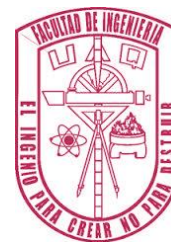




Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Licenciatura en Ingeniería en Nanotecnología



SÍNTESIS DE UNA MEMBRANA NANOESTRUCTURADA DE ALGINATO DE CALCIO Y POLIVINILO ALCOHOL MEDIANTE ELECTROHILADO CON POSIBLE APLICACIÓN EN HEMOSTASIA.

Opción de titulación

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Tonantzi Pérez Moreno

Dirigido por:

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña como director y Dra. Irela Santos Saucedo como Co-directora

SINODALES

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Presidente

Firma

Dra. Irela Santos Saucedo

Secretario

Firma

Dr. Carlos Guzmán Martínez

Vocal

Firma

Dra. María José Rivas Arreola

Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

Resumen

Las heridas externas provocadas por accidentes de tránsito son una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En estos traumas los primeros auxilios son de crucial importancia, ya que implica disminuir la hemorragia externa y posibles infecciones para así permitirle al paciente llegar a un hospital y ser atendido.

La ingeniería de tejidos ha demostrado ser una buena alternativa en el tratamiento de estas lesiones, debido a su alta eficiencia, simple aplicación y bajos costos. Aunado a estas ventajas la implementación de la nanotecnología ha traído mejores resultados, ya que permite un crecimiento más ordenado de los tejidos, así como, de un buen fluido de nutrientes, desechos células y biodegradación.

En este trabajo, se plantea el desarrollo de una membrana de nanofibras de alginato de calcio y alcohol polivinilo (PVA, por sus siglas en inglés) por medio de la técnica de electrohilado, para que intervenga en la cascada de señalización de la hemostasia, así como una barrera física que detenga la hemorragia en el tejido herido. La caracterización del material involucró microscopia electrónica de barrido para determinar el tamaño de las fibras, las cuales se encuentran dentro de la escala nanométrica; también se llevó a cabo análisis de espectroscopia de infrarrojo donde se identificó la interacción electrostática de los polímeros, así como, el efecto que tiene el entrecruzante en el composito; por último, la evaluación citotóxica dio como resultado que las fibras obtenidas permiten la adherencia y crecimiento celular, es decir, presenta una buena viabilidad celular en comparación con películas de los mismo polímeros.

Abstract

External injuries caused by traffic accidents are one of the leading causes of death worldwide. In these traumas, first aid is of main importance, because it involves decreased external bleeding and possible infections to allow the patient to reach a hospital and be treated.

Tissue engineering has proven to be a good alternative in the treatment of these injuries, due to its high efficiency, simple application and low costs. In addition to these advantages, the implementation of nanotechnology has brought better results, because it allows for a more orderly growth of tissues, as well as good nutrient fluid, cell waste and biodegradation.

In this work, the development of a nanofiber membrane of calcium alginate and polyvinyl alcohol (PVA) by the electrospinning technique is proposed, in order to intervene in the hemostasis process, as well as a physical barrier that stops bleeding in the injured tissue. The characterization of the material involved scanning electron microscopy (SEM) to determine the size of the fibers, which are within the nanometric scale; infrared spectroscopy analysis was carried on to identify the interaction of the polymers, that it results in a electrostatic interaction, by other hand, the effect of the crosslinker on the composition was evaluated. Finally, the cytotoxic evaluation resulted in the fibers allowing cell adhesion and growth, it means, they have a good cell viability compared to films of the same polymers.

Agradecimientos

A mis padres:

Don Richar, Doña Pili, gracias por todo el esfuerzo y apoyo que siempre me han dado para cumplir todos mis sueños, por toda la confianza para salir de la casa y todo lo que conlleva. Se que siempre han querido lo mejor para nosotros, y les puede asegurar que nos han dado una grandiosa vida.

A mis hermanos:

Siempre he dicho que si soy como soy en por ustedes, Richi, Lolito y Miguel gracias por formar mi carácter, por siempre alentarme a ser alguien chingana. Ustedes son mi mayor soporte, ¡los amos!

Mis mejores amigos:

Azu, Pepe, Rosendito y Lupita mil gracias por siempre estar ahí cuando los necesito, ya sea en las buenas o las malas. Son una parte fundamental en mi equilibrio emocional. ¡Los amo!

Mis amigos y compañeros:

Hay personas que siempre estuvieron para escucharme sufrir por este proyecto, así como para asesorarme para solucionar los problemas que se me presentaban, o ayudarme a comprender que no siempre son positivos por resultados, que no todo sale como esperas.

A mi asesor:

Dr. Lalo 😊 gracias por la paciencia, por apoyarme en todas mis locas ideas, por ser un buen amigo y gran asesor, por apasionarse y preocuparse junto conmigo en este trabajo.

Dra. Irela y Dra. Majo:

Muchas gracias por la paciencia, por permitirme llegar a sus laboratorios, sin conocerme me dieron mucha confianza y apoyo durante todo este proyecto.

"Si sabes que estas en el camino correcto, si tienes ese conocimiento interno, entonces nadie puede detenerte... no importa lo que digan."

Barbara McClintock

"Nada en la vida debe ser temido, solo debe ser entendido, ahora es el momento de entender más, para que podamos temer menos"

Marie Curie.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

1	Introducción	11
2	Antecedentes	12
2.1	Hemostasia.....	12
2.1.1	Hemostasia primaria.....	13
2.1.2	Hemostasia secundaria.....	15
2.2	Trastornos de la hemostasia.....	19
2.2.1	Manifestaciones clínicas de las alteraciones de la hemostasia.....	19
2.2.2	Defunciones por alteraciones de la hemostasia	21
2.3	Métodos de curación y tratamiento de hemorragias.....	22
2.3.1	Ingeniería de tejidos.....	25
2.4	Síntesis de biomateriales fibrosos	31
2.4.1	Tecnología de fabricación textil	31
2.4.2	Técnica de Electrohilado (electrospining).....	32
2.5	Materiales para promover la hemostasia.....	23
3	Hipótesis y objetivos	38
3.1	Hipótesis	38
3.2	Objetivos general.....	38
3.2.1	Objetivos específicos	38
4	Metodología.....	39
4.1	Síntesis de membrana de nanofibras de CaAlg-PVA.....	40
4.1.1	Síntesis de nanofibras de NaAlg-PVA.....	40
4.1.2	Entrecruzamiento de películas de NaAlg-PVA	41
4.1.3	Electrohilado de NaAlg y PVA por el sistema coaxial.....	42
4.1.4	Síntesis de nanofibras entrecruzadas de CaAlg-PVA.....	42
4.2	Métodos de caracterización	43
4.2.1	Microscopio electrónico de Barrido (SEM)	43
4.2.2	Espectroscopia Infrarrojo	43
4.3	Prueba de evaluación citotóxica.....	44
4.3.1	Cultivo celular.....	44
4.3.2	Lavado de membranas	44
4.3.3	Montaje de las membranas en las placas de cultivo.....	44
4.3.4	Prueba MTT.....	45

4.3.5	Conteo de células por hemocitómetro (Cámara de Neubauer).....	46
5	Resultados y discusión.....	47
5.1	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	47
5.1.1	Membranas de fibras de NaAlg-PVA.....	48
5.1.2	Membrana de fibras del sistema coaxial NaAlg y PVA.....	51
5.1.3	Membrana de fibras entrecruzada de CaAlg-PVA.....	52
5.2	Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	56
5.3	Evaluación citotóxica MTT.....	61
6	Conclusiones.....	64
7	Perspectivas.....	66
8	Anexo I.....	67
9	Referencias.....	68

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de Tablas

Tabla 1. Factores de coagulación (extraído de [11]).....	16
Tabla 2. Listado de parametros del equipo de electrohilado.....	41
Tabla 3. Parámetros de nanofibras por el método coaxial.....	48

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de la respuesta plaquetaria a la lesión vascular (extraído de [9]).....	13
Figura 2. Modelo de cascada de coagulación (modificado de [12])	18
Figura 3. Molécula de Alginato de Calcio.....	25
Figura 4. Modelo de "caja de huevo" que describe la estructura del alginato (extraído de [30]).	27
Figura 5. Estructura molecular del Polivinil Alcohol (PVA).	28
Figura 6. Esquema del funcionamiento del electrohilado (modificado de [34]). ..	32
Figura 7. Ejemplos del montaje del equipo de electrohilado (extraído de [33])....	33
Figura 8. Esquema de electrohilado con un sistema de entrecruzado (modificado de [39]).....	36
Figura 9. Diagrama de la distribución de los pozos para la prueba MTT, una placa para cada tiempo medido (Modificado de [44]).....	45
Figura 10. Micrografías SEM de la mezcla de NaAlg:PVA con un razón de a) 30:70, b) 50:50 c) 70:30.....	47
Figura 11. Morfología de membrana obtenida a 19 Kv, 0.1 ml/h y con a)10 cm, b) 15 cm, c)18 cm y d) 20 cm.....	49
Figura 12. Histograma de nanofibras por el método coaxial.....	51
Figura 13. Ilustración del sistema de electrohilado con baño de coagulación montado en el laboratorio.....	53
Figura 14. Morfología obtenida a 0.1 ml/h y 15 cm a) 19 KV con magnificación de 25 000X, b) 21 KV con magnificación de 20 000X y c)21 KV con magnificación de 5 000X.	54
Figura 15. Morfología obtenida del sistema coaxial a 15 cm y 0.1 ml/h y 21 KV. 55	
Figura 16. Espectro de infrarrojo de fibras de Alg:PVA.....	56
Figura 17. Espectro de infrarrojo de fibras por método coaxial.....	57
Figura 18. Espectro de infrarrojo de fibras entrecruzadas.....	58
Figura 19. Espectro de Infrarrojo de nanofibras.	59
Figura 20. Gráfico de viabilidad celular de la membrana de fibras.	61
Figura 21. Microscopia de adherencia celular a las 48 horas.....	62
Figura 22. Micrografías SEM de películas entrecruzadas a) 50:50 (Alg:PVA) y b) 70:30 (Alg:PVA).	67
Figura 23. Microscopia SEM de Fibras por el método coaxial, con 21 KV, 0.1 ml/h y a)15 cm y b)18 cm.....	67



Dirección General de Bibliotecas UAQ

1 INTRODUCCIÓN

Dentro de la ingeniería de tejidos, se ha buscado la aplicación de biomateriales que puedan ser aplicados de manera tópica en heridas que involucran daño en los tejidos de un organismo [1]. Las lesiones en los tejidos provocan la activación de la cascada de señalización hemostásica, el cual es un proceso que involucra interacciones físicas y químicas para promover la agregación plaquetaria y la formación de un coágulo estable [2]. Los diferentes biomateriales se utilizan como soporte o recubrimiento de diferentes materiales [3]; estos son sintetizados en diferentes estructuras (por diferentes técnicas, como el electrohilado para obtener fibras [4].) dependiendo de la aplicación deseada [5]. La implementación de materiales nanoestructurados ha demostrado ser una buena respuesta ya que las estructuras pueden adaptarse a la aplicación que se desea, pueden ser nanopartículas, esponjas nanoporosas, nanofibras o nanoencapsulados [6].

Por lo anterior en este proyecto se plantea la síntesis de una membrana de nanofibras de alginato de calcio con polivinilo alcohol mediante la técnica de electrohilado, para aplicar el biomaterial a procesos de regeneración de tejidos en heridas hemorrágicas externas. El proceso de síntesis de las nanofibras consistió en encontrar los parámetros correctos para obtener una membrana homogénea de fibras con tamaño nanométrico; lo cual mediante microscopía de barrido se pudo comprobar, obteniéndose un diámetro de alrededor de 80 nm.

Por otro lado, las fibras entrecruzadas se obtuvieron agregando un sistema de baño de coagulación al equipo de electrohilado, con los diagramas de espectroscopia de infrarrojo se observó la interacción electrostática entre ambos polímeros y el efecto de los iones de calcio para entrecruzar las cadenas poliméricas. Por último, la evaluación citotóxica del material demostró adherencia celular a las fibras, así como una viabilidad de más del 50% a las 24 horas.

El proyecto se concluye comprobando la hipótesis y objetivo al obtener una membrana polimérica de nanofibras capaz de resistir en un medio acuoso y promover la adherencia y proliferación celular.

2 ANTECEDENTES

2.1 HEMOSTASIA

La hemostasia es un mecanismo de defensa que protege al organismo de las pérdidas sanguíneas que se producen tras una lesión vascular. Se ha dividido en hemostasia primaria, en la que se lleva a cabo los procesos de adhesión, reclutamiento, activación y agregación para formar el tapón hemostático plaquetario inicial, y la hemostasia secundaria, la cual corresponde a la fase de coagulación sanguínea [7].

La hemostasia es un proceso complejo en el que intervienen factores del propio vaso (pared celular, endotelio y subendotelio) además de factores plasmáticos y las plaquetas. Estas mismas estructuras se ven implicadas en el mantenimiento de la fluidez de la sangre, la integridad y permeabilidad del árbol vascular, es lo que podríamos llamar hemostasia preventiva y hemostasia correctiva.

Las células juegan un papel importante dentro de proceso de coagulación, debido a que el Factor Tisular (FT) está presente en la membrana de diversas células, como fibroblastos [7], es por eso que las plaquetas son muy importantes en el proceso.

El Sistema de coagulación es normalmente inactivo, pero se activa en pocos segundos después de la lesión. El estímulo que desencadenará el proceso de la hemostasia es la lesión a nivel del endotelio, provocando el contacto de la sangre con el tejido conectivo subendotelial [8].

2.1.1 Hemostasia primaria

La respuesta inicial del organismo a una lesión vascular, por acción del propio vaso y de la plaqueta, se comienza la hemostasia primaria, que finaliza con la activación del factor X y la activación del sistema de coagulación.

La hemostasia primaria es el proceso de formación del tapón plaquetario iniciado antes una lesión vascular, llevándose a cabo una interacción entre el endotelio y la plaqueta. Para llevarse a cabo ocurre una serie de mecanismo: la adhesión y la agregación plaquetaria.

2.1.1.1 Adhesión plaquetaria

El proceso de adhesión comprende el transporte por difusión de las plaquetas hacia la superficie reactiva y la interacción de los receptores de la membrana plaquetaria con sus ligandos en las estructuras de la pared lesionada.

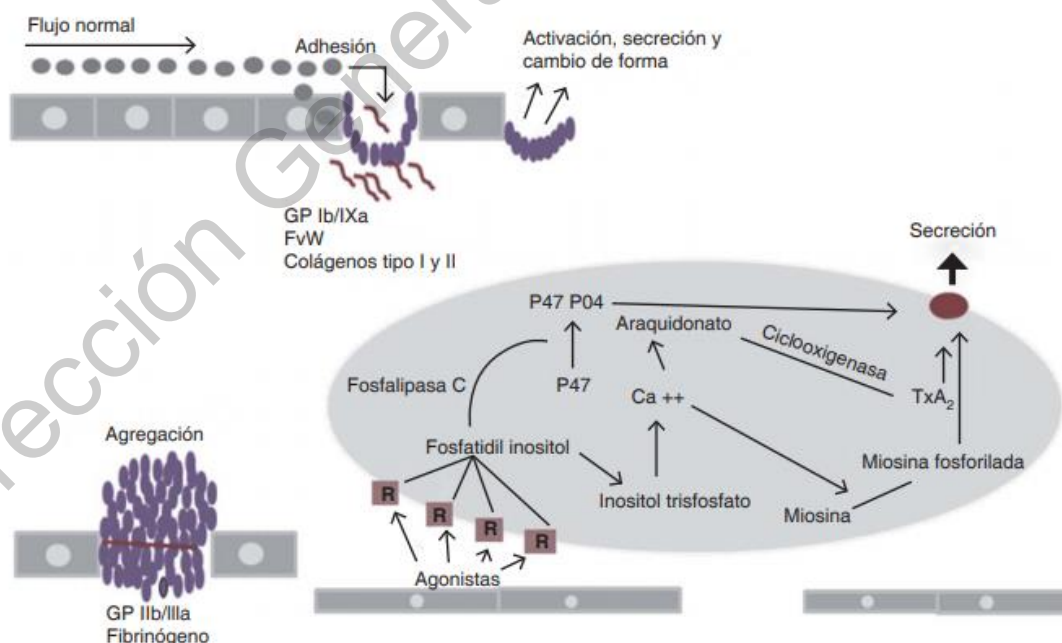


Figura 1. Mecanismo de la respuesta plaquetaria a la lesión vascular (extraído de [9]).

La pared de los vasos sanguíneos está constituida por varias capas que, de dentro hacia fuera, son: capa endotelial (en contacto directo con la sangre), capa subendotelial (rica en colágeno y proteínas adhesivas), capa media o muscular y adventicia (capa de tejido conectivo) [10].

