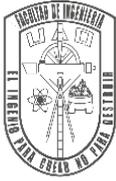
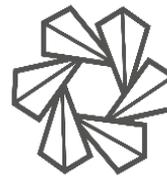


UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



FACULTAD
DE INGENIERÍA



DIPFI
POSGRADO
INGENIERÍA

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Desarrollo y evaluación de una membrana de nanofibras de colágeno/quitosano para liberación de ácido tranexámico.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Maestra en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta:

Tonantzi Pérez Moreno

Dirigido por:

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (julio 2021)

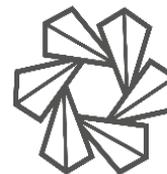
México



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



FACULTAD
DE INGENIERÍA



DIPFI
POSGRADO
INGENIERÍA

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Desarrollo y evaluación de una membrana de nanofibras de colágeno/quitosano para liberación de ácido tranexámico.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Maestra en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta:

Tonantzi Pérez Moreno

Dirigido por:

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Presidente

Dr. Carlos Guzmán Martínez

Secretario

Dra. Janet Ledesma García

Vocal

Dra. María José Rivas Arreola

Suplente

Dra. Alejandra Álvarez López

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (julio 2021)

México



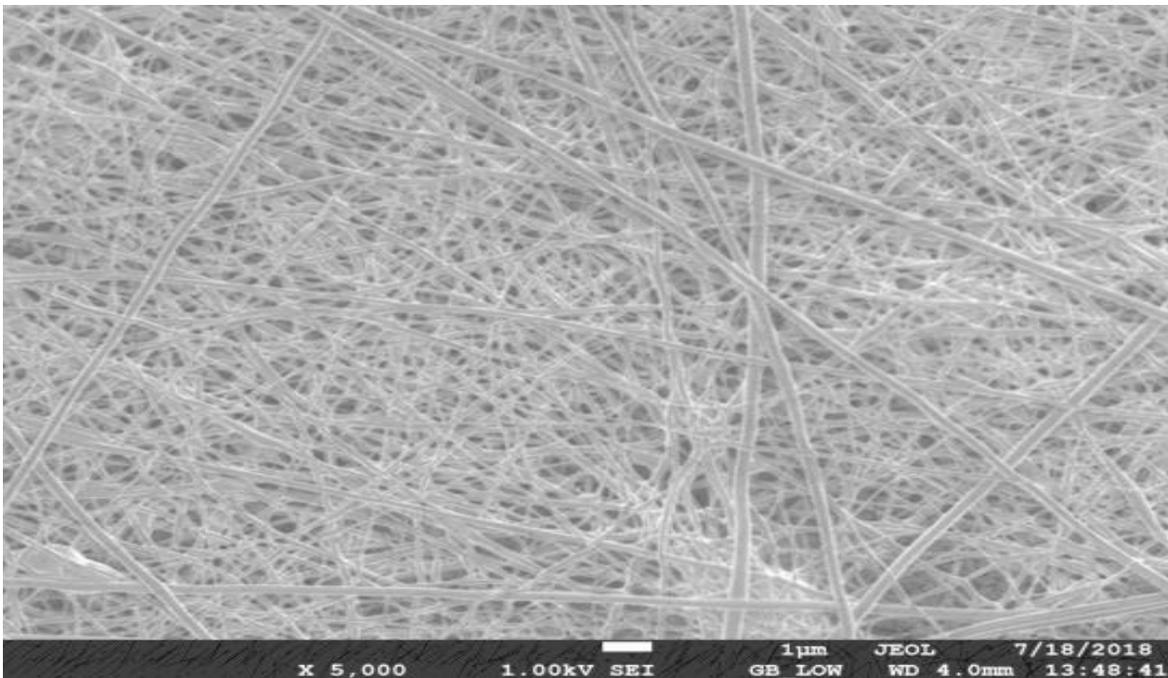
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA

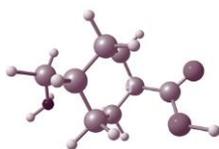


DIPF
POSGRADO
INGENIERÍA

Desarrollo y evaluación de una membrana de nanofibras de colágeno/quitosano para liberación de ácido tranexámico

- TONANTZI PÉREZ MORENO •
 - 05/07/2022 •
 - MAESTRÍA EN CIENCIAS (NANOTECNOLOGÍA) •
-





AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo y comprensión en todo este periodo, por la paciencia y las porras para lograr terminar, por no dejarme rendir, por entender mis sueños y hacerlos suyos.

