23.
43. Theodosopoulos G V., Zisis C, Charalambidis G, Nikolaou V, Coutsolelos AG, Pitsikalis M. Synthesis, characterization and thermal properties of poly(ethylene oxide), PEO, polymacromonomers via anionic and ring opening metathesis polymerization. *Polymers (Basel)*. 2017;9(4).
44. Berri N, Fares J, Fares Y. Polyethylene Oxide and Silicon-Substituted Hydroxyapatite Composite: A

- Biomaterial for Hard Tissue Engineering in Orthopedic and Spine Surgery. *Adv Biomed Res.* 2018;7(1):117.
45. Araujo TM. Single Polymer Micro - and Nano - Composites Doctoral School in Materials Science and Engineering Single Polymer Micro- - and Nano- - Composites XXV cycle. 2014.
 46. Leal X MO. Extraction, Characterization and Properties of the Gel of Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) Cultivated in Chile. *Med Aromat Plants.* 2015;04(03).
 47. Hu Y, Xu J, Hu Q. Evaluation of Antioxidant Potential of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) Extracts. *J Agric Food Chem.* 2003;51(26):7788–91.
 48. Di Scala K, Vega-Gálvez A, Ah-Hen K, Nuñez-Mancilla Y, Tabilo-Munizaga G, Pérez-Won M, et al. Chemical and physical properties of aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel stored after high hydrostatic pressure processing. *Food Sci Technol.* 2013;33(1):52–9.
 49. Aghamohamadi N, Sanjani NS, Majidi RF, Nasrollahi SA. Preparation and characterization of Aloe vera acetate and electrospinning fibers as promising antibacterial properties materials. *Mater Sci Eng C [Internet].* 2019;94:445–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.058>
 50. Hao M, Yuan X, Cheng H, Xue H, Zhang T, Zhou Y, et al. Comparative studies on the anti-tumor activities of high temperature- and pH-modified citrus pectins. *Food Funct.* 2013;4(6):960–71.
 51. Wani MY, Hasan N, Malik MA. Chitosan and aloe vera: Two gifts of nature. *J Dispers Sci Technol.* 2010;31(6):799–811.
 52. Maenthaisong R, Chaiyakunapruk N, Niruntraporn S, Kongkaew C. The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: A systematic review. *Burns.* 2007;33(6):713–8.
 53. Funel N, Dini V, Janowska A, Loggini B, Minale M, Grieco F, et al. Triticum vulgare Extract Modulates Protein-Kinase B and Matrix Metalloproteinases 9 Protein Expression in BV-2 Cells: Bioactivity on Inflammatory Pathway Associated with Molecular Mechanism Wound Healing. *Mediators Inflamm.* 2020;2020.
 54. Sanguigno L, Minale M, Vannini E, Arato G, Riccio R, Casapullo A, et al. Oligosaccharidic fractions derived from *Triticum vulgare* extract accelerate tissutal repairing processes in in vitro and in vivo models of skin lesions. *J Ethnopharmacol [Internet].* 2015;159:198–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.051>
 55. D’Agostino A, Adriana Pirozzi AV, Finamore R, Grieco F, Minale M, Schiraldi C. Molecular mechanisms at the basis of pharmaceutical grade *triticum vulgare* extract efficacy in prompting keratinocytes healing. *Molecules.* 2020;25(3):1–14.
 56. Sanguigno L, Casamassa A, Funel N, Minale M, Riccio R, Riccio S, et al. *Triticum vulgare* extract exerts an anti-inflammatory action in two in vitro models of inflammation in microglial cells. *PLoS One.* 2018;13(6):1–14.
 57. Tito A, Minale M, Riccio S, Grieco F, Colucci MG, Apone F. A *Triticum vulgare* extract exhibits regenerating activity during the wound healing process. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2020;13:21–30.
 58. Almetwally AA, El-Sakhawy M, Elshakankery MH, Kasem MH. Technology of nano-fibers: Production techniques and properties - Critical review. *J Text Assoc.* 2017;78(1):5–14.
 59. Gugulothu D, Barhoum A, Nerella R, Ajmer R, Bechelany M. Fabrication of Nanofibers: Electrospinning and Non-electrospinning Techniques. *Handbook of Nanofibers.* 2019. 45–77 p.
 60. Rasouli R, Barhoum A, Bechelany M, Dufresne A. Nanofibers for Biomedical and Healthcare

Applications. *Macromol Biosci.* 2019;19(2):1–27.