A pocos segundos de la lesión, las plaquetas se adhieren a las fibrillas de colágeno del subendotelio vascular (Figura 1) a través de un receptor de la colágena específico para las plaquetas y presente en su estructura terciaria. Esta interacción está estabilizada por el factor de Von Willebrand, que es una glicoproteína adhesiva (GPIb/IX) que permite a las plaquetas permanecer unidas a la pared del vaso a pesar de las elevadas fuerzas tangenciales que se generan en el interior de la luz vascular.

Una vez adheridas al subendotelio, las plaquetas se extienden sobre la superficie y plaquetas adicionales aportadas por el flujo sanguíneo se unen, formando las masas de agregados plaquetarios.

2.1.1.2 Agregación plaquetaria

La unión de las plaquetas entre sí y de las ya fijadas al subendotelio determina la formación de agregados plaquetarios. La agregación plaquetaria se debe esencialmente al adenosindifosfato (ADP) y como se observa en la esquina inferior izquierda de la Figura 1 de otras sustancias liberadas de los gránulos (Glicoproteína IIb/IIIa) de las propias plaquetas. Al mismo tiempo las plaquetas generan una sustancia de alto poder vasoconstrictor, el tromboxano A₂, el cual, a su vez, favorece la agregación plaquetaria. Todo este proceso conduce a la formación del trombo plaquetario. Para estabilizar el trombo plaquetario se procede a la formación de trombina.

2.1.2 Hemostasia secundaria

La etapa de hemostasia secundaria es también conocida como coagulación, que es la interacción de las proteínas plasmáticas o factores de coagulación entre sí, que se activan en una serie de reacciones en cascada conduciendo a la formación de fibrina.

Intervienen en el proceso una serie de proteínas procoagulantes (los doce factores de coagulación responsables de la formación de fibrina) y proteínas anticoagulantes (regulan y controlan la coagulación evitando que los factores activados en un punto concreto se dispersen y produzcan una coagulación generalizada (Tabla 1) [10].

De acuerdo con el modelo celular se divide en tres fases: iniciación, amplificación y propagación.

2.1.2.1 Iniciación

El FT es sintetizado por diferentes tipos celulares y expresado en la membrana celular. El Factor VII en el plasma se une estrechamente al FT activado rápidamente a proteasas procoagulantes y anticoagulantes. El complejo FT/VIIa puede activar al factor X y IX, donde el factor X activa al factor V y a otras proteasas no coagulantes. Cabe mencionar que el complejo FT/VIIa puede autoactivarse así mismo, mientras que el factor VIIa libre no puede ser inactivado, pero tienen una vida media de dos horas [10].

Por otro lado, el factor Xa que se encuentra en la superficie celular puede combinarse con el factor Va para producir pequeñas cantidades de trombina, lo cual es importante para la activación plaquetaria.

Tabla 1. Factores de coagulación (extraído de [11]).

Factores de coagulación.			
Grupos	Factores de coagulación	Nombre	Lugar de Síntesis
Factores Vitamina K dependientes	II	Protrombina	Hígado (hepático).
	X	Factor Stuart	
	IX	Factor Christmas	
	Proteína C		
	Proteína S	Cofactor de Proteína C	
	VII	Proconcertina	Hígado (hemostasia, tranfusiones, hepaHemorragia).
Cofactores	V	Proacelerina	Hígado, plaqueta, células endoteliales.
	III	Tromboplastina (Factor Tisular)	
	VIII/VIII:C	Factor antihemofílico/ Factor Von Willebrand	Células endotelialaes.
Activadores del sistema de contacto	XI		Hígado.
	XII	Factor Hageman	
	Precalicroína Kininógeno	Factor Fletcher	
Fibrino-formación	I	Fibinógeno	Hígado (hepático).
	XIII	Estabilizador de la Fibrina	Hígado y plaqueta.
	IV	Calcio	

2.1.2.2 Amplificación

La trombina es un potente activador plaquetario a través de la vía de los receptores activados por proteasas. El periodo protrombótico ascendente es referido como la fase de amplificación y resulta en la activación de las plaquetas con exposición de los fosfolípidos de membrana y la creación de una membrana procoagulante con liberación del contenido de sus gránulos.

Por otro lado, la trombina escinde al factor de von Willebrand, factor VIII, para activarlo posteriormente.

2.1.2.3 Propagación

En esta etapa el factor IXa junto con el VIIIa se unen a la membrana de las plaquetas, formando el complejo de tenasa. Este último complejo activa el factor X, resultando en una formación de Xa con los factores IXa, VIIIa, X y IV, solamente se puede llevar a cabo en presencia de iones de Ca^{2+} . El factor Xa inicia el ensamble del complejo de protrombinas (factor IIa), el cual es constituido por el factor Va, Xa y IV, este complejo tiene la función de convertir la protrombina a trombina, la cual contribuye a formación de fibrina y la formación del coagulo [9].

La trombina convierte el fibrinógeno, una proteína soluble, en fibrina que polimeriza formando una malla, trombo; la trombina hidroliza la molécula de fibrinógeno en dos de sus cadenas, liberándose los monómeros de fibrina al lisar los fibrinopéptidos A y B.

El factor XIII es activado por la trombina y produce la formación de uniones covalentes del coágulo de fibrina, que incrementa su resistencia química, mecánica y a la fibrinólisis. El resultado final de la coagulación es una malla de fibrina hemostática y relativamente estable.

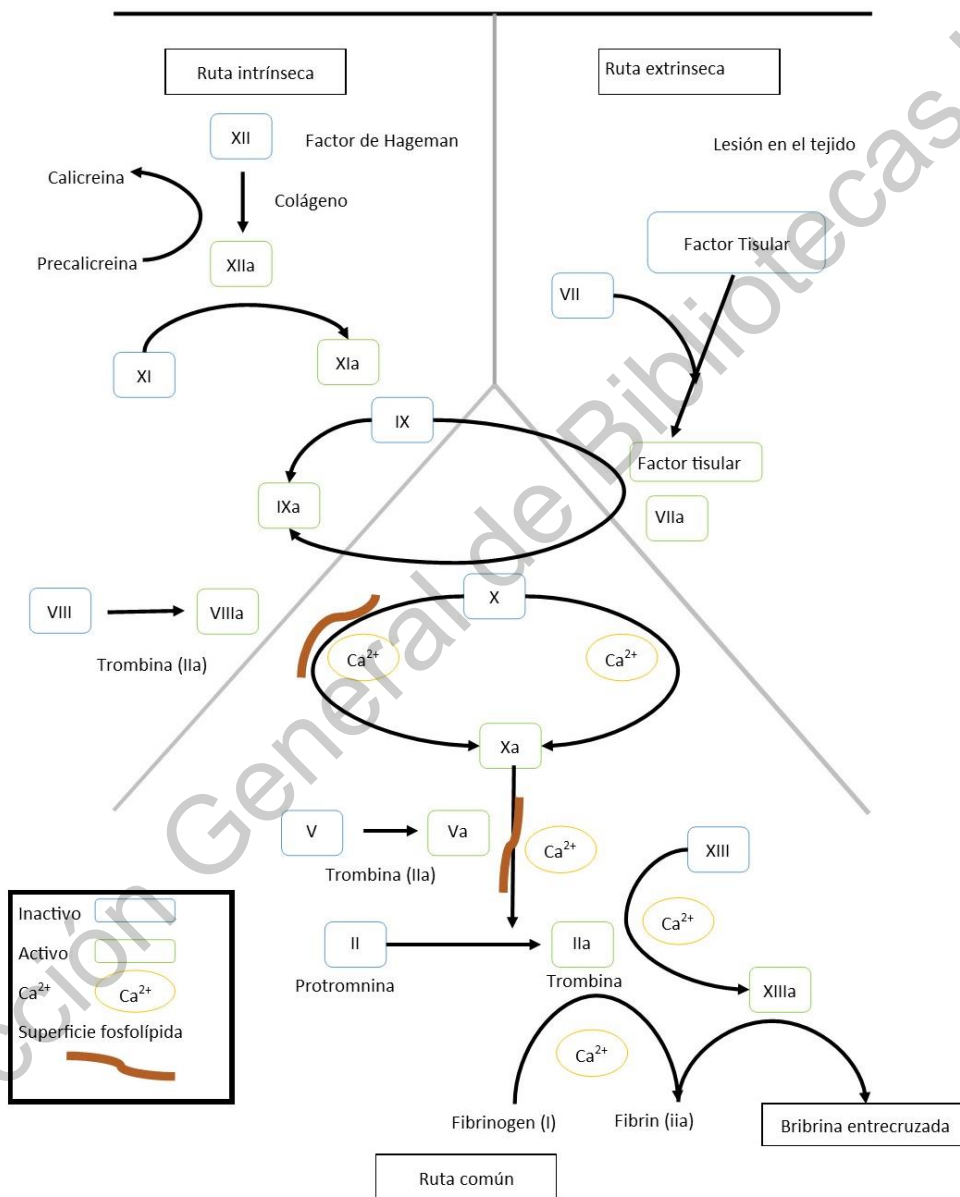


Figura 2. Modelo de cascada de coagulación (modificado de [12])

2.2 TRASTORNOS DE LA HEMOSTASIA

2.2.1 Manifestaciones clínicas de las alteraciones de la hemostasia

Los términos más comunes que se usan frecuentemente para describir las manifestaciones de sangrado son las siguientes:

- Petequias: son lesiones hemorrágicas cutáneas puntiformes producidas por la dilatación de vasos de pequeño calibre, de modo que se separan las células endoteliales con la consecuentes extravasación de sangre.
- Purpura: lesiones hemorrágicas producida por la confluencia de petequias.
- Equimosis: área mayor de sangre extravasas, que se localiza a nivel cutáneo. Normalmente, es el resultado de un traumatismo.
- Hematomas: corresponden a extravasación mayor que infiltra el tejido subcutáneo y los músculos.
- Hemartrosis: es el sangramiento intraarticular, espontáneo o ante un traumatismo. Se presenta en defectos graves de factores de coagulación, como hemofilias.
- Hemorragias de las mucosas: como hematurias, hemorragias digestivas, epistaxis.
-

La hemorragia es la extravasación de sangre desde los vasos en el espacio extravascular. La ruptura de las grandes arterias o venas produce una hemorragia grave, y casi siempre se debe a una lesión vascular, incluyendo traumatismo, aterosclerosis, o erosiones inflamatorias o neoplásicas en la pared del vaso.

La hemorragia puede ser externa o estar limitada a un tejido; también conocido como hematoma. Estas heridas pueden ser relativamente insignificantes o pueden producir un sangrado tan grande que provoque la muerte. Mientras las hemorragias mínimas se denominan petequias, descritas anteriormente; estas se asocian a una presión vascular localmente aumentada, recuento bajo de plaquetas o deficiencias en los factores de coagulación. En casos extremo, los pacientes con hemorragia extensa a veces desarrollan ictericia por la rotura masiva de los hematíes y el aumento sistémico de la bilirrubina [13]. Los sangrados crónicos o recurrentes extremo pueden producir una pérdida neta de hierro, que frecuentemente acaba con una anemia ferropénica.

Hemorragias durante una operación y post-operación son complicaciones comunes en cirugía. Desangrase excesivamente durante una operación podría deberse a un desorden existente que no fue detectado con anterioridad, o a anomalías en la coagulación causando una pérdida masiva de sangre, sin embargo, puede también relacionarse con la naturaleza de la operación. Llevándonos a realizar transfusiones de sangre como resultado de una operación.

Ante una hemorragia, el primer paso para llegar a un buen diagnóstico es la exploración física. Una hemorragia de piel y mucosas, con petequias y equimosis, simétrica y difusa, hemorragia digestiva, o bien un sangrado inmediato a un traumatismo o a la cirugía, indicará una alteración de la hemostasia primaria. Por otra parte, hematomas subcutáneos o musculares, son grandes equimosis, hemorragias retroperitoneales o viscerales o bien un sangrado de horas o días posteriores al traumatismo o a la cirugía, involucra una alteración de la hemostasia secundaria [14].

Por estos trastornos hemostáticos son causantes de muchas defunciones a nivel mundial, aún más cuando no son tratados correctamente.

2.2.2 Defunciones por alteraciones de la hemostasia

Las alteraciones de la hemostasia asociadas a hemorragias no controladas ocupan un variado grupo de presentaciones, siendo una causa importante de complicaciones y mortalidad en trauma, en cirugía mayor u en el uso de medicamentos anticoagulantes. Aproximadamente el 1.5% de la población mundial es tratada con antagonistas de la vitamina K, siendo el sangrado la principal complicación asociada al tratamiento tanto en el contexto de trauma o cirugía como el sangrado espontáneo [15].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los accidentes de tránsito cobraron 1.4 millones de vidas, siendo esta la décima causa de defunción en el mundo en 2016, aumentando 0.1 millones en un año. Las lesiones en los pacientes accidentados pueden ser desde un simple golpe hasta heridas, laceraciones u objetos empalmados que ponen en riesgo la vida.

Los traumatismos causaron 4.9 millones de muertes en 2016, más de una cuarta parte como consecuencia de accidentes de tránsito. La mortalidad por estos accidentes, que a nivel mundial es de 18.8 defunciones por cada 100 000 habitantes, es más acusada en los países de ingresos bajos, donde alcanza las 29.4 defunciones por cada 100 000 habitantes [16]. En México, de acuerdo con el INEGI, alrededor de 36 215 muertes por accidentes ocurrió en el país en el 2018 [17].

La OMS ha definido a un trauma como aquellos eventos o acontecimientos fortuitos, por lo general dañinos, independientemente de la voluntad humana, provocados por una fuerza exterior que actúa con rapidez y que se manifiesta mediante un daño corporal o mental.

Alrededor de un 40% de las muertes por traumatismo de deben a sangrados masivos que ocurren durante las primeras horas tras el accidente, es debido a esto que el tratamiento inicial adecuado de las heridas penetrantes o contundentes le concede al paciente una mayor posibilidad de sobrevivencia.

2.3 TRATAMIENTO DE HEMORRAGIAS

Algunos de los métodos implementados actualmente por rescatistas, paramédicos, técnicos en urgencias médicas (TUM), técnico en urgencias médicas avanzadas (TUMA) implica principalmente en la estabilización adecuada del paciente para que mediante su traslado a una unidad hospitalaria éste pueda incrementar la posibilidad de supervivencia.

Se denomina la hora dorada al momento entre la presentación del accidente y la instalación de los cuidados definitivos, mientras que a la atención prehospitalaria en el sitio del accidente en los primeros 10 minutos se considera la hora platino.

En la atención prehospitalaria primero se realiza una evaluación de la escena del evento, donde se obtienen datos importantes acerca de las posibles lesiones que puede tener el paciente; posteriormente se realiza un reconocimiento primario, que implica el ABC del trauma que consiste en una serie de pasos. El paso A, es el aseguramiento de la vía aérea que implica el control de la columna cervical con apertura aérea; en el paso B, se evalúa el estado ventilatorio; en el paso C, se comienza con una vigilancia del estado circulatorio, que implica la detección del pulso, en este punto se realiza también la identificación temprana y control de hemorragias para evitar deterioro en el sistema; finalmente en el paso D se realiza una revisión neurológica, así como una última revisión por si en un principio alguna lesión quedo desapercibida [18].

Las lesiones que nos acontecen en este proyecto son la localizadas en tejidos blandos y hemorragias; las heridas cerradas donde no se produce una irrupción de la piel pueden presentar contusiones que se producen cuando el objeto comprime el tejido por debajo de la piel.

Por otro lado, la base para el tratamiento de las heridas abiertas suele basarse en el principio del control de la hemorragia, prevenir su contaminación e inmovilizar la parte afecta. Esto puede lograrse con técnicas de vendaje y colocación de férulas temporales del segmento lesionado, lo que alivia el dolor y facilita el transporte.

Algunos de los tratamientos más comunes que se realizan al paciente cuando se encuentra hospitalizado es la aplicación del ácido tranexámico (ATX), que es un análogo de la lisina que inhibe directamente la activación del plasminógeno y la actividad de la plasmina. Esta acción evita la ruptura del coágulo en lugar de promover la formación de nuevos coágulos. Es un antifibrinolítico potente que con seguridad se ha utilizado desde la década de 1960 y aproximadamente muestra una reducción de hasta el 30% de la necesidad de transfusión [19]. Se recomienda el uso de ácido tranexámico para el manejo temprano (menos de 3 horas) del sangrado en trauma a una dosis de carga de 1 g en infusión durante 10 min, seguida de una infusión continua intravenosa de 1 g durante 8 h.

Otros tratamientos que se realizan pueden depender de la condición del paciente, en el caso de pacientes con choque hemorrágico se sugiere la administración de plasma fresco congelado; para el manejo del sangrado potencialmente fatal en trauma de con uso de Warfarina se recomienda el uso de concentrado de complejo protrombínico [15].