A mi asesor por la comprensión y apoyo todo el tiempo, por ser un amigo y un excelente jefe. Por el espacio y la oportunidad de aprender en muchos proyectos y escenarios nuevos, gracias por enseñarme que equivocarse no es malo y sobre todo a buscar soluciones.

Al resto de mis sinodales por el apoyo cuando necesite apoyo en equipos y espacio y sobre todo gracias por sus asesorías.

A mis hermanos (Ricardo, Emmanuel y Miguel) por ayudarme a salir de la rutina, por no dejar de creer en mí y tenerme mucha paciencia y nunca dejarme caer.

A mis amigos y amigas (Rosendo Hernández, Azuri Pérez, Ariadna Aldana, Jared Ramos, Guadalupe Fuentes y Mario Garcidueñas) por escucharme siempre en todas las dificultades y logros que tuve durante esta maestría, son un gran apoyo, sin ustedes no lo hubiese logrado.



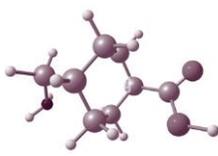


TABLA DE CONTENIDO

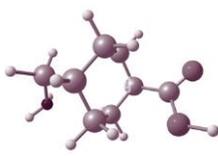
<i>Agradecimientos</i>	1
<i>Tabla de Contenido</i>	2
<i>Índice de Cuadros</i>	5
<i>Índice de Figuras</i>	5
<i>Abreviaturas y Siglas</i>	8
<i>Resumen</i>	11
Palabras Clave	12
<i>Abstract</i>	13
Keywords	14
<i>Introducción</i>	15
<i>Antecedentes</i>	17
Heridas con Lesiones de Trauma	17
Tratamiento de Hemorragias	17
Hemostasia.....	18
Hemostasia Primaria	19
Hemostasia Secundaria	20
Hemostasia Tercera.....	21
Ingeniería de Tejidos	23
Biomateriales	23
Biopolímeros	25
Quitosano	26
Colágeno	28
Nanomedicina	31
Nanofibras.....	32
Liberación de Fármacos.....	32
Ácido Tranexámico.....	33
Electrohilado	35
<i>Hipótesis</i>	38
<i>Objetivos</i>	39





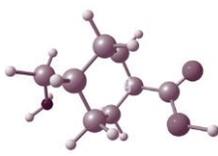
Objetivo General	39
Objetivos Específicos	39
Metodología	40
Síntesis de los Materiales	40
Extracción del Colágeno de Tendón de Bovino.....	40
Síntesis de Nanofibras de Colágeno con Quitosano y Ácido Tranexámico	43
Caracterización de los Materiales	45
Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	45
Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	45
Espectroscopia UV-vis.....	46
Resistencia a la Ruptura (Tensión en la Ruptura)	46
Pruebas de Hinchamiento.....	46
Evaluación Biológica de los Materiales.....	47
Liberación de Ácido Tranexámico en Pruebas <i>in vitro</i>	47
Actividad Antimicrobiana.....	48
Citotoxicidad del Composito por Medio de la Prueba de MTT.	49
Técnica de Rasguño.....	52
Resultados y Discusión	54
Extracción de Colágeno	54
Electrohilado de Polímeros	59
Electrohilado con Ácido Acético.....	60
Disoluciones con Quitosano de Alto Peso Molecular	61
Disoluciones con Quitosano de Medio Peso Molecular.....	64
Electrohilado de Polímeros Adicionando el Fármaco	69
Electrohilado con PBS, Etanol y Ácido Acético	73
Nanofibras Adicionadas con Fármaco.....	77
Entrecruzamiento de Membranas	85
Caracterización Física del composito	86
Tensión en la Ruptura.....	87
Porosidad y Área Superficial	88
Índice de Hinchamiento.....	90
Evaluación Biológica de la membrana	93
Liberación de ácido Tranexámico.....	93
Actividad Antimicrobiana.....	99
Citotoxicidad y Viabilidad celular	102