61. Ghosal K, Agatemor C, Špitálský Z, Thomas S, Kny E. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites. *Chem Eng J* [Internet]. 2019;358:1262–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.117>
62. Lannutti J, Reneker D, Ma T, Tomasko D, Farson D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C.* 2007;27(3):504–9.
63. Das A, Adhikari J, Saha P. Electrospun polymeric nanocarbon nanomats for tissue engineering [Internet]. *Nanocarbon and its Composites: Preparation, Properties and Applications.* Elsevier Ltd.; 2018. 91–122 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-102509-3.00004-3>
64. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2008;29(13):1989–2006.
65. Chronakis IS. Micro- and Nano-fibers by Electrospinning Technology: Processing, Properties, and Applications [Internet]. Second Edi. *Micromanufacturing Engineering and Technology: Second Edition.* Yi Qin; 2015. 513–548 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-31149-6.00022-0>
66. Lin W, Chen M, Qu T, Li J, Man Y. Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2020;108(4):1311–21.
67. Alharbi AR, Alarifi IM, Khan WS, Asmatulu R. Highly Hydrophilic Electrospun Polyacrylonitrile / Polyvinylpyrrolidone Nanofibers Incorporated with Gentamicin as Filter Medium for Dam Water and Wastewater Treatment Highly Hydrophilic Electrospun Polyacrylonitrile / Polyvinylpyrrolidone Nanofibers Incorporated with Gentamicin as Filter Medium for Dam Water and Wastewater Treatment. 2016;(July).
68. Jose Varghese R, Sakho EHM, Parani S, Thomas S, Oluwafemi OS, Wu J. Introduction to nanomaterials: Synthesis and applications [Internet]. *Nanomaterials for Solar Cell Applications.* Elsevier Inc.; 2019. 75–95 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813337-8.00003-5>
69. Sun K, Li ZH. Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning. *Express Polym Lett.* 2011;5(4):342–61.
70. Desai K, Kit K, Li J, Zivanovic S. Morphological and surface properties of electrospun chitosan nanofibers. *Biomacromolecules.* 2008;9(3):1000–6.
71. Pakravan M, Heuzey MC, Ajji A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer (Guildf)* [Internet]. 2011;52(21):4813–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2011.08.034>
72. Mokhena TC, Jacobs V, Luyt AS. A review on electrospun bio-based polymers for water treatment. *Express Polym Lett.* 2015;9(10):839–80.
73. Ohkawa K, Minato KI, Kumagai G, Hayashi S, Yamamoto H. Chitosan nanofiber. *Biomacromolecules.* 2006;7(11):3291–4.
74. Min BM, Lee SW, Lim JN, You Y, Lee TS, Kang PH, et al. Chitin and chitosan nanofibers: Electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. *Polymer (Guildf).* 2004;45(21):7137–42.
75. Lemma SM, Bossard F, Rinaudo M. Preparation of pure and stable chitosan nanofibers by electrospinning in the presence of poly(ethylene oxide). *Int J Mol Sci.* 2016;17(11).
76. Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, Roberto MA, Mafra M, Henriques CMR, et al. In vitro and in

- vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2015;46:348–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.051>
77. Duan B, Dong C, Yuan X. *Journal of Biomaterials Science , Polymer Edition Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly (ethylene oxide)*. 2012;(October 2014):37–41.
 78. Kriegel C, Kit KM, McClements DJ, Weiss J. Influence of surfactant type and concentration on electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers. *Food Biophys*. 2009;4(3):213–28.
 79. Zheng JY, Zhuang MF, Yu ZJ, Zheng GF, Zhao Y, Wang H, et al. The effect of surfactants on the diameter and morphology of electrospun ultrafine nanofiber. *J Nanomater*. 2014;2014.
 80. Yao L, Haas TW, Guiseppi-Elie A, Bowlin GL, Simpson DG, Wnek GE. Electrospinning and stabilization of fully hydrolyzed poly(vinyl alcohol) fibers. *Chem Mater*. 2003;15(9):1860–4.
 81. Subdirección de Investigación Biomédica. Manual Básico de Bioseguridad en los Laboratorios del INR. 2009;1–14. Available from: <http://www.inr.gob.mx/Descargas/MOP-SIB-04.pdf>
 82. Chiong M. RIESGOS ASOCIADOS Comité de Actualización. Asociados-Fondecyt-CONICYT [Internet]. 2018;2:150. Available from: <https://www.conicyt.cl/pia/files/2019/10/MANUAL-DE-NORMAS-DE-BIOSEGURIDAD.pdf>
 83. Singer AJ, Clark RAF. Epstein1999_Woundhealing. *N Engl J Med*. 1999;
 84. Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Ski Res Technol*. 2018;24(2):165–74.
 85. Mele E. Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: Towards responsive and adaptive dressings. *J Mater Chem B*. 2016;4(28):4801–12.
 86. Wang J, Windbergs M. Functional electrospun fibers for the treatment of human skin wounds. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.07.001>
 87. Molist P, Pombal MA. EXTRACELULAR. 2021;
 88. Hodgkinson T, Yuan X, Bayat A. Electrospun silk fibroin fiber diameter influences in vitro dermal fibroblast behavior and promotes healing of ex vivo wound models. 2014;
 89. Chen ZG, Wang PW, Wei B, Mo XM, Cui FZ. *Acta Biomaterialia* Electrospun collagen – chitosan nanofiber : A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomater* [Internet]. 2010;6(2):372–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.07.024>
 90. Koosha M, Mirzadeh H. Electrospinning , mechanical properties , and cell behavior study of chitosan / PVA nanofibers. 2015;(1):3081–93.
 91. Jithendra P, Rajam AM, Kalaivani T, Mandal AB, Rose C. Preparation and characterization of aloe vera blended Collagen-Chitosan composite scaffold for tissue engineering applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5(15):7291–8.
 92. Gansukh E, Gopal J, Paul D, Muthu M, Kim D. Ultrasound mediated accelerated Anti-influenza activity of Aloe vera. *Sci Rep* [Internet]. 2018;(October 2017):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-35935-x>
 93. Fuh YK, Chen S, Jang JSC. Direct-write, well-aligned chitosan-poly(ethylene oxide) nanofibers deposited via near-field electrospinning. *J Macromol Sci Part A Pure Appl Chem*. 2012;49(10):845–50.
 94. Chen Z, Mo X, Qing F. Electrospinning of collagen-chitosan complex. *Mater Lett*. 2007;61(16):3490–

- 4.
95. SRIDEVI NA@, .KARUPPASAMY K, BALAKUMAR S, SHAJAN XS. Structural and Ionic Conductivity Studies on Nanochitosan Incorporated Polymer Electrolytes for Rechargeable Magnesium Batteries. *Chem Sci Trans*. 2012;1(2):311–6.
 96. Lim ZX, Cheong KY. Effects of drying temperature and ethanol concentration on bipolar switching characteristics of natural Aloe vera-based memory devices. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2015;17(40):26833–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C5CP04622J>
 97. Hikmawati D, Rohmadanik AR, Putra AP, Siswanto, Aminatun. The Effect of Aloe vera Extract Variation in Electrospun Polyvinyl Alcohol (PVA)-Aloe vera-Based Nanofiber Membrane. *J Phys Conf Ser*. 2018;1120(1):0–8.
 98. Aloe P, Linneo V, Barbadensis A, Cáscara P, Cassia SY, Sen SP, et al. MILLER , RHEUM PALMATUM (RUIBARBO), RHAMNUS. 2011;14.
 99. Nejatizadeh-Barandozi F, Enferadi S. FT-IR study of the polysaccharides isolated from the skin juice, gel juice, and flower of Aloe vera tissues affected by fertilizer treatment. *Org Med Chem Lett*. 2012;2(1):33.
 100. Rohman A, Ariani R. Authentication of nigella sativa seed oil in binary and ternary mixtures with corn oil and soybean oil using FTIR spectroscopy coupled with partial least square. *Sci World J*. 2013;2013(October).
 101. Bagheri M, Validi M, Sharifi E. Chitosan nanofiber biocomposites for potential wound healing applications : Antioxidant activity with synergic antibacterial effect. 2021;(May):1–15.
 102. Anbazhagan S, Thangavelu KP. Application of tetracycline hydrochloride loaded-fungal chitosan and Aloe vera extract based composite sponges for wound dressing. *J Adv Res* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.005>
 103. Tep L, Salvador-figueroa M, Ovando-medina I, Alfredo V. Films of Chitosan and Aloe vera for Maintaining the Viability and Antifungal Activity of. 2020;
 104. Rafeian S, Mahdavi H. Improved mechanical , physical and biological properties of chitosan films using Aloe vera and electrospun PVA nanofibers for wound dressing applications. 2019;
 105. Ketabchi N, Dinarvand R, Adabi M, Gholami M. Study of Third-Degree Burn Wounds Debridement and Treatment by Actinidin Enzyme Immobilized on Electrospun Chitosan / PEO Nanofibers in Rats. 2021;(January).
 106. Yuan TT, Marie A, Foushee D, Johnson MC, Jockheck-clark AR, Stahl JM. Development of Electrospun Chitosan- Polyethylene Oxide / Fibrinogen Biocomposite for Potential Wound Healing Applications. 2018;