2.3.1 Materiales para promover la hemostasia

A través de los años se han empleado diferentes materiales para promover la hemostasia o controlarla, actualmente existen estudios más recientes de diferentes materiales como: nanopartículas de sílice orgánicamente modificadas con y sin polietilenglicol que presentaron una importante actividad procoagulante [20] estudios de nanopartículas de poliestireno demostraron tener tanto una actividad coagulante como una actividad anticoagulante, esto debido al tamaño de las nanopartículas y al recubrimiento utilizado (modificadas con radicales amino o carboxilo) [21].

Las nanopartículas de carbono, como partículas catiónicas, también presentaron una buena actividad dependiente del tamaño y la superficie de las NP's, demostrando que nanotubos de carbono de capa múltiple inducen a activación y agregación plaquetaria [22] (acompañado por una elevación en los niveles extracelulares de Ca^{2+}). Otras investigaciones utilizan sustitutos sanguíneos artificiales como las plaquetas sintéticas, que contribuyen en la agregación plaquetaria; algunas de estas plaquetas están compuestas de nanoesferas del copolímero PGLA-poly-L-lysine y modificadas con algunos péptidos para lograr una mejor interacción algunos receptores plaquetarios [23].

Otros estudios los cuales, debido a la naturaleza del alginato y sus propiedades antes mencionadas, han sido reportados varios artículos sobre el uso de alginato en modelo animal. En 2013 Taskin [24] utilizaron 32 ratas que dividieron en 4 grupos: el grupo I se trataba del grupo control en el que no se realizó laparotomía, el grupo II se realizó laparotomía y, seguidamente se cerró, el grupo III se realizó laparotomía con posterior lesión esplénica tratada con gasa empapada en suero fisiológico y compresión durante 3 minutos y el grupo IV se realizó exactamente como en el grupo III pero se aplicó a la gasa alginato cálcico. Al comparar el valor del hematocrito tras la cirugía, el grupo IV mostraba un mayor porcentaje y un menor sangrado peroperatorio, el cual medían con una bolsa de Poliéster en la que se acumulaba el sangrado.

Mientras que, en 2015, Aydin y sus colaboradores [25] utilizaron 39 ratas a las cuales se les realizó laparotomía con laceración hepática, tratándose en un grupo con una gasa impregnada en suero fisiológico, un segundo grupo con el hemostático Ankaferd y un tercer grupo con una gasa impregnada en alginato cálcico. Se midió la cantidad de sangrado peroperatorio y postoperatorio, al igual que los niveles de hematocrito antes, durante y después de la cirugía; obteniendo como resultado un menor sangrado en los grupos dos y tres con respecto al control. Además, en el grupo del alginato presentaban áreas de fibrosis en la línea de incisión hepática, lo cual no se apreciaba en el grupo control. En el grupo Ankaferd se apreciaban áreas de necrosis focal.

El polivinilo alcohol ha sido utilizado por si solo como una esponja, debido a que es una sustancia relativamente inerte y puede ser implantada subcutáneamente y puede ser expresado durante todas las fases del proceso [26]. Por otro lado, en 2010 Karaca y sus colaboradores [27] realizaron un material nanofibroso de alginato de sodio y polivinilo alcohol como tratamiento de heridas, la relación utilizada fue de 1:2, respectivamente, una vez obtenidas sus fibras fueron entrecruzadas con glutaraldehído, ácido hidroclicórico y etanol, finalmente las fibras fueron implementadas a heridas de ratas mostrando una mejora notable en la herida.

2.3.2 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos ha demostrado ser un campo prometedor dentro de los tratamientos de daño o pérdida de tejido o alguna parte del organismo. Esta ciencia parte de la capacidad del cuerpo animal para curarse a sí mismo; esta capacidad depende de auto reparación y regeneración depende del tejido u órgano y están limitadas por el grado del daño, pérdida de la función y del número de tejidos involucrados [28].

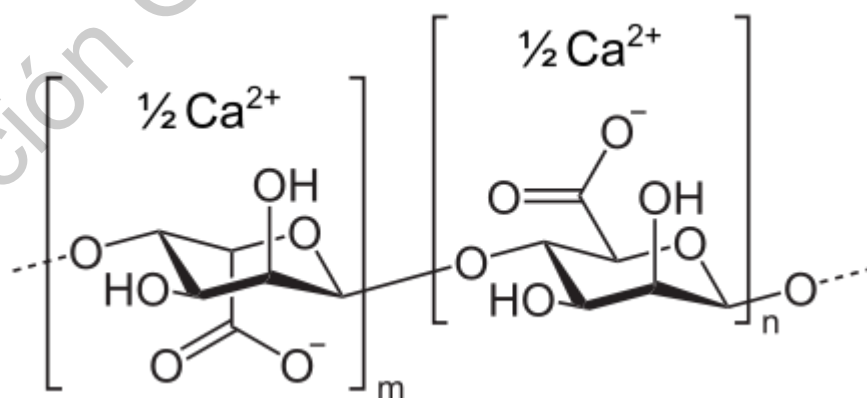


Figura 3. Molécula de Alginato de Calcio.

Dentro de los puntos importante que se deben comprender en la ingeniería de tejidos es la relación entre la estructura, la función de las células, tejidos y órganos, así como combinar conocimientos de biología, materiales, ingeniería y cirugía [29]. El punto básico en el cual se basa la ingeniería de tejidos es la implementación de células vivas, cultivadas dentro de un laboratorio, en la superficie de un andamio que permitan una fácil manipulación e implantación.

2.3.2.1 Biomateriales poliméricos

Los tres materiales claves en la ingeniería de tejidos son las células, los andamios y los factores de crecimiento. Los andamios son los encargados de dar soporte al sistema, así como, facilitar el anclaje, la migración y diferenciación celular; dependerá de la estructura que tenga para permitir la difusión de nutrientes celulares y productos expresados. Es muy importante que el andamio imite la estructura y propiedades del tejido, debido a que ejerce influencia mecánica y biológica para modificar el comportamiento de la fase celular.

2.3.2.1.1 Alginato de calcio

Los alginatos son sales del ácido algínico, un compuesto químico presente en la pared celular de las algas marinas pardas; son los polisacáridos más abundantes presentes en las algas,

ya que comprenden hasta el 40% de su peso seco; tienen la función principal de dar rigidez, elasticidad, flexibilidad y capacidad de enlazar agua. En estado natural, los alginatos se encuentran como una mezcla de sales de cationes como son Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^{+} .

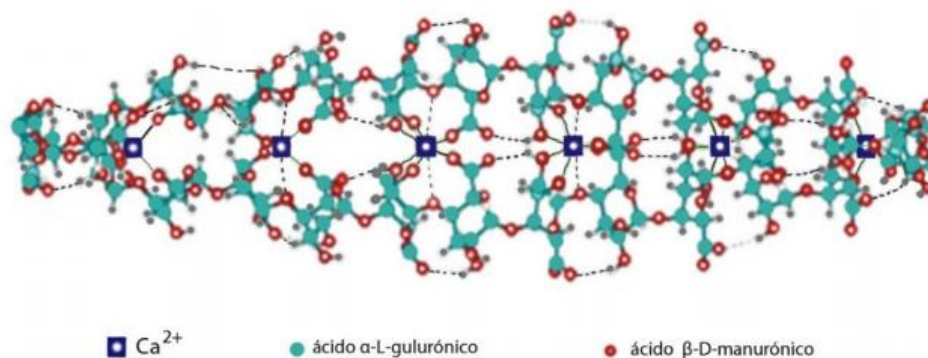


Figura 4. Modelo de "caja de huevo" que describe la estructura del alginato (extraído de [30]).

Los alginatos son un polisacárido aniónico lineal, que consiste en un enlace 1-4 entre β-D-mannurónico (bloque M) y α-L-gulurónico (bloque G) unidos a varias composiciones y secuencias (Figura 3), las cuales dependen de donde se extraiga el compuesto.

Las sales del ácido algínico están formadas por tres bloques M, G y MG. Cuando dos cadenas de bloque G se alinean, se forman sitios de coordinación. Estas cavidades que se forman tienen el tamaño adecuado para acomodar al ion calcio y además están revestidas con grupos carboxilos y otros átomos de oxígeno electronegativos (Figura 4), después de la adición de iones de calcio, el alginato se gelifica [30].

Los alginatos que presentan grandes regiones de bloques G forman un gel de fuerza alta y exhiben una alta porosidad. Mientras los que presentan grandes bloques M forman un gel de fuerza media, pero con una alta resistencia a la sinéresis y exhiben poros más pequeños que los hacen más suaves.

Las propiedades principales del alginato son: espesantes al ser disueltos en agua, su amplia capacidad de tener agua, habilidad de formar gel y la cuarta capacidad de formar películas. Debido a estas propiedades ha sido utilizado como vendaje de heridas, andamios y materiales de impresión dental o quirúrgicos, entre otros. Algunos alginatos como el de sodio, potasio, calcio y propilenglicol, son aditivos alimenticios reconocidos como inocuos y seguros, según la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) [31].

2.3.2.1.2 Polivinilo alcohol

El Polivinilo alcohol (Figura 5), PVA por sus siglas en inglés, es un polímero hidrofílico, no tóxico, biocompatible, el cual contiene buenas propiedades mecánicas y muy estable durante largos períodos en diferentes condiciones de temperatura y pH. A partir de este polímero se pueden obtener hidrogeles por entrecruzamiento físico o químico; las características del hidrogel se determinan por su concentración, temperatura y los ciclos de congelamiento/descongelamiento [32].

Debido a sus características, el PVA es ampliamente utilizado en varias aplicaciones biológicas, como es la regeneración de tejidos, ya sea por sí solo o en su mayoría como compuesto con otros polímeros, como son el óxido de polietileno (PEO), celulosa, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), quitosano, entre otros.

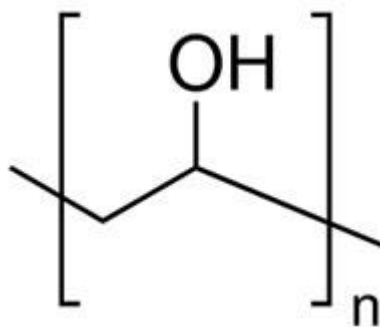


Figura 5. Estructura molecular del Polivinilo Alcohol (PVA).

2.3.2.2 Bionanométriales

Actualmente la nanotecnología está siendo ampliamente incorporada dentro de área de ciencia de materiales, debió a la gran variedad de propiedades que puede incorporar o mejor a los materiales. La aplicación de los nanomateriales va desde el área electrónica hasta la medicina, permitiendo la unión de diferentes ciencias para encontrar soluciones a las diversas problemáticas que atiende a la sociedad.

La aplicación de los nanomateriales dentro de la medicina es considerada como la mejor solución a varias problemáticas dentro de la medicina, como son: eficiencia terapéutica, donde se busca implementar liberación controlada de fármacos mediante vínculos de liberación nanométricos; diagnóstico *in vitro*, donde los sensores basados en nanotecnología permiten una detección más rápida y a concentraciones mucho menores; imagen *in vivo*, se incorporan nanopartículas magnéticas o fluorescentes, para disminuir la invasión y mejorar las imágenes, y así poder localizar con más exactitud los tumores para su futura extracción.

Dentro del área de ingeniería de tejidos la intervención de la nanotecnología se enfoca en la modificación de los andamios utilizados como soporte, al otorgarles una nanoestructura se promueve una interacción más directa con el medio celular, es decir, un mejor soporte y una mejor biomimética.

Con la implementación de la nanotecnología se espera que se reduzcan los tiempos de curación, la invasión bacteriológica causante con infecciones múltiples y la disminución de uso de materiales. Ya se ha demostrado que los nanomateriales tienen una mayor biocompatibilidad, así como una más rápida biodegradabilidad. Por otro lado, también hay mejora en las propiedades mecánicas, ópticas, catalíticas y magnéticas, las cuales dependerán de la aplicación deseada.

2.3.2.3 Estructura del andamio

Los andamios en ingeniería de tejidos pueden ser de diferentes categorías, como son los fibrosos, porosos e hidrogeles [28].

Los materiales porosos han demostrado ser efectivos dentro del campo, ya que proveen un área de superficie grande para la adhesión celular. Esta característica permite una buena infiltración de las células, ya que los poros se encuentran interconectados, aumentando así la proliferación y diferenciación celular.

Por otro lado, los hidrogeles son geles hechos de cadenas poliméricas que se hinchan en soluciones acuosas. Son mecánicamente estables, fácilmente deformables debido a la unión covalente de los polímeros y la estabilización por interacciones físicas o químicas entre las moléculas.

Por último, tenemos a los materiales fibrosos cuya importancia es que su estructura y diámetro de fibra pueden afectar el comportamiento celular y el tamaño de poro de la matriz fibrosa regula la organización celular; esto se debe a que los andamios con esta estructura imitan fácilmente la matriz extracelular nativa, la cual consiste en proteínas fibrosas nanoestructuradas y adhesivas como el colágeno, elastina, fibronectina y laminina.

Las estructuras mencionadas pueden ser sintetizadas a nanoescala y de diferentes biomateriales para poder obtener propiedades diferentes y así ser promotores de diversos tejidos, ya sea óseo, cartílagos, tejidos neuronales y/o vasculares.

2.4 SÍNTESIS DE BIOMATERIALES FIBROSOS

Existen diversas técnicas o métodos de síntesis de los andamios, entre los más utilizados se encuentran: evaporación de solvente, lixiviación de partículas, inversión de fase, auto ensamblado molecular, espumado por gas, separación de fases, emulsificación, liofilización, coprecipitación, entre otras. En este caso de estudio, para la fabricación específica de fibras, las técnicas más comunes son la tecnología de fabricación textil y el electrohilado.

2.4.1 Extrusión

La técnica funciona bajo el principio de fibras continuas producidas por extrusión de un polímero disuelto o una solución de polímero a través de una hiladora y dibujándola mecánicamente en un bobinador, o una serie de bobinadoras, para así ser colectados en un carrete. El diámetro de la fibra se determina por la razón de extrusión y la velocidad de los bobinadores en una tasa constante para alcanzar el diámetro uniforme y las fibras mecánicas. La extrusión afecta la cristalinidad del polímero, además de la fuerza mecánica y comportamiento de degradación [28].

2.4.2 Técnica de Electrohilado (electrospinning)

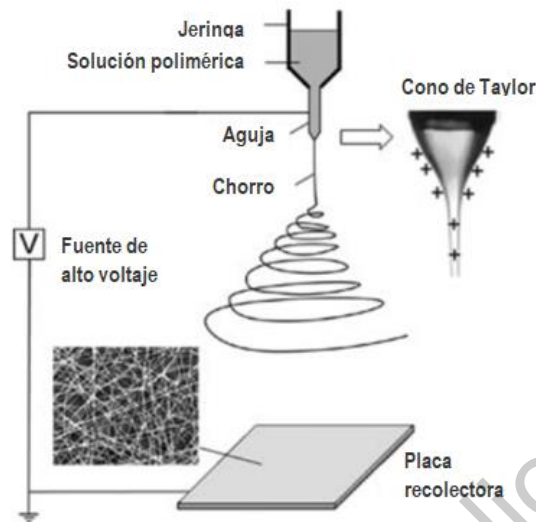


Figura 6. Esquema del funcionamiento del electrohilado (modificado de [33]).

El proceso para obtención fibras mediante la técnica de electrohilado se lleva a cabo por medio del estiramiento coaxial de una solución viscoelástica, estas fibras poseen diámetros que van de algunas micras a los nanómetros, con las que es posible encontrar características óptimas para su aplicación en la ingeniería de biomateriales, tales como: una gran área superficial en relación al volumen (en el caso de las nanofibras, esta relación puede ser aproximadamente de 10^3 veces más que una microfibras, flexibilidad en la superficie, alta porosidad, poros interconectados y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocida del material [34]. Este proceso es capaz de fabricar nanofibras de un amplio rango de materiales, es posible obtener nanofibras de polímeros, composites, semiconductores y cerámicos.