Conclusiones	108
Perspectivas Futuras	112
Productos Obtenidos	113
Anexos	114
Anexo I: Técnicas de Caracterización	114
Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	114
Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	115
Espectroscopía UV-vis.....	115
Medición de Porosidad por la Técnica de Brunauer, Emmett and Teller (BET)	116
Anexo II: Cultivo Celular	118
Línea Celular OP-9	119
Cultivo de Células	119
Cambio de Cultivo	120
Subcultivo de Células	120
Criopreservación de Células.....	120
Conteo de Células por Hemocitómetro (Cámara de Neubauer)	121
Anexo III: Extracción de Colágeno por Método Enzimático	121
Anexo III: Micrografías de SEM	123
Referencias	125



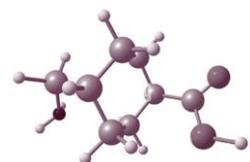


ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Distribución de los tipos de colágeno (modificado de Gelse et al., 2003).....	30
Tabla 2. Numeración de experimentos de extracción.....	56
Tabla 3. parámetros de electrohilado de Q-HMW.....	62
Tabla 4. Parámetros de electrohilado de la solución con Q-MMW.....	64
Tabla 5. Conductividad de soluciones a electrohilar.....	74
Tabla 6. Área superficial y tamaño de poro obtenidos por BET.....	90
Tabla 7. Valores de velocidad de desorción de TXA de la membrana.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de coagulación con factores (modificado de McMichael, 2012).....	20
Figura 2. Molécula de quitosano (ChemSketch 2.0).....	27
Figura 3. Estructura molecular de colágeno fibroso Tipo I (modificado de Szymanska & Winnicka, 2015).....	29
Figura 4. Estructura molecular del ácido tranexámico (modificado de Dowd, n.d.).....	34
Figura 5. Esquema del funcionamiento del electrohilado (modificado de Long et al., 2018).....	37
Figura 6. Acción de la membrana de nanofibras sobre una herida con sangrado (modificado de Madhusudhan et al., 2016).....	38
Figura 7. Mapa de la región que incluye el rastro donde se obtuvieron los tendones de bovino para carne (Obtenido de Google Maps).....	40
Figura 8. Diagrama de extracción de colágeno.....	41
Figura 9. Procedimiento de extracción de colágeno.....	42
Figura 10. Preparación de disoluciones para electrohilado.....	43
Figura 11. Valores utilizados de electrohilado.....	44
Figura 12. Diagrama de evaluación de liberación de ácido tranexámico (Modificado de Huo et al., 2021).....	47



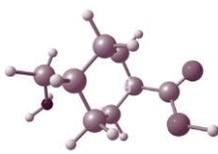


Figura 13. Arreglo de placas de ensayo de viabilidad celular: a) ensayo MTT dosis respuesta de TXA, y b) ensayo MTT prolongado por días para membrana de 40 mg/ml, mientras que c) membrana de 30 mg/ml..... 51

Figura 14. Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT. 52

Figura 15. Esquema de arreglo experimental de técnica de rasguño en placa de 24 pozos. 53

Figura 16. Fotografía de tendones de bovino a) enteros y húmedos, b) rayados después de secarse..... 54

Figura 17. Gráfico ANOVA de experimento 2⁴..... 55

Figura 18. Gráfico de rendimiento de extracción de colágeno. 57

Figura 19. Espectro de FTIR de colágeno extraído. 58

Figura 20. Fotografía de microscopio óptico (a 40X) de la membrana de quitosano-colágeno, datos EXIF: f/1.89, 1/30 e ISO900. 61

Figura 21. Micrografía de nanofibras con 1 % Q-HMW y 40 % C: a) flujo de 0.5 ml/h y b) 0.8 ml/h..... 63

Figura 22. Micrografía SEM de fibras de colágeno y quitosano a 23 kV, 1 ml/h y 10 cm: a) fibras y sus impurezas sobre la membrana (fechas rosas) y entre las fibras (círculos rojos) y b) manchas de impurezas..... 64

Figura 23. Micrografía SEM de nanofibras de 1% Q-MMW, 50 % C, 0.4 ml/h y 10 cm: a) 24 kV y b) 26 kV. 66

Figura 24. Micrografía SEM de 1 % Q-MMW y 50 % C con 26 kV y 0.7 ml/h..... 67

Figura 25. Espectro IR de nanofibras de colágeno y quitosano. 68

Figura 26. Micrografía SEM de nanofibras de colágeno y quitosano con ácido tranexámico. 70

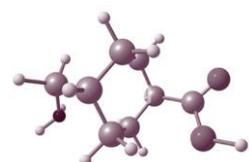
Figura 27. Micrografía SEM de TXA entre las nanofibras de quitosano/colágeno. 71

Figura 28. Espectro IR de Ácido Tranexámico en polvo..... 72

Figura 29. Efecto del ácido tranexámico en la membrana polimérica de colágeno y quitosano..... 73

Figura 30. Distribución de diámetro de fibras, a) micrografía de SEM de membrana de quitosano/colágeno y b) histograma de diámetro de fibras de Q-C..... 75

Figura 31. Espectro infrarrojo de membrana de colágeno-quitosano disueltos en PBS: etanol: ác. acético..... 76



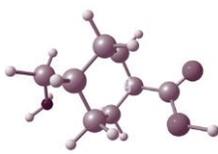


Figura 32. Espectro infrarrojo comparativo de los disolventes utilizados para electrohilado de colágeno-quitosano.....	77
Figura 33. Microscopías de SEM de membranas de colágeno, quitosano y TXA: a) 20 mg/ml, b)30 mg/ml y c)40 mg/ml.....	80
Figura 34. Histogramas de a) nanofibras de la membrana y b) partículas de TXA con concentración de 20 mg/ml.	80
Figura 35. Micrografía de nanofibras de Q_C con 30 mg/ml de TXA.	81
Figura 36. Histogramas de a) nanofibras de la membrana y b) partículas de TXA con concentración de 30 mg/ml.	82
Figura 37. Histogramas de a) nanofibras de la membrana y b) partículas de TXA con concentración de 40 mg/ml.	82
Figura 38. Micrografía de nanofibras con TXA distribuido en las fibras con una concentración de 40 mg/ml.	83
Figura 39. Espectro infrarrojo de interacción del fármaco con los polímeros quitosano y colágeno.	84
Figura 40. Espectro infrarrojo del efecto de luz ultravioleta en la membrana de quitosano-colágeno.	85
Figura 41. Espectros de membranas a diferentes concentraciones de TXA y la membrana de Q_C entrecruzadas con UV y TPP.	86
Figura 42. Tensión a la ruptura de membranas de colágeno_ quitosano.	88
Figura 43. Isotermas de las membranas con TXA (20, 30 y 40 mg/ml) así como quitosano-colágeno.	89
Figura 44. Índice de hinchamiento de las membranas.	92
Figura 45. Curva de calibración de ácido tranexámico.	93
Figura 46. Perfil de liberación de ácido tranexámico de las membranas a tres concentraciones diferentes.....	94
Figura 47. Perfil de liberación de TXA en los primeros 10 min.	95
Figura 48. Modelo cinético Korsmeyer-Peppas de liberación de TXA de la membrana en flujo sanguíneo simulado.	96
Figura 49. Ajuste cinético de exponencial del modelo Korsmeyer-Peppas de liberación de la membrana con: 40 TXA (a), 30 TXA (b) y 20 TXA (c).....	97
Figura 50. Representación visual de liberación y degradación de la membrana.....	99

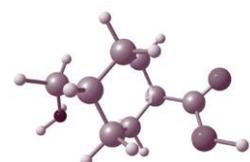




Figura 51. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las membranas Q (quitosano), Q-C (quitosano + colágeno), y membranas de quitosano + colágeno y ácido tranexámico contra *S. aureus* a diferentes tiempos (0, 1 y 3 h)..... 100

Figura 52. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las membranas Q (quitosano), Q-C (quitosano + colágeno), y membranas de quitosano + colágeno y ácido tranexámico contra *E. Coli* a diferentes tiempos (0, 1 y 3 h). 101

Figura 53. Gráfica de viabilidad celular dosis-respuesta de membranas con dosis de 40, 30 y 20 mg/ml contra el control de quitosano-colágeno (Q-C)..... 102

Figura 54. Fotografías de las membranas al terminar la evaluación citotóxica, a) membranas al pasar 4 y 24 h de interacción células-membranas, y b) microscopía óptica de las membranas a las 4 h de evaluación..... 103