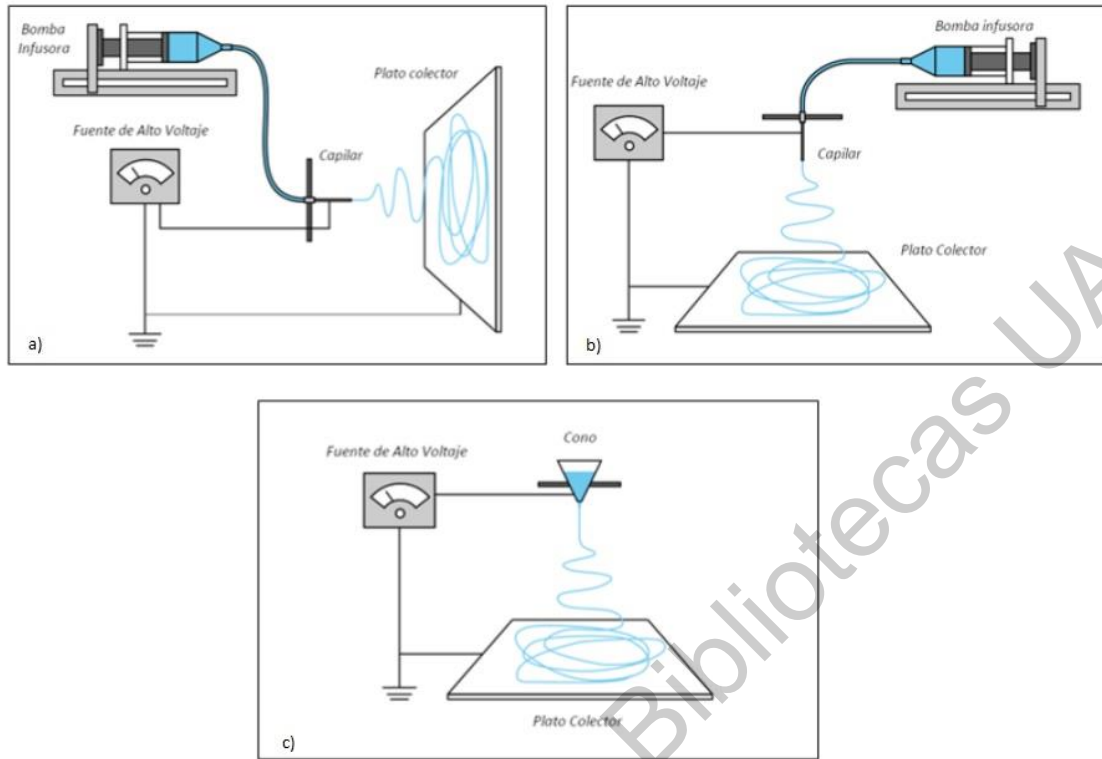


Figura 7. Ejemplos del montaje del equipo de electrohilado (extraído de [34]).

La técnica hace uso de las fuerzas electroestáticas para estirar una solución mientras esta se solidifica, el fundamento se basa en aplicar un fuerte campo eléctrico para lograr superar la fuerza de tensión superficial en la solución de polímero cargado eléctricamente [35]. Una vez que se tiene la solución en la jeringa se inicia la aplicación de alto voltaje, cuando este potencial eléctrico se aplica, las cargas se acumulan promoviendo la formación de una gota en la punta del capilar, a medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota se alarga para crear una forma cónica conocida como cono de Taylor, de donde finos chorros de solución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector, como se observa en la Figura 6, mientras que los disolventes con un alto grado de presión de vapor comienzan a evaporarse, causando una disminución en el diámetro del chorro y la velocidad [36]. Una vez evaporado el solvente, los segmentos de fibras son depositados al azar en un sustrato.

El sustrato, tiene la característica de ser de un material conductor, el más utilizado es el aluminio; así mismo puede variar la forma del recolector, ya que puede ser un cilindro giratorio, electrodos paralelos, un cilindro giratorio de alambres o con pequeños rastros, discos, anillos, entre otros arreglos [35].

El montaje más común para la ejecución de la técnica de electrospinning, se muestra en la Figura 7, consta de un capilar a través del cual debe ser expulsada la solución polimérica (aguja, cono, etc.); una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al lugar de salida de la solución y otro directamente al plato colector (lamina de metal conductor o mandril rotatorio) donde posterior a la evaporación se depositan las fibras [34][37].

Los polímeros son dieléctricos, en presencia de un campo eléctrico pueden considerarse como un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos compuestos por cargas positivas y negativas cuyos centros no coinciden perfectamente, se mantienen en su lugar por acción de las fuerzas atómicas y moleculares, y solo pueden cambiar su posición ligeramente en respuesta a fuertes campos eléctricos externos, lo que explica por qué ocurre el estiramiento de la solución en el proceso.

Existen diversos parámetros relacionados con cada uno de los componentes que involucran el equipo, los cuales determinan las propiedades y características de las fibras [37], como son:

Parámetros de la solución polimérica

- **Concentración de la solución**, la cual está directamente relacionada con la viscosidad, es decir, incrementar la concentración involucra que la viscosidad de la solución sea suficientemente fuerte para oponerse a la estabilidad del depósito y así salpicar la solución a grandes distancias.
- **Tensión superficial**, cuando se incrementa el campo eléctrico se intenta reducir el área superficial por unidad de masa, para lograr chorros más pequeños y reducir la presencia de gotas o esferas.

- **Conductividad de la solución**, entre mayor sea la conductividad de la solución mayor será la capacidad de transportar las cargas de la misma. En algunos casos se incorporan sales a incrementarla, ya que promueven la fuerza eléctrica para el estiramiento del chorro.
- **Efecto dieléctrico del disolvente**, el disolvente además de disolver las moléculas del polímero debe llevarlas hasta el colector, es por eso que se debe tomar en cuenta la constante dieléctrica del solvente.

Mientras que los parámetros relacionados con el proceso son:

- **Voltaje**, en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de Coulomb. Es de los parámetros más importantes.
- **Flujo de salida**, determina la cantidad de solución disponible dentro del proceso de electrohilado, un mínimo valor de volumen de solución a la salida mantiene estable el cono de Taylor.
- **Efecto del colector**, como ya se hizo mención existen diversos colectores y los cuales determinan el ordenamiento de las fibras y en algunos casos la forma de las mismas.
- **Distancia entre la punta de la aguja y el plato colector**, se requiere de una distancia óptima para dar el suficiente tiempo a que el disolvente se evapore antes de llegar al recolector, pero no más allá para que se rompan las fibras por efecto de su propio peso.

Parámetros ambientales

- **Humedad**, un parámetro importante, debido a que, con un aumento en la humedad se obtienen poros en las fibras o no se permite una constante evaporación del solvente.

2.4.2.1 Modificaciones al proceso

Existen diferentes modificaciones al sistema de electrohilado, algunas se limitan solo modificar el recolector mientras que otras mejoran el proceso de hilado y el rendimiento de las fibras.

Entre los sistemas modificados se encuentra el sistema con múltiples jeringas, el cual permite obtener una mayor producción de fibras y disminuir el taponamiento de las jeringas. Como se puede observar también se puede cambiar de dirección (Figura 7b) o de una bomba de inyección a un cono (Figura 7c).

Otra opción es la modificación de la jeringa, algunos utilizan una jeringa con pico lo que les permite hilar a distancias más cortas; otra modificación es el uso de una jeringa coaxial, la cual permite obtener una sola fibra, pero de dos diferentes materiales que se pueden distinguir entre sí, es decir, uno dentro del otro, y dependerá de la aplicación ya que se pueden generar fibras huecas mediante procesos químicos.

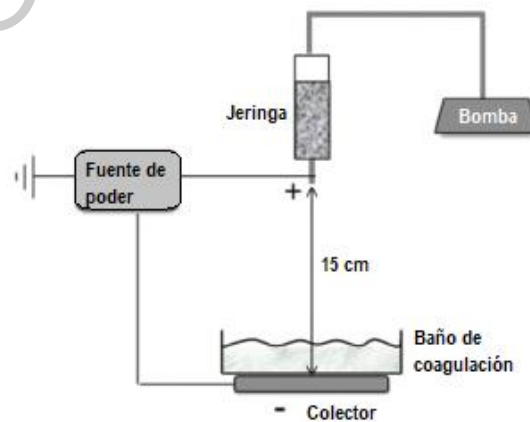


Figura 8. Esquema de electrohilado con un sistema de entrecruzado (modificado de [38]).

También es posible utilizar una jeringa de vidrio con chaqueta de gases, los cuales son utilizados para obtener fibras lisas; otra es una jeringa de biocomponentes, la cual permite electrohilar dos materiales diferentes, uno al lado del otro [37][39].

2.4.2.1.1 Sistema de entrecruzado (baño de coagulación)

Otra modificación al proceso de electrohilado es la incorporación de una caja de coagulación lo que involucra colocar verticalmente el sistema (Figura 8). El sistema consta de una caja o recipiente metálico con una solución de un compuesto químico que permite al polímero electrohilado entrecruzarse para tener mejor estabilidad tanto física como química.

Las soluciones utilizadas en el baño de coagulación son soluciones iónicas, y la concentración puede ser determinada por el gradiente de concentración solvente-coagulante [40], mediante la Ley de difusión de Fick.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Una membrana polimérica nanoestructurada de fibras de alginato de calcio y polivinilo alcohol mediante la técnica de electrohilado, podrá promover el crecimiento celular para regeneración de tejidos sanguíneos de organismos que han sido heridos con hemorragia externa.

3.2 OBJETIVOS GENERAL

Sintetizar una membrana de nanofibras de alginato de calcio y polivinilo alcohol mediante la técnica de electrohilado que promueva el crecimiento celular de tejidos sanguíneos.

3.2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar una membrana de fibras de alginato de sodio y polivinilo alcohol mediante la técnica de electrohilado.
- Obtener membrana de nanofibras entrecruzadas de alginato de calcio y polivinilo alcohol con una solución de cloruro de calcio, para mejorar la resistencia de la membrana a soluciones acuosas.
- Evaluar las propiedades morfológicas de la membrana mediante Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), así como su composición química utilizando la técnica de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).
- Evaluar el comportamiento citotóxico de la membrana como potencializador en la coagulación en un proceso *in vitro*.

4 METODOLOGÍA

En esta sección se describe el método utilizado en la síntesis de la membrana de fibras de alginato de calcio (CaAlg) y polivinilo alcohol (PVA), así como la adaptación de un deferente sistema para la obtención de fibras entrecruzadas, así mismo, se describen las diferentes caracterizaciones de las membranas y el procedimiento para su evaluación citotóxica.

El procedimiento consta de tres etapas: la primera etapa consta de definir los parámetros óptimos para la obtención de fibras de alginato de sodio y polivinilo alcohol (NaAlg-PVA) con una mayor concentración de alginato de sodio, así como compara diferentes concentraciones; la segunda etapa consiste en la obtención de fibras entrecruzadas para mejorar su resistencia física y mecánica, y la implementación de un sistema de coagulación en el proceso de electrohilado; finalmente la tercera etapa consta de la evaluación in vivo de la citotoxicidad y viabilidad celular de la membrana mediante la Prueba de Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5 difeniltetrazol (MTT).

Los reactivos fueron utilizados sin purificación adicional. El polivinilo alcohol (medio peso molecular), el kit de determinación de crecimiento celular (Solución de MTT) y el DMEM-F12 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, mientras que el alginato de sodio fue Golden Bell reactivos.

4.1 SÍNTESIS DE MEMBRANA DE NANOFIBRAS DE CAALG-PVA

4.1.1 Síntesis de nanofibras de NaAlg-PVA

Las disoluciones de los compuestos (NaAlg y PVA) se llevaron a cabo de la siguiente manera: NaAlg en agua destilada para obtener una disolución al 2 % m/v y se dejó en agitación magnética por 3 horas. Por otro lado, en un vaso de precipitado aparte se realizó una solución al 10 % m/v de polivinilo alcohol a una temperatura de 80 ± 5 °C con agitación magnética durante 2. Las soluciones previamente mencionadas, se mezclaron en diferentes relaciones de NaAlg-PVA: 30:70, 50:50 y 70:30 para realizar el electrohilado de las mismas.

Posteriormente se colocó cada solución en una jeringa de 3 ml, con un diámetro de 9 mm interno; a una aguja hipodérmica de 16 G se le retiró la punta hasta dejarla plana.

Finalmente se montó la aguja en equipo de electrohilado; la jeringa se coloca en la bomba marca KD Scientific modelo 200, con un suministro de voltaje que se obtuvo por la Fuente de voltaje marca Bertan serie 230, y la placa recolectora.

Se probaron las mismas condiciones con cada una de las soluciones, variando los diferentes parámetros del equipo como se muestra en la Tabla 2, donde se observa listados de los parámetros utilizados; de estos valores se combinaron para obtener un experimento 7x6x5.

Tabla 2. Listado de parámetros del equipo de electrohilado.

Flujo (ml/h)	Voltaje (KV)	Distancia recolector-punta de aguja (cm)
0.1	10	
0.3	12	10
0.5	15	12
0.7	18	15
0.9	20	18
1.1	21	20
1.3		

4.1.2 Entrecruzamiento de películas de NaAlg-PVA

El procedimiento que se llevó a cabo fue reportado por Jeong [41], consistió en sumergir la membrana en agua destilada, posteriormente en etanol, después en la solución de CaCl_2 y nuevamente en etanol, para finalmente dejarla secar a una temperatura de 40°C por 30 min.

Se probaron diferentes tiempos con cada una de las soluciones NaAlg-PVA, dependiendo el comportamiento durante el procedimiento. Se realizó una solución de CaCl_2 a diferentes concentraciones, entre 0.5 y 5.0 m/v% [42].

4.1.3 Electrohilado de NaAlg y PVA por el sistema coaxial

En esta etapa se utilizaron las mismas soluciones descritas anteriormente en la sección 4.1.1., a la solución de NaAlg se le adicionó Triton X-100 0.05 % m/v [42].

Por otro lado, la aguja fue modificada por un sistema coaxial, el cual se construyó con agujas de diámetro diferente, una de 18 G y la otra de 26 G. Con este sistema se colocó cada una de las soluciones en una diferente jeringa de 9 mm de diámetro interno; la solución de PVA se conectó a la entrada interna de la aguja coaxial, mientras que la solución de NaAlg a la entrada externa.

Posteriormente se colocaron ambas jeringas en la bomba doble marca KD Scientific modelo 200, y se comenzó el electrohilado. Se probaron las mismas condiciones a cada solución variando los diferentes parámetros del equipo, como se muestra en la Tabla 2.

4.1.4 Síntesis de nanofibras entrecruzadas de CaAlg-PVA

Se colocó la jeringa y la placa recolectora de forma vertical, sin embargo, la placa recolectora se encontraba sumergida en una caja Petri para poder llevar a cabo el baño de coagulación y obtener fibras entrecruzadas.

Se disolvió CaCl_2 % 0.5 m/v en agua destilada con etanol en una relación de 5:1 (según lo reportado Nie Huarong [43]). Posteriormente se colocaron 25 ml en una caja Petri dentro de la cual previamente se colocó la placa recolectora.

El sistema se llevó a cabo con una velocidad de flujo de 0.1 ml/h, una distancia de 15 cm y el parámetro que se varió fue el voltaje, entre 15 a 21 KV.

4.2 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

4.2.1 Microscopio electrónico de Barrido (SEM)

El análisis de Microscopía Electrónica de Barrido, SEM por sus siglas en inglés, se realizó para obtener imágenes de la morfología y el diámetro de las fibras, así como, las posibles impurezas y la uniformidad de las mismas. El análisis fue hecho por el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) marca JEOL JSM-7610F con un voltaje de 1.0 y 5.0 KV, aproximación de 5 000, 10 000, 20 000 y 25 000 X. La muestra fue montada sobre una tira de carbono, la cual fue colocada en los porta muestras para después ser bañada con una capa de oro.

4.2.2 Espectroscopia Infrarrojo

El análisis de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) se llevó a cabo para la determinación de los modos vibracionales e identificación de grupos funcionales a partir de comparación bibliográfica. El análisis fue hecho por un Espectrómetro Perkin Elmer GX (modelo Spectrum One), en el rango de 4000 a 450 cm^{-1} , con la técnica de reflectancia totalmente atenuada (ATR) con punta de diamante, 24 barridos, 4 cm^{-1} de resolución.

4.3 PRUEBA DE EVALUACIÓN CITOTÓXICA

4.3.1 Cultivo celular

Primero se descongelaron las células y posteriormente se agregaron 3 ml de medio de cultivo (DMEM-F12) suplementado con suero bovino; después de resuspender la solución para separar la monocapa de células formadas, se colocaron dentro de un frasco T y se dejaron incubar a 37 °C en oscuro.

4.3.2 Lavado de membranas

Primero se cortó cada una de las membranas de nanofibras y películas de NaAgl y PVA en pequeños pedazos (alrededor de 0.5 cm²), y se lavaron con medio de cultivo y antibiótico al 1% (gentamicina), hasta que el cambio de color del medio no fuera evidente, a un pH aproximado de 7.4.

4.3.3 Montaje de las membranas en las placas de cultivo

En una placa de 24 pozos se colocaron dos experimentos por triplicado de cada material (Figura 9), posteriormente se colocó en luz UV por 10 min (de cada lado de la placa) para asegurar la muerte de bacterias y hongos.

Pasado el tiempo se colocó en cada pozo 100 µl de la suspensión celular obtenida de un Frasco T y 500 µl de medio de cultivo suplementado con suero de bovino y antibiótico (medio completo) para después dejarlas incubar por el tiempo al que se quiera realizar la medida; para este caso fue de 24, 48 y 120 horas.



Figura 9. Diagrama de la distribución de los pozos para la prueba MTT, una placa para cada tiempo medido (Modificado de [44]).

4.3.4 Prueba MTT

De todos los pozos a analizar se retiró el medio completo, para posteriormente agregar 10 μ l de una solución de MTT, del Kit para determinación de crecimiento celular MTT, y 90 μ l de medio de cultivo. Se deja incubar por 4 horas a 37 °C en ausencia de luz, posteriormente se retiró la solución cuidadosamente para no destruir la membrana. Una vez realizado esto se agregaron 100 μ l de isopropanol (solvente del MTT) agitando suavemente para asegurar la salida del MTT de la mitocondria de cada célula o garantizar la disolución de los cristales de Formazan MTT. Finalmente se retiró la solución de cada pozo, y se llevó a cabo la medición de la absorbancia espectrofotométrica en un lector de microplacas ELISA (IMark) a una longitud de onda de 595 y 655 nm.

4.3.5 Conteo de células por hemocitómetro (Cámara de Neubauer)

Se preparo una solución 1:1 de una suspensión celular en medio completo y azul de tripano, con un volumen final de 200 μ l. Por medio de la cámara de Neubauer se realizó el conteo en cada cuadrante para comparar el promedio con el cuadrante central.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La síntesis de la membrana inició con la búsqueda de condiciones obtenidas que permitieran obtener fibras a escala nanométrica y con buenas características morfológicas.

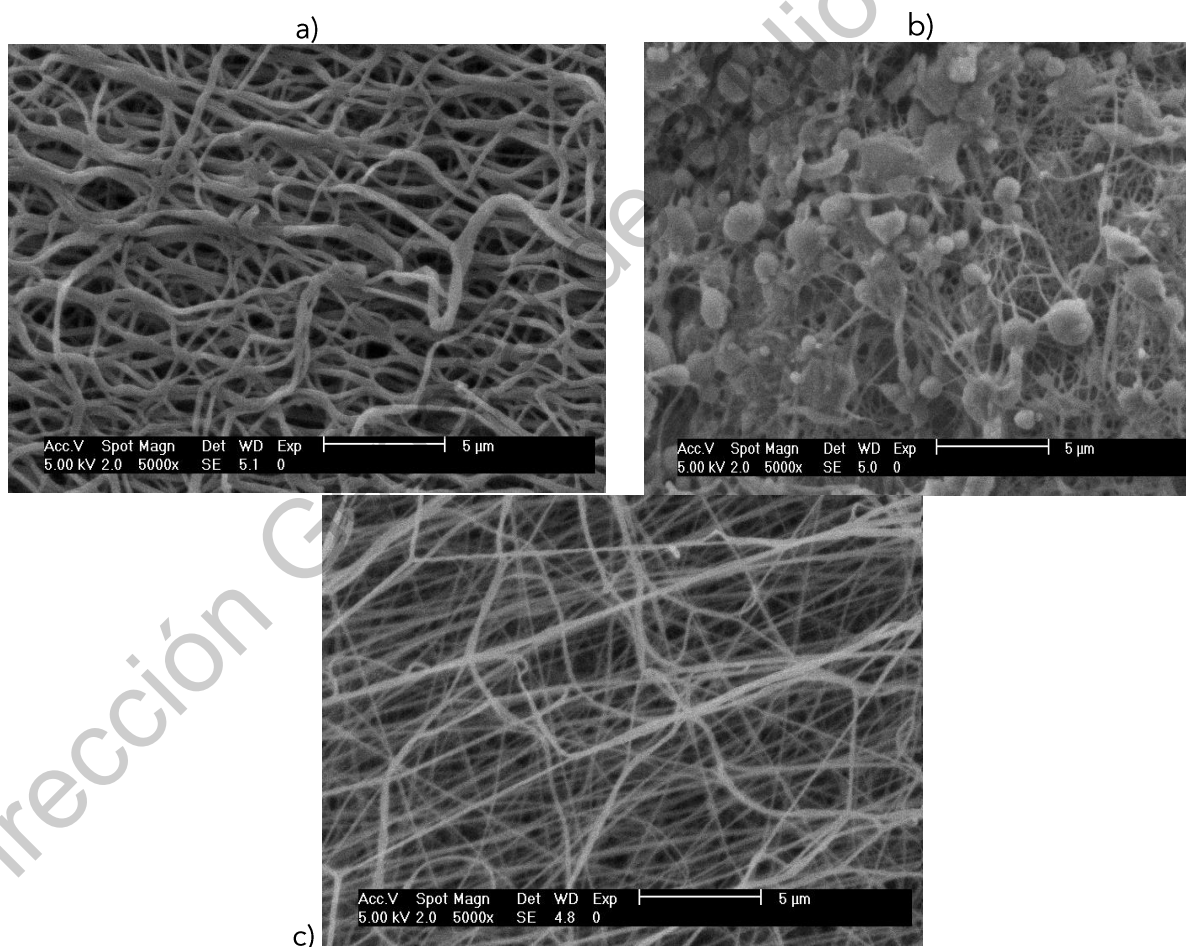


Figura 10. Micrografías SEM de la mezcla de NaAlg:PVA con un razón de a) 30:70, b) 50:50 c) 70:30.

5.1.1 Membranas de fibras de NaAlg-PVA

En la parte experimental se realizaron pruebas de una mezcla de ambos polímeros, mediante los pasos ya especificados en la sección de metodología. Primero se utilizó una mezcla con concentración mayor de PVA, 30:70 (NaAlg:PVA), partiendo de los parámetros establecidos por el centro de trabajo del laboratorio de CIVESTAV Querétaro, donde finalmente se establecieron como parámetros: 15 KV, 10 cm entre la placa recolectora y la punta de la jeringa y 0.3 ml/h; posteriormente estos parámetros se utilizaron para comparar el cambio respecto a la relación de los componentes.

En la Figura 10a) se muestran las fibras obtenidas con una concentración 30:70, por medio del software Image J, se determinó que el tamaño promedio de las fibras, obteniéndose un diámetro de 244.80 ± 100 nm, así mismo se puede observar que el tamaño no es homogéneo.

Tabla 3. Parámetros significativos de nanofibras por el método coaxial.

Voltaje (KV)	Distancia (cm)	Flujo (ml/h)	Tamaño promedio de las fibras (nm)
15	15	0.1	142.19
19	10	0.1	95.98
19	15	0.1	107.58
19	18	0.1	104.85
19	20	0.1	112.34
21	15	0.1	206.9
21	18	0.1	150.58

Por otro lado, en la Figura 10 b) la concentración de la muestra es de 50:50, en la imagen se pueden observar una gran cantidad de impurezas en las fibras, ya que se formaron cúmulos a través de la película, con un tamaño de $857 \pm 594 \text{ nm}^2$. Posteriormente se utilizó una concentración 70:30, en donde la película muestra fibras más homogéneas, con un tamaño de $182 \pm 80 \text{ nm}$, sin embargo, se encuentran más desordenadas.

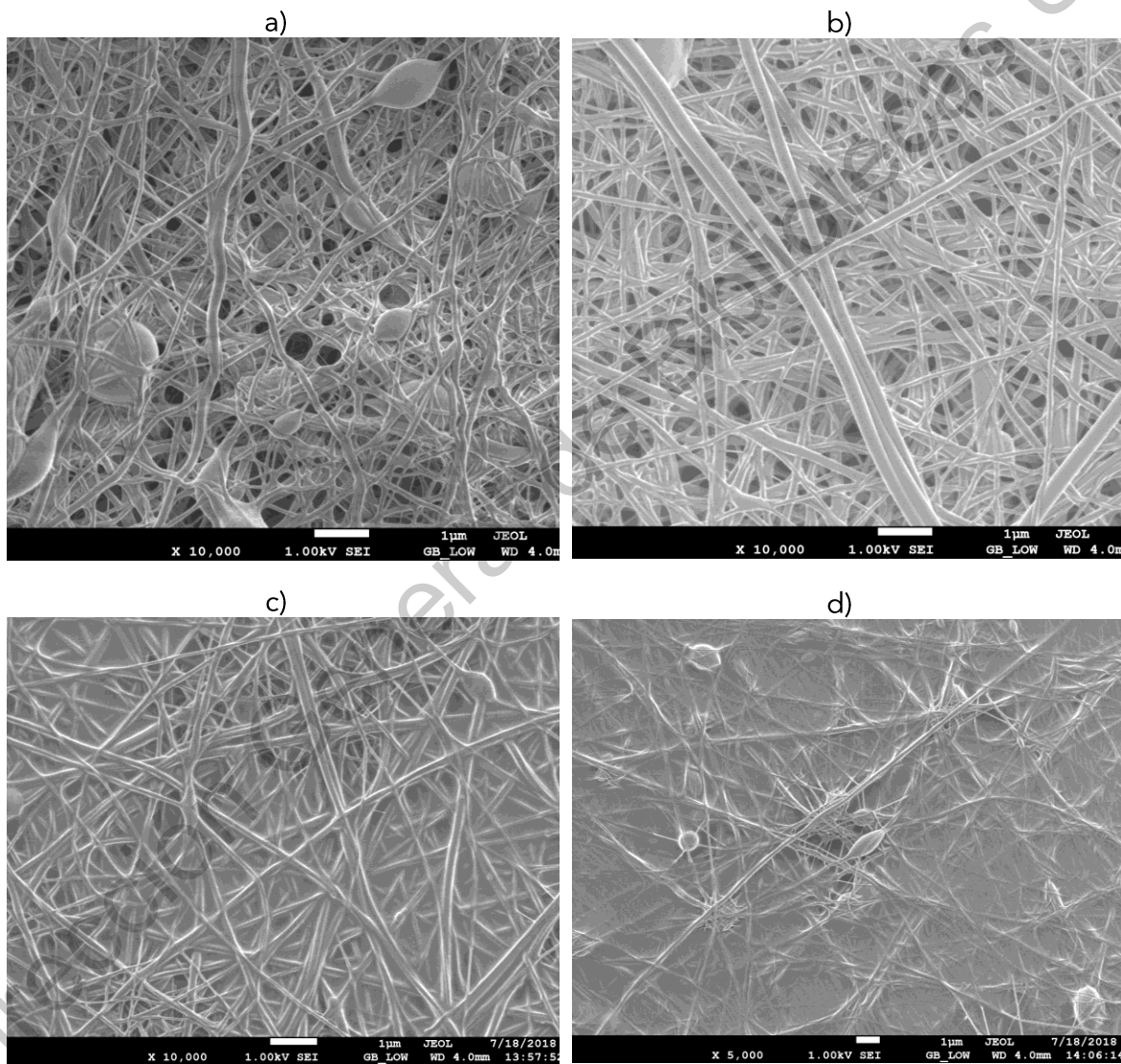


Figura 11. Morfología de membrana obtenida por sistema coaxial a 19 Kv, 0.1 ml/h y con a) 10 cm, b) 15 cm, c) 18 cm y d) 20 cm.

Posteriormente se procedió a entrecruzar las fibras, sin embargo, al final del proceso las fibras perdían su morfología, y terminaban como película. Esto se puede atribuir a un hinchamiento del polímero PVA, lo que provoca que las fibras se unan una con otra y se pierda la morfología. Así mismo la atribuimos a la solubilidad de ambos polímeros en el agua.

5.1.2 Membrana de fibras del sistema coaxial NaAlg y PVA

Se decidió implementar el sistema coaxial de agujas, con el fin de que el alginato este más en contacto con la solución de CaCl_2 y evitar la pérdida de las fibras.

En este proceso, se utilizó una velocidad de flujo de 0.1 ml/h, debido a que durante las pruebas con este parámetro se observó un mejor comportamiento del chorro, así como la formación del cono de Taylor, porque es mejor tener una mínima velocidad de flujo para mantener el balance entre la solución polimérica que sale de la punta y la solución de se queda en el chorro [45].

En las membranas obtenidas por este sistema coaxial los primeros parámetros dieron como resultado fibras con muchas cuencas, como se observa en la Figura 11a), las cuales corresponden a un voltaje de 19 KV, un flujo de 0.1 ml/h y una distancia entre la punta de la aguja y la placa recolectora de 10 cm. El tamaño promedio de estas fibras es de 142.19 ± 200 nm, mientras que el diámetro de las cuentas es de alrededor de 514 ± 300 nm (con 615 ± 200 nm² de área). Esto puede ser porque a las fibras no termina de evaporar el solvente, lo que provoca que al llegar a la placa recolectora, estas colapsen y forman una cuenta, no obstante aún continua la fibra; en cambio, las esferas que llegan a la placa las podemos atribuir a un flujo no constante, debido a que el alginato se conglomera en la punta del chorro y después es lanzado a la placa, estos fenómenos ocurren cuando el campo eléctrico no es suficiente para romper la tensión superficial del polímero [46].

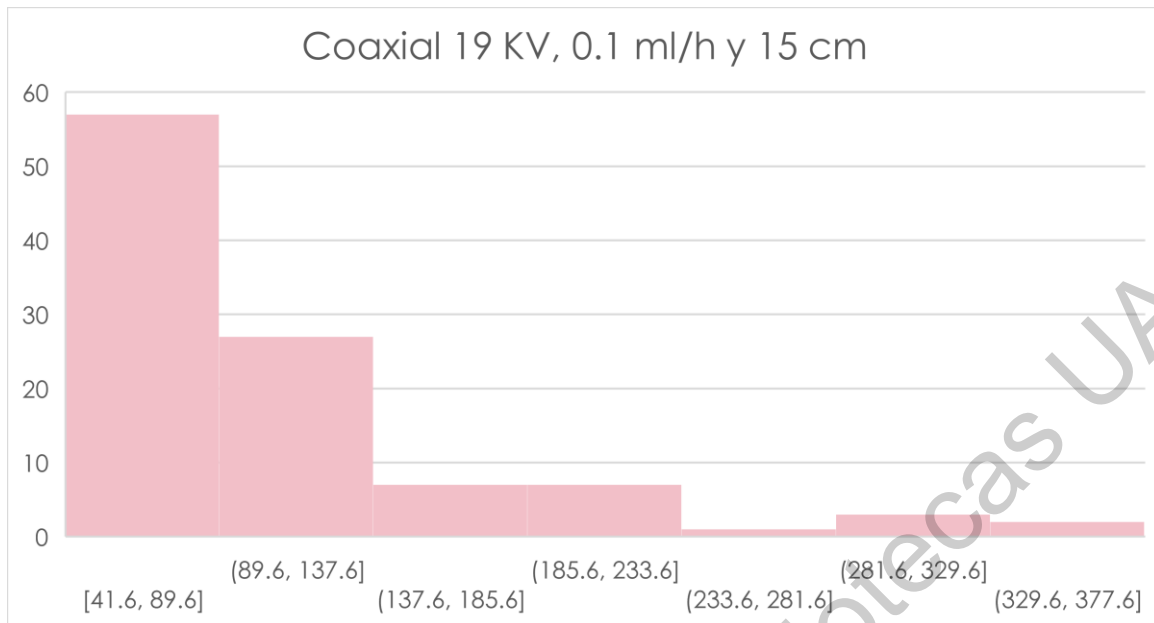


Figura 12. Histograma de nanofibras por el método coaxial.

Para evitar la presencia de las gotas y cuencas se modificó la distancia en las siguientes muestras. La Figura 11 b) corresponde a parámetros de 19 KV, 15 cm y 0.1 ml/h, donde se puede observar la disminución de gotas en las fibras, con un tamaño alrededor de $520 \pm 150 \text{ nm}^2$ (con diámetro de $800 \pm 150 \text{ nm}$). Sin embargo, las fibras tienen un tamaño más homogéneo como se puede observar en la Figura 12, donde el 57% de las fibras se encuentran entre un tamaño de 41.6 a 89.6 nm.

En la búsqueda de dejar en ceros la presencia de cuencas en nuestra membrana se prosiguió a aumentar la distancia entre el recolector entre la aguja. En la Figura 11 c) se observan fibras con los parámetros de 19 KV, 0.1 ml/h y 18 cm. El promedio de las fibras no varió por mucho a comparación de la Figura 11b), ya que es de $104.85 \text{ nm} \pm 90 \text{ nm}$, sin embargo, los tamaños no son tan homogéneos.

Por otro lado, ya no hay presencia de gotas, lo que implica que se está evaporando el solvente antes de llegar a la placa recolectora; en cambio se percibe una delgada malla que cubre a las fibras.

Por último, en la Figura 11 d) se prosiguió modificando la distancia entre la placa recolectora y la punta de la aguja para ver el efecto que este parámetro degenera en nuestras fibras. Y como se observa el tamaño de las fibras es aumento ligeramente a 112.34 ± 70 nm, además de un incremento en la presencia de la malla que cubre a las fibras; mientras que el tamaño de las impurezas esféricas es de 594 ± 479 nm².

Por lo anterior, se hizo evidente que conforme aumenta el voltaje disminuye el diámetro de las fibras; y lo mismo ocurre al aumentar la distancia, sin embargo, también hay un aumento de la delgada malla que cubre a las fibras; estos defectos se presentan comúnmente con un aumento en la distancia entre el recolector y la aguja [45][47].

5.1.3 Membrana de fibras entrecruzada de CaAlg-PVA

Para mantener la morfología de las fibras, aumentar su resistencia mecánica y evitar su solubilidad en agua, es importante entrecruzar las fibras, sin embargo, el proceso descrito de entrecruzamiento no mostro una buena conservación de la morfología de las mismas.

Por lo anterior se buscó modificar el sistema de electrohilado para utilizar el mismo coagulante iónico y no utilizar solventes citotóxicos como es el glutaraldehído [27] o el ácido cítrico [48].

El sistema que se montó se muestra en la Figura 13, donde se observa que las fibras entran en contacto con la solución de CaCl_2 antes de llegar a la placa recolectora, formándose la membrana de fibras entrecruzadas sobre la solución.

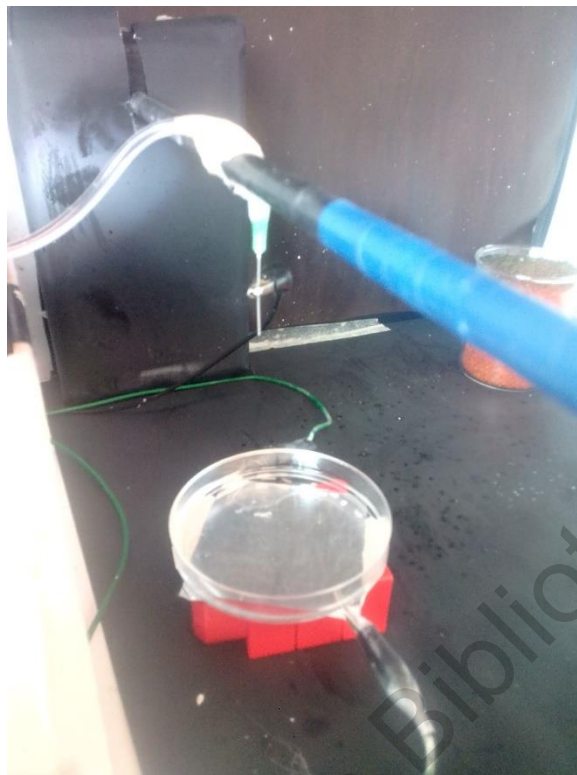


Figura 13. Ilustración del sistema de electrohilado con baño de coagulación montado en el laboratorio.

Las imágenes de microscopía de la Figura 14, muestran la morfología de las fibras obtenidas con el método simple y los parámetros de 0.1 ml/h, 15 cm y 19 KV (Figura 14a)) y 21 Kv (Figura 14 b y c)). El tamaño promedio de las fibras (Figura 14 a)) en la parte ancha es de 160 ± 100 nm de diámetro de las fibras, mientras que la parte más delgada tiene un promedio de 31 ± 15 nm de diámetro. Por otro lado, los cúmulos de fibras que se observan son de un tamaño de 158.00 ± 10 nm de diámetro, es decir, un área promedio de $3.14 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$.

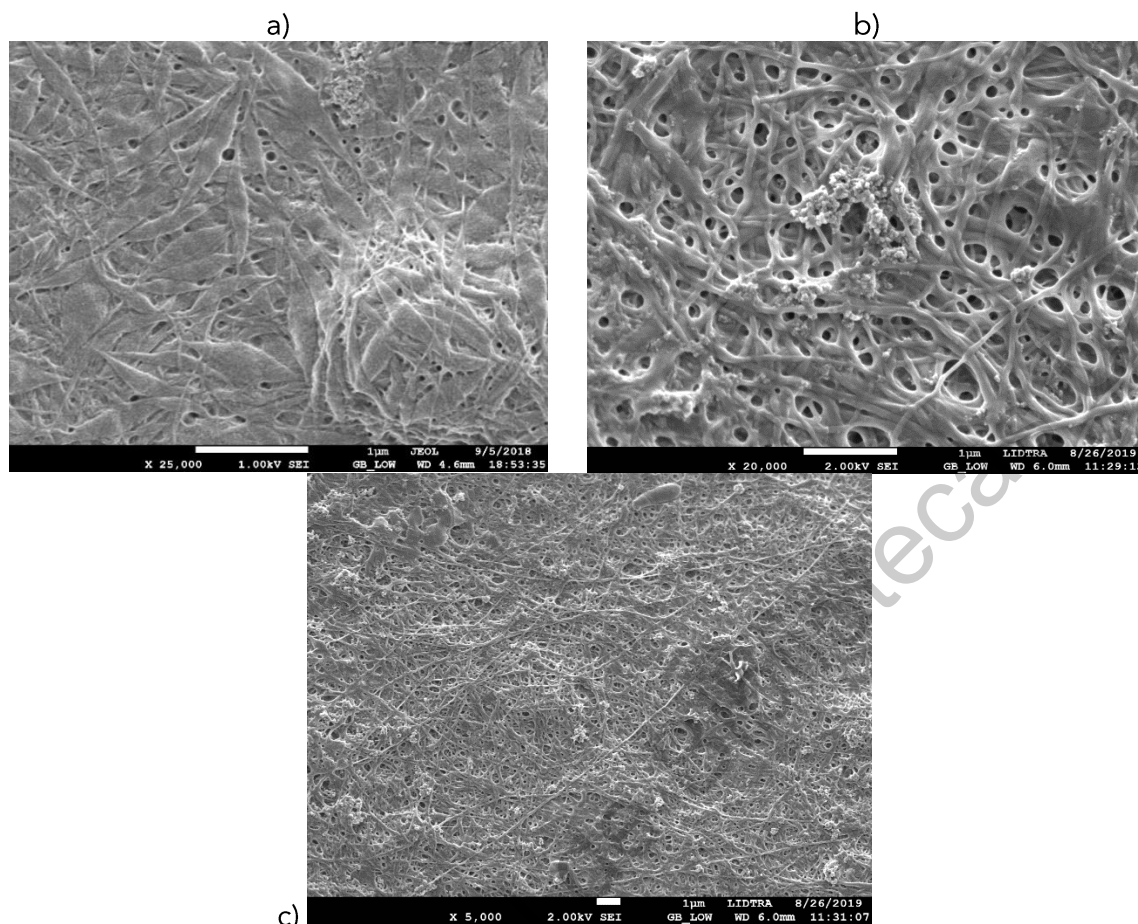


Figura 14. Morfología obtenida a 0.1 ml/h y 15 cm a) 19 KV con magnificación de 25 000X, b) 21 KV con magnificación de 20 000X y c) 21 KV con magnificación de 5 000X.

Las fibras en la Figura 14 b) y c) tienen un tamaño más homogéneo y además de mayor porosidad, el diámetro promedio de las fibras es de 70 ± 31 nm. Mientras que los cristales que aparecen en la imagen los atribuimos a cristales de CaCl_2 .

Sin embargo, las membranas que se obtuvieron no fueron homogéneamente entrecruzadas; en el Figura 14c) se pueden ver de cúmulos donde las fibras se ven o están más delgadas, lo que implica que no se hincharon porque no entraron en contacto con la solución de CaCl_2 y que no están entrecruzadas, además hay zonas donde se pierde la morfología de las fibras, lo que podemos atribuir a un hinchamiento muy alto que provoca que se unan las fibras y se pierda la morfología.

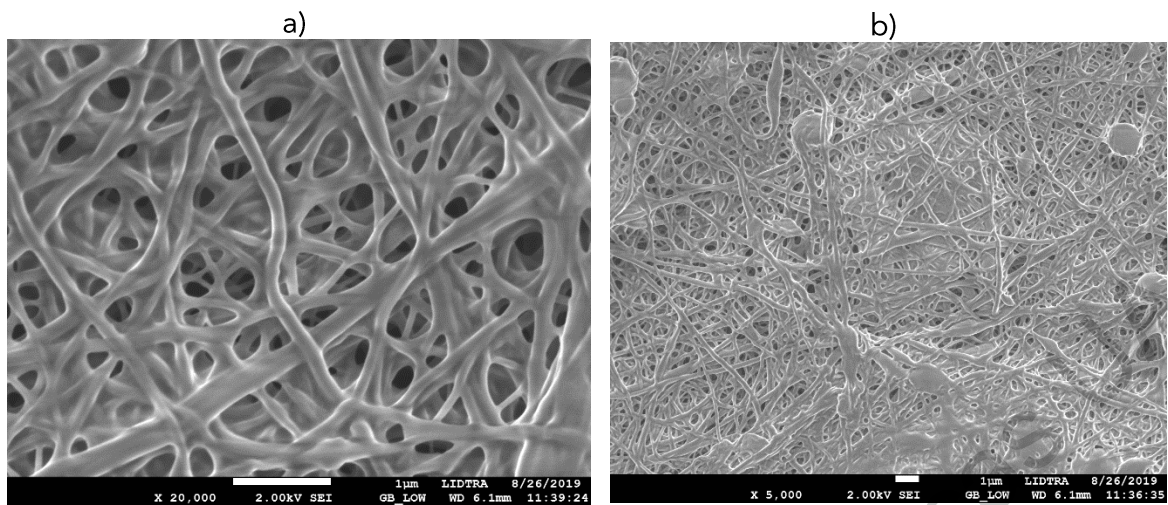


Figura 15. Morfología obtenida del sistema coaxial a 15 cm y 0.1 ml/h y 21 KV.

Por último, se realizaron pruebas con el sistema coaxial, los parámetros con los que se obtuvieron las fibras entrecruzadas con una morfología más homogénea se muestran en la Figura 15; donde se observan fibras con un tamaño de 179.87 ± 62.54 nm.

La membrana que se obtuvo (Figura 15b) tiene impurezas por el entrecruzamiento (cuentas entre las fibras) y gotas que llegaron (sobre las fibras), así como zonas donde comienza a unirse las fibras por el hinchamiento al momento de entrar en contacto con la solución. Las impurezas pueden ser atribuidas a la dificultad de electrohilar al alginato, lo que provoca que se acumule la solución en la punta y cuando se desprendan lleguen en forma de gotas a la placa recolectora; así mismo cuando llegan esas gotas a la solución de CaCl_2 se dispersan sobre las fibras ya obtenidas.

5.2 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A partir de los espectros que se realizaron a las diferentes muestras obtenidos, en la Figura 16 podemos observar que tenemos las bandas correspondientes al PVA, línea color verde, en donde a los 3310 cm^{-1} tenemos la señal correspondiente al estiramiento del enlace O-H, a los 2938 y 2918 cm^{-1} se encuentra el estiramiento de $-\text{CH}_2$, asimétrico y simétrico respectivamente; el estiramiento en la banda a los 1733 cm^{-1} corresponde al $\text{C}=\text{O}$ [49]; esta señal la podemos atribuir a una oxidación del alcohol secundario. Mientras que a los 1438 cm^{-1} tenemos la torsión de tijera del H en $-\text{CH}_2$, a los 1245 y en 1089 cm^{-1} tenemos el estiramiento del enlace $-\text{C}-\text{OH}$ y $-\text{C}-\text{O}$ respectivamente.

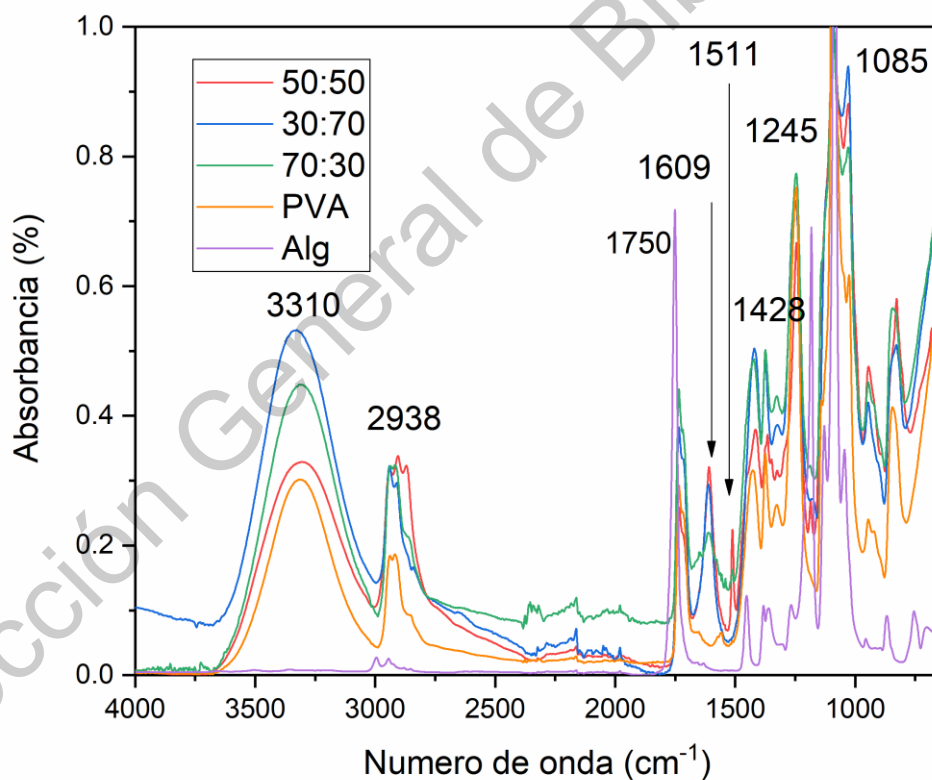


Figura 16. Espectro de infrarrojo de fibras de Alg:PVA.

Para el alginato de sodio (NaAlg) se observa la señal característica del grupo funcional carboxilo (Figura 16), $-\text{COOH}$, a los 1752 cm^{-1} , junto con la señal a 1452 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento asimétrico y el simétrico respectivamente. Por otro lado, hay presencia, aunque con menor intensidad de señales a 1384 y 1361 cm^{-1} correspondiente al estiramiento H-C-H. Las señales a 1182 y 1089 cm^{-1} , corresponden a la torsión del O-H y el estiramiento del grupo $-\text{C-O}$ respectivamente [50].

Así mismo, las mezclas con ambos compuestos en diferentes relaciones se observan en la Figura 16, donde podemos observar las bandas características de ambos componentes ya mencionados, sin embargo, en la banda correspondiente al estiramiento O-H (3309 cm^{-1}) hay un aumento de intensidad y la banda es más amplia para el caso con mayor concentración de alginato [51].

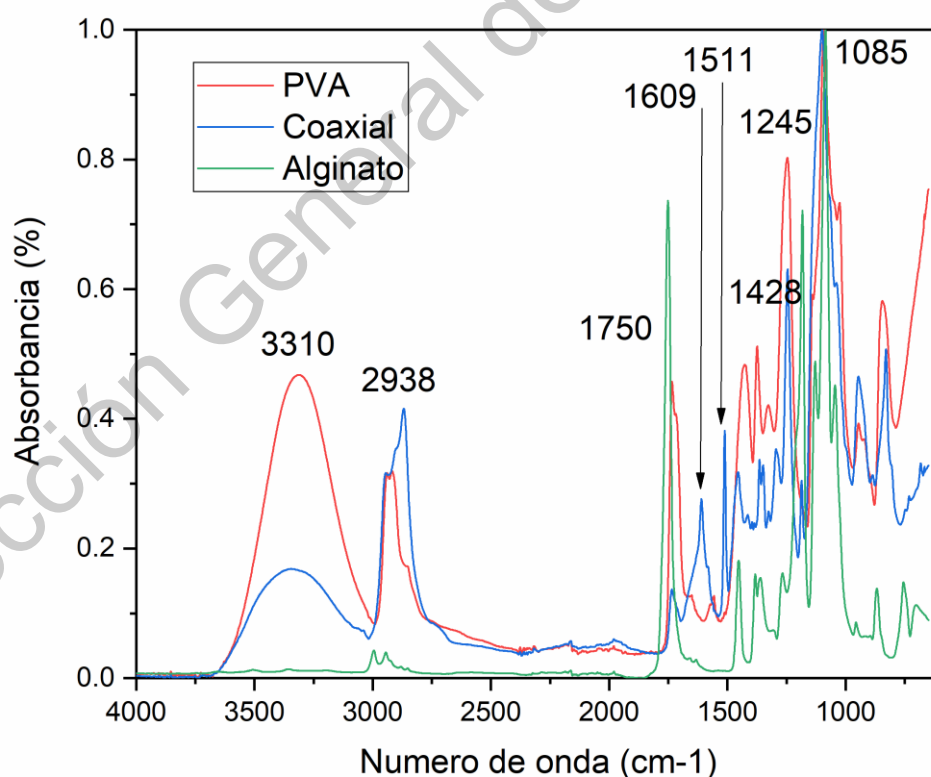


Figura 17. Espectro de infrarrojo de fibras por método coaxial.

En la banda de 1733 cm^{-1} la intensidad disminuye conforme aumenta la concentración de alginato, por otro lado, hay un corrimiento a un número de onda más pequeño en relación al alginato, esto lo podemos atribuir a una interacción por puentes de hidrogeno entre los grupos hidroxilo de cada uno de los polímeros, así como con el grupo carboxilo del alginato, y lo que podemos comprobar con el corrimiento de la señal de 1452 a 1608 cm^{-1} y de 1181 a 1245 cm^{-1} .

Para el caso de la muestra por el método de agujas coaxial, Figura 17, la banda a los 3310 cm^{-1} tienen una menor intensidad, esto lo podemos atribuir a un posible enlace hidrogeno entre el PVA y el Alginato con los grupos $-\text{OH}$. Por otro lado, a los 2938 cm^{-1} se observa que la banda es más amplia, esto debido a que puede haber un cambio en las cargas conformacionales [52].

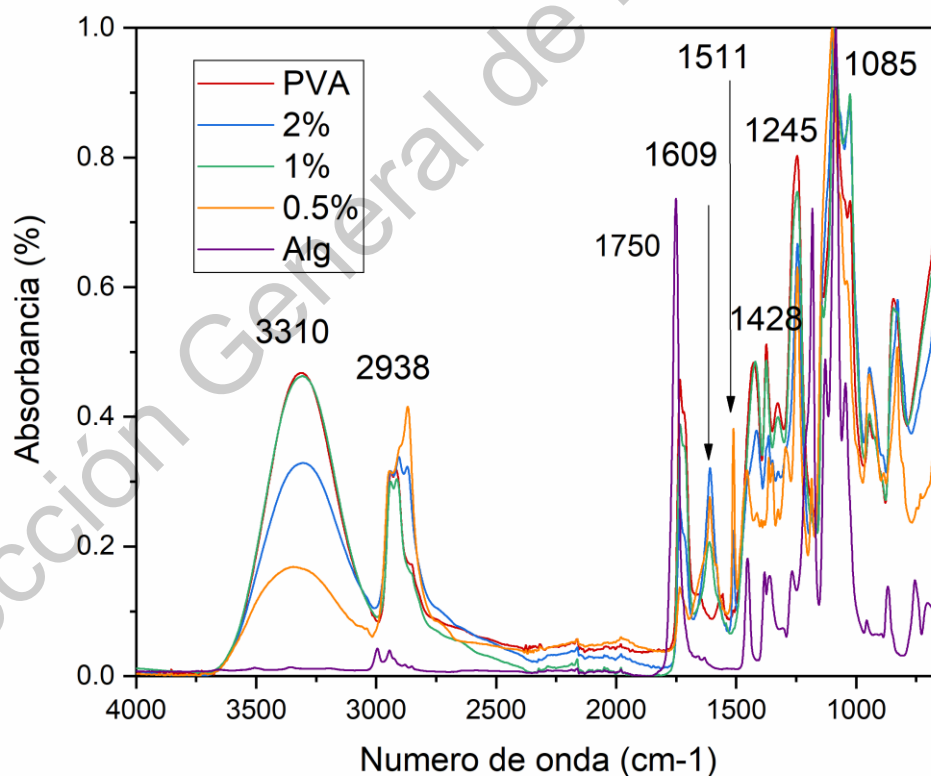


Figura 18. Espectro de infrarrojo de fibras entrecruzadas.

Mientras que la señal a los 1734, 1511 y 1428 cm^{-1} disminuyen su intensidad y muestran un corrimiento, lo cual se puede atribuir a un incremento de enlaces hidrogeno intermolecular entre los polímeros [42].

En los sistemas de entrecruzamiento a una concentración menor (0.5 %) de iones de Ca^{2+} (color rojo) hay una disminución de la banda a los 3302 cm^{-1} , la banda 2913 cm^{-1} se recorre, en 1734, 1611 y 1445 cm^{-1} disminuye la intensidad de la banda; a una concentración de 2% de CaCl_2 (color ciano) tenemos un comportamiento similar, sin embargo, en la banda a 1611 cm^{-1} hay un aumento de intensidad. Por otro lado, a una concentración de 1% de CaCl_2 (color azul), en la banda a los 3302 cm^{-1} hay un aumento de la intensidad, mientras que a los 1611 cm^{-1} la intensidad disminuye y se vuelve más amplia.

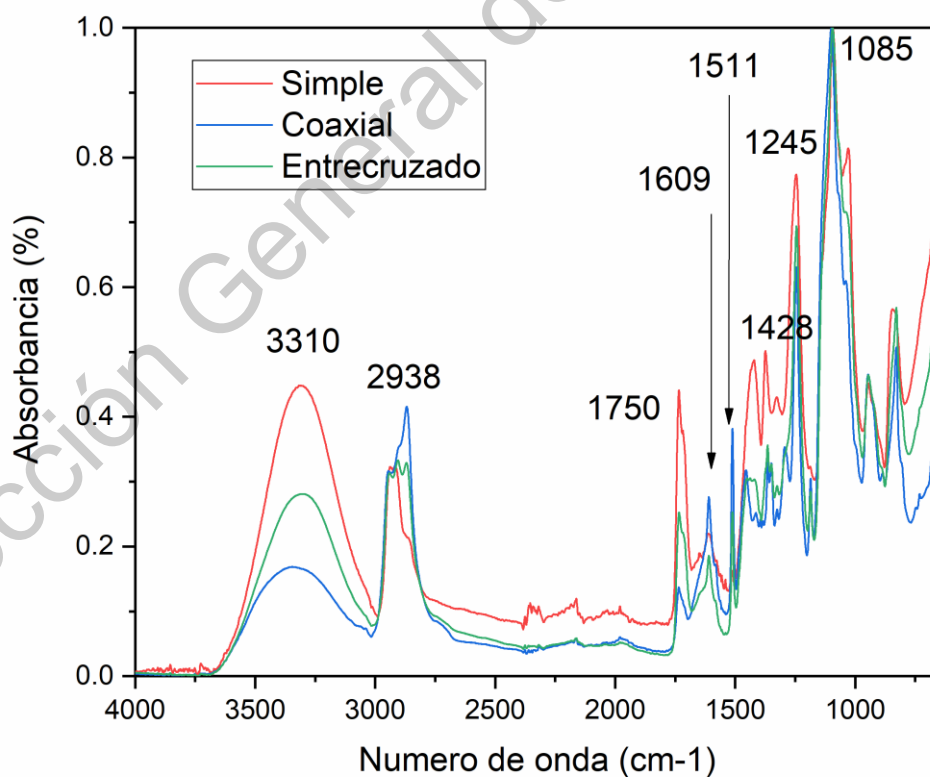


Figura 19. Espectro de Infrarrojo de nanofibras.

El cambio en la banda a los 1612 y 1445 cm^{-1} lo podemos atribuir al proceso de entrecruzamiento, ya que hay interacción iónica entre $-\text{COO}$ y el Ca^{2+} [53], por ende, también hay un cambio en el estiramiento del enlace $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$.

Por último, en la Figura 19, se comparan las diferentes modificaciones que se realizaron a la técnica de electrohilado. Se puede observar que el sistema coaxial genera fibras con una mayor interacción entre el Alg y el PVA, ya que hay una disminución en las señales, a excepción de la banda a los 1609 cm^{-1} , donde el sistema de baño de coagulación exhibe un mejor cambio en el estiramiento del grupo $-\text{COO}$, lo que podemos atribuir a la presencia del ion Ca^{2+} entre el dos extremos B de la moléculas del alginato, provocando un coordinado entre los carboxilos y Ca^{2+} .

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

5.3 EVALUACIÓN CITOTÓXICA MTT

Para estudiar la citotoxicidad de la membrana de nanofibras de NaAlg: PVA se implementó el método de MTT explicado con anterioridad. En esta sección se muestran los resultados obtenidos de citotoxicidad para células de fibroblastos línea JB.

Durante la evaluación las fibras presentaron una buena estabilidad, sin embargo, al inicio comenzaron a disolverse, esto lo atribuimos a que el rojo de fenol (presente en el medio de cultivo DMEM-F12) puede interactuar con el PVA mediante puentes de hidrogeno [54], lo que puede provocar que se pierda la interacción del Alg y el PVA. Además, debido a que el entrecruzado no es homogéneo, se pueden disolver los cúmulos presentes en la membrana, lo cual provoca una disminución en la cantidad de muestra de fibras en la placa.

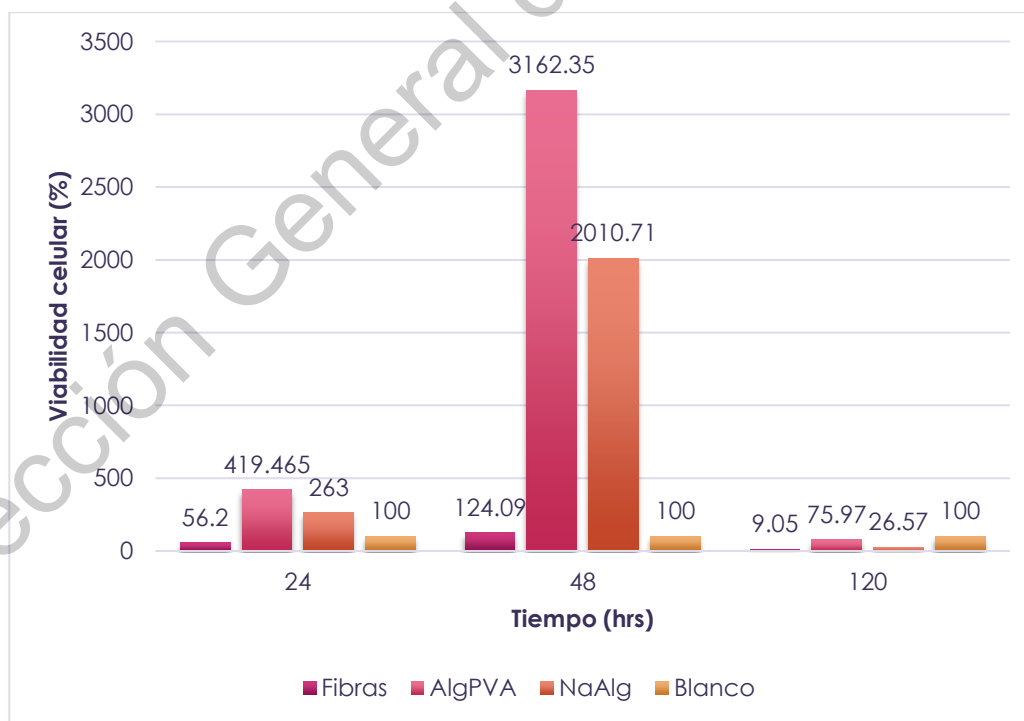


Figura 20. Gráfico de viabilidad celular de la membrana de fibras.

Una vez estable el material se prosiguió con los lavados en agua y medio de cultivo, hasta lograr disminuir al pH, sin embargo, aún se tornaban de color rosa, indicando que no se tiene un pH neutro. Esto lo podemos atribuir a la presencia de los cristales de cloruro de calcio adheridos a las fibras, ya que el color rosa indica un pH ligeramente alcalino.

Los resultados a las 24 horas demostraron que hay adherencia de los fibroblastos en la superficie de la membrana, como se puede observar en la Figura 20 alrededor de un 50% de células se encuentran adheridas a la membrana; mientras que el resto mueren, debido a que necesitan adherirse a una superficie para sobrevivir.

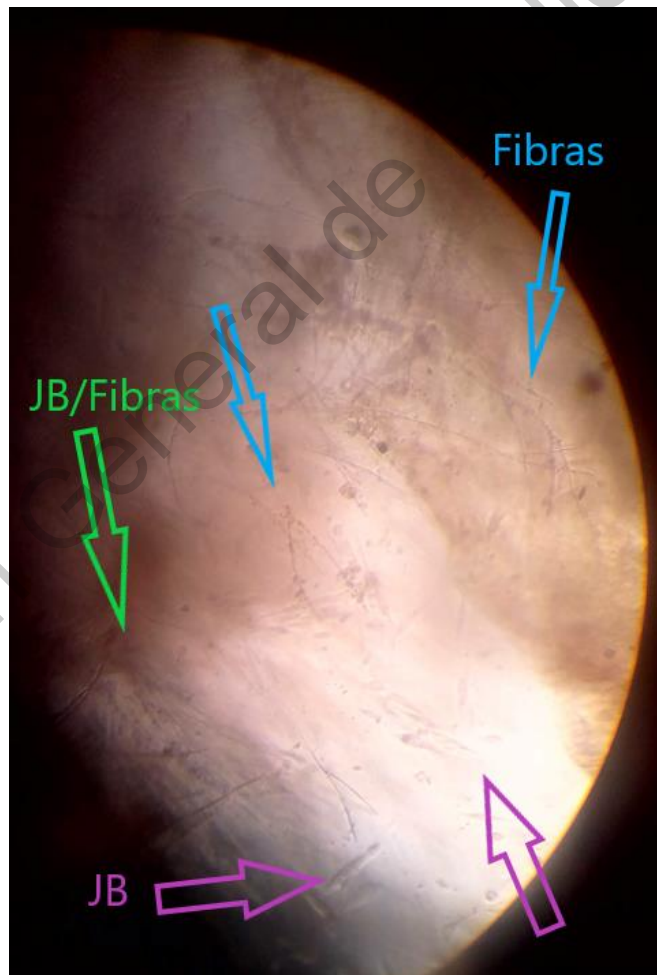


Figura 21. Microscopia de adherencia celular a las 48 horas.

A las 48 horas no se observa toxicidad manifestada por el material de fibras, ya que aumenta la cantidad de células presentes en el pozo, alcanzando un 124% de viabilidad celular. En la Figura 21 se observa una imagen por microscopio óptico, donde muestra la adherencia de los fibroblastos (JB) a la superficie de la placa, así como en las fibras.

Sin embargo, en las muestras control (películas de NaAlg: PVA y Alg) hay un crecimiento celular significativo, dando como resultado una mayor viabilidad celular en comparación con las fibras. Esto lo podemos atribuir a que las películas tienen una mayor área de contacto, en el rango de micrómetros, con esta dimensión se permite un mejor flujo de nutrientes, así como de los desechos celulares.

A las 120 horas aún se observa adherencia de las células a las fibras, sin embargo, la disminución de la viabilidad celular lo podemos atribuir a que en las fibras no permiten el flujo de desechos celulares por la poca superficie que tienen, y esta acumulación provoca la muerte celular. Lo mismo ocurre en las muestras de control, hay una acumulación de desechos que al final provocan un medio ácido el cual impide la sobrevivencia de las células.

Los resultados de una mayor viabilidad celular en las películas lo atribuimos a que el tamaño de la muestra utilizada fue mayor que en las muestras de fibras, lo que provocó que las células no tuvieran la misma cantidad de área para poder proliferar.

6 CONCLUSIONES

Se logró sintetizar una membrana de nanofibras de alginato de sodio y polivinilo alcohol mediante de la técnica de electrohilado, las fibras se obtuvieron tanto con una mezcla homogénea de ambos polímeros como con la implementación del sistema coaxial, obteniéndose un tamaño promedio de las fibras de alrededor de 84 nm.

Las nanofibras entrecruzadas fueron obtenidas mediante la incorporación de un sistema de coagulación al equipo de electrohilado posicionado de forma vertical, con una solución de cloruro de calcio como coagulante. La membrana demostró ser resistente a soluciones acuosas, lo que podemos atribuir al entrecruzamiento de los polímeros por medio de los iones de Ca^{2+} .

Mediante SEM se identificó la morfología de las fibras, así como el efecto que el cambio de los diferentes parámetros tiene sobre esta. Dando como resultado que al aumentar el voltaje disminuye el diámetro de las fibras; al aumentar la distancia entre el recolector y la aguja disminuye el tamaño de las fibras; y al disminuir el flujo disminuyen las gotas e impurezas en la membrana, obteniendo fibras de un tamaño más homogéneo. Por otro lado, de los resultados obtenidos por FTIR podemos decir que estos polímeros se encuentran interactuando de manera física mediante puentes de hidrogeno, ya que se conservan las señales particulares de ambos polímeros, por lo que no hay una interacción química. Así mismo, los iones de Ca^{2+} logran entrecruzar al alginato por medio de enlaces de coordinación, provocando una mejor resistencia de la membrana a soluciones acuosas.

El análisis de citotoxicidad, Prueba MTT, arrojó como resultado una respuesta favorable de biocompatibilidad, ya que las fibras permiten la adherencia de los fibroblastos, y por siguiente, la proliferación celular es mayor, porque permiten el flujo de nutrientes y desechos celulares.

De este trabajo de investigación podemos concluir que se cumplió el objetivo general, debido a que fue posible electrohilar la molécula de alginato con ayuda de PVA, el cual contribuye a que las cadenas poliméricas del NaAlg tengan un arreglo de cargas conformacionales, ya que por sí solo no es posible lograrlo; este arreglo morfológico se puede conservar entrecruzando las fibras mediante una solución con iones de Ca^{2+} , la cual le otorga estabilidad en soluciones acuosas; además, podemos decir que las nanofibras obtenidas favorecen el crecimiento celular en comparación con películas de ambos polímeros, y de esta forma comprobando la hipótesis planteada al inicio del proyecto.

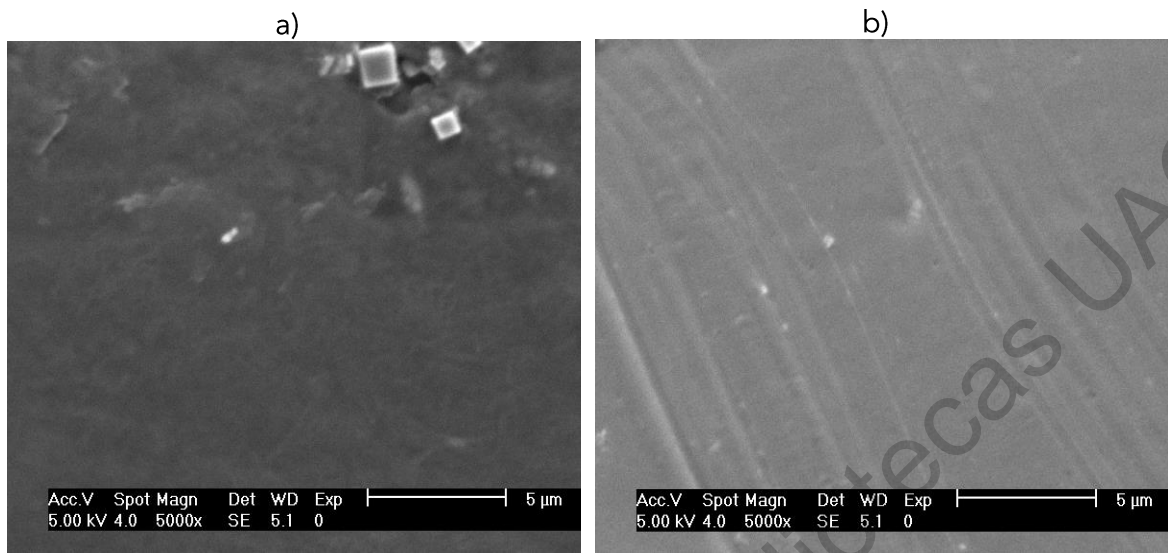
Dirección General de Bibliotecas UNQ

7 PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto que tienen un medio de cultivo sin rojo de fenol dentro de las pruebas citotóxicas.
- Realizar más análisis de FTIR para comprender el motivo de las señales de oxidación el PVA, y por siguiente, la interacción que tienen con el NaAlg.
- Implementar un componente que contribuya a una actividad bacteriostática
- Evaluar la eficiencia del material en el proceso de hemostasia.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8 ANEXO I



c)
Figura 22. Micrografías SEM de películas entrecruzadas a) 50:50 (Alg:PVA) y b) 70:30 (Alg:PVA).

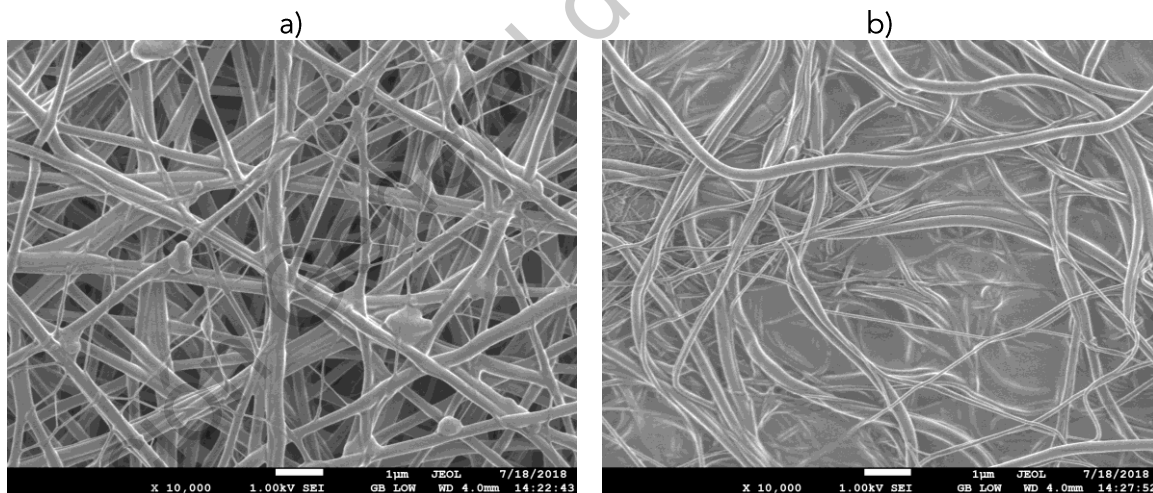


Figura 23. Microscopia SEM de Fibras por el método coaxial, con 21 KV, 0.1 ml/h y a)15 cm y b)18 cm.

9 REFERENCIAS

- [1] T. Adhanom G., «Principales causas de defunción,» Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2017.
- [2] R. Lanza , R. Langer y J. P. Vacanti, Principles of Tissue Engineering, Elsevier, 2011.
- [3] A. C. Colorado, C. A. Agudelo y M. E. Mocada, «Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión,» *Revista Ingeniería Biomédica*, vol. 7, n° ISSN 1909-9762, pp. 11-23, Julio 2013.
- [4] J. Xue, T. Wu, Y. Dai y Y. Xia, «Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Application,» *Chemical Reviews*, vol. 119(8), pp. 5298-5415, 2019.
- [5] M. R. Aguilar y J. San Román, «Smart instructive polymers substrates for tissue engineering,» de *Smart Polymers and their applications*, United Kingdom , ELSEVIER, 2019, pp. 411-429.
- [6] A. Haider, S. Haider y I.-K. Kang, «A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology,» *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.
- [7] J. A. Páramo, E. Panizo, C. Pregonante y R. Lecumberri, «Coagulación 2009: una revisión moderna de la hemostasia,» *Revista Médica Universitaria Navarra*, vol. 53, pp. 19-23, 2009.
- [8] A. Gelabert, E. Argelagués y L. Puig, Hemoterapia en hematología clínica, Barcelona: Editores Toray.
- [9] O. I. Flores R., K. Ramírez M., J. M. Meza M. y J. A. Nava L., «Fisiología de la coagulación,» *Revista Mexicana de Anestesiología*, vol. 37 (S2), pp. 382-386, 2014.
- [10] I. Rodríguez, «Hemostasia».
- [11] F. A. Grimaldo G., «Fisiología de la hemostasia,» *Revista médica de anestesiología*, vol. 40, pp. s398-s400, 2017.
- [12] J. P. Riddel Jr., B. E. Aouizerat, C. Miaskowski y D. P. Lilicrap, «Theories of blood coagulation,» *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, vol. 24 (3), pp. 123-131, 2007.

- [13] V. Kumar, A. K. Abbas, R. S. Cotran y et. al., «Trastornos hemodinámicos, trombosis y shock.,» de *Robbins Patología Humana*, España, Elsevier, 2008, pp. 89-90.
- [14] L. Robles y R. Benavent, «Transtornos de la coagulación,» de *Situaciones clínicas más relevantes*, Tratado de garantía para residentes, pp. 679-687.
- [15] G. Ortix R. y et al., «Manejo del sangrado y la coagulación en la práctica clínica. Evaluación de la evidencia y recomendaciones mediante estrategia GRADE,» *Acta Colomb Cuid Intentiso*, 2016.
- [16] «Organización Mundial de la Salud,» Las 10 pincipales causas de defunción., 24 mayo 2018. [En línea]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. [Último acceso: 01 agosto 2019].
- [17] I. n. d. e. y. geografía, «Características de las defunciones registradas en México durante 2017,» 31 octubre 2018. [En línea]. [Último acceso: 01 agosto 2019].
- [18] M. c. Hajar M., L. G. Ibarra I. y V. H. Segura G., «Atención prehospitalaria y hospitalaria del trauama por lesiones no intencionales,» de *Los accidente como problemas de salud pública en México.*, México, Sociedad Mexicana de Medicina, 2014, pp. 161-191.
- [19] I. Roberts, P. Perel, H. Shakur, t. Costas y et. al., «Effect of tranexamic acid on mortality in patients with traumatic bleeding: prespecified analysis of data from randomised controlled trial.,» *BMJ*, p. 345:e5839, 2012.
- [20] R. Tavano, D. Segat, E. Reddi, J. Kos, M. Rojnik y et. al., «Procoagulant properties of bare and highly PEGylated vinyl-modified silicia nanoparticles,» *Nanomedicine*, vol. 5 (6), pp. 881-896, 2010.
- [21] C. Oslakovic, T. Cedervall, S. Linse y B. Dahlback, «Polystyrene nanoparticles affecting blod coagulation.,» *Nanomedicine: nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 8 (6), pp. 981-986, 2010.
- [22] A. N. Linskay y M. A. Dobrovolskaia, «Nanoparticles and blod coagulation system. Part II safety concerns.,» *Nanomedicine*, vol. 8 (6), pp. 969-981, 2013.
- [23] A. N. Llinskaya y M. A. Dobrovolskaia, «Nanoparticles and the blod coagulation system Part I: benefits of nanotechnology,» *Nanomedicine*, vol. 8 (5), pp. 773-784, 2013.

- [24] A. K. Taskin, M. Yasar, I. Ozaydin, B. Kaya, O. Bat y et. al., «The hemostatic effect of calcium alginate in experimental splenic injury model,» *Ulus Travman Acil Cerrahi Derg*, vol. 19 (3), pp. 195-199, 2013.
- [25] O. Aydin, S. Tuncal, B. Kilicoglu y et. al., «Effects of Ankaferd Blood Stopper and calcium alginate in experimental model of hepatic parenchymal bleeding,» *Bratisl Lek Listy*, vol. 116 (2), pp. 12-31, 2015.
- [26] L. A. DiPietro y A. L. Burns, *Wound Healing: Methods and Protocols*, New Jersey: Humana Press, 2003.
- [27] G. C. Ustundag, E. Karaca, S. Ozbek y I. Cavusoglu, «In vivo evaluation of electrospun poly (vinil alcohol)/sodium alginate nanofibrous mat as wound dressing,» *Tekstil ve Konfesyion*, vol. 20 (4), pp. 290-298, 2010.
- [28] S. Roldan v., C. A. Vargas I., M. L. Mejía S. y et. al., «Principios básicos,» de *Ingeniería de tejido y aplicaciones*, Colombia, Editorial ITM, 2016, pp. 14-200.
- [29] A. I. Caplan, «Tissue engineering designed for the future new logics, old molecules,» *Tissue engineering*, vol. 6(1), pp. 1-8, 2000.
- [30] G. C. Avendaño, A. López y E. Palou, «Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos,» *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, vol. 7, pp. 87-96, 2013.
- [31] C. Jordán Chaves, «Utilidad de colocación de malla intraperitoneales y supraaoneuróticas impregnadas con alcinato de cálcio y alginato de cálcio con factores de crecimiento,» Memoria para optar el grado de doctor, Universidad de Sevilla Facultad de Medicina, Sevilla, 2017.
- [32] C. E. Echeverri, C. Vallejo y M. E. Londoño, «Síntesis y caracterización de hidrogeles de alcohol polivinílico por la técnica de congelamiento/descongelamiento para aplicaciones médicas,» *Revista EIA*, vol. 12, pp. 59-66, 2009.
- [33] D. Li y Y. Xia, «Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?,» *Advance materials*, vol. 16 (14), pp. 1151-1170, 2004.
- [34] L. M. Duque S., L. Rodriguez y M. López, «Electrospinning: La era de las nanofibras,» *Revista Iberoamericana de Polimeros*, vol. 14(1), pp. 10-27, 2013.
- [35] W. E. Teo y S. Ramakrishna, «A review on lectrospinning desing and nanofibre assambles,» *Nanotechnology*, vol. 17, pp. R89-R106, 2006.

- [36] Q. P. Pham, U. Sharma y A. G. Mikos, «Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review,» *Tissue Engineering*, vol. 12, 2006.
- [37] S. Ramakrishna y K. Fujihara , An introduction to Electrospinning and Nanofibers., London : World Scientific Publishing, 2005.
- [38] P. S. Barber, C. Griggs, J. Bonner y R. D. Rogers, «Electrospinning of chitin nanofibers directly from a ionic liquid extract of chimp shellst.,» *Green Chemistry*, vol. 15(3), pp. 601-607, 2012.
- [39] Y. Ding, H. Hou, y. Zhao y Z. Zhu, «Electrospun polyimide nanofibers and their applications,» *Progress in Polymer Science*, vol. 61, pp. 67-103, 2016.
- [40] Q. Yu, M. M. Shi, M. Deng , M. Wang y H. Z. Chen , «Morphology and conductivity of polyaniline sub-micro fibers prepared by electrospinning.,» *Materials Science and Engineering*, vol. B:150, pp. 70-76, 2008.
- [41] S. I. Jeong, M. D. Krebs, C. A. Bonino y Et. al., «Electrospun Chitosan-Alginate Nanofibers with In situ Polyelectrolyte Complexation for Use as Tissue Engineering Scaffolds,» *Tissue Engineering*, vol. 00, pp. 1-12, 2010.
- [42] W. Shen y Y.-L. Hsieh, «Biocompatible sodium alginate fibers by aqueous processing and physical crosslinking,» *Elsevier: Carbohydrate Polymers*, vol. 102, pp. 893-900, 2014.
- [43] H. Nie, A. He, J. Zheng, S. Xu, J. Li. y C. C. Han, «Effects of Chain Conformation and Entanglemente on the Electrospinning of Pure Alginate.,» *Biomacromoleculas*, vol. 9, pp. 1362-1365, 2008.
- [44] I. Freshney, *Culture of Aniaml Cells: A Manual of Basic Technique*, Jonh Wiley and Sons., 2005.
- [45] A. Haider, S. Haider y I.-K. Kang, «A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potencial applications of nanofibers in biomedical and biotechnology.,» *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 11(8), pp. 1165-1188, 2018.
- [46] Q. P. Pham, U. Sharma y A. G. Mikos, «Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review.,» *Tissue engineering*, vol. 12(5), pp. 1197-1211, 2006.
- [47] S. J. Travis y v. R. Horst, «Electrospinning: Application in drug delivery and tissue engineering.,» *Biomaterials*, vol. 29, pp. 1989-2006, 2008.

- [48] S. A. Stone , P. Gosavi, T. J. Athauda y R. R. Ozer, «In-situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers,» *Materials letters*, vol. 112, pp. 32-35, 2013.
- [49] H. S. Mansur, C. M. Sadahira, A. N. Souza y A. A. Mansur, «FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde.,» *Materials science and engineering.*, vol. 28 (4), pp. 539-548, 2008.
- [50] H. Daemi y M. Barikani, «Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles.,» *Scientia Iranica*, vol. 19 (6), pp. 2023-2028, 2012.
- [51] S. M. Islam y M. R. Karim, «Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method.,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vols. %1 de %2366 (1-3), pp. 135-140, 2010.
- [52] S. Safi, M. Morshed, S. A. Hosseini y M. Ghiaci, «Study of Electrospinning of Sodium Alginate, Blended Solutions of Sodium Alginate/Poly(vinyl alcohol) and Sodium Alginate/Poly(ethylene oxide).,» *Applied Polymer Science*, vol. 104, pp. 3245-3255, 2007.
- [53] S. Hua, H. Ma, X. Li, H. Yang y A. Wang, «pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca²⁺ crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium.,» *International Journal of Biological Macromolecules.*, vol. 46, pp. 517-523, 2010.
- [54] S. Screedhar, N. Illyaskutty, S. Screenhanya, R. Philip y C. Muneera, «An organic dye-polymer (phenol red-poly (vinyl alcohol)) composite architecture towards tunable-optical and- saturable absorption characteristics,» *Journal of Applied Physics*, vol. 119 (19), p. 193106, 2016.
- [55] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson, de *Biología molecular de la célula*, España, Omega SA, 1996.