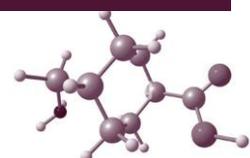
Figura 55. Gráficas de viabilidad celular de las membranas con 30 (a) y 40 (b) mg/ml de TXA, evaluadas a 41, 86, 134 y 182 h..... 105

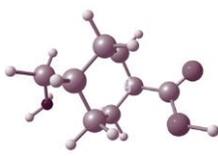
Figura 56. Fotografías de las membranas al terminar la evaluación citotóxica al pasar 86 h de interacción células-membranas, 30 mg/ml TXA (a) y 40 mg/ml TXA (b). 105

Figura 57. Representación visual de adherencia celular en la membrana con ácido tranexámico..... 106

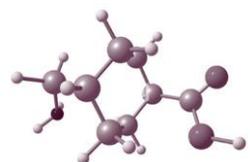
Figura 58. Gráfica de viabilidad celular de la técnica de rasguño (a) y fotografía de membranas después de ser evaluadas a las 96 h de contacto con las células (b). 107

ABREVIATURAS Y SIGLAS





TXA	Ácido Tranexámico
OMS	Organización Mundial de la Salud
RDC	Reanimación de control de daños
VWF	Factor von Willebrand
TF	Factor Tisular
Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor III	Tromboplastina
Factor IV	Ion Calcio
Factor V	Proacelerina
Factor VIII	Factor Christmas
Factor IX	Factor Stuart
Factor X	Activador
Factor XII	Factor Hageman
Factor XIII	Estabilizador de Fibrina
PARs	Receptores activos de proteasa
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Polilactato-co-glicolato
PEO	Óxido polietileno
PLA	Polilactico
PCA	Policraprolactona
kV	kilovoltios
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)- 2,5-difeniltetrazo
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
M	Molaridad
p/V	Peso-Volumen



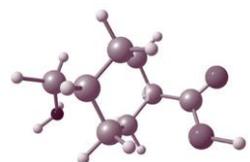


FTIR

RCF

Espectroscopia de Infrarrojo con
Transformada de Fourier

Relative Centrifugal Force



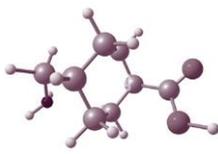


RESUMEN

Las nanofibras biopoliméricas son una pieza clave dentro la de ingeniería de tejidos que han mostrado importantes resultados de adherencia, viabilidad celular y son fuente de nutrientes. Estas membranas sintetizadas por electrohilado permiten aplicarse a diversas heridas en los tejidos, uno de ellos son las paredes de los vasos sanguíneos que son de vital importancia cuidar y recuperar durante un accidente. En este trabajo se utiliza una membrana de nanofibras de colágeno y quitosano sintetizada por medio de electrohilado para promover una rápida coagulación utilizando ácido tranexámico (TXA) como antifibrinilico en una herida como material de primeros auxilios. El colágeno utilizado se extrajo de tendones de bovino por el método de hidrolisis alcalina con un rendimiento de extracción del 50% y por espectroscopia infrarrojo se demostró la presencia de colágeno Tipo I y Tipo V. Posteriormente este colágeno fue disuelto en PBS: etanol, mientras que el quitosano se disolvió en ácido acético para mezclarlas en una relación 4:1; el fármaco utilizado fue disuelto junto con el colágeno.

Las fibras de los polímeros sin el fármaco obtenidas tienen un diámetro de 127 ± 17 nm, mientras que las fibras con una concentración de 40 mg/ml TXA fueron de 375 ± 129 nm en las cuales se encontraron partículas del fármaco (sobre las fibras) con un diámetro de 137 ± 22 nm. Los diagramas de infrarrojo demostraron interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales amino e hidroxilo de los polímeros sin perder la estructura de triple hélice del colágeno, mientras que el TXA se encuentran interaccionando con el grupo amino por medio de su grupo hidroxilo; el índice de hinchamiento de la membrana con fármaco aumento 5 % en comparación con la membrana sola, y esto se encuentra relacionado con las isothermas tipo IV obtenidas por BET muestra un material mesoporoso con histéresis H3 con un poro de 32.40 nm, y un área superficial de $4.49 \text{ m}^2/\text{g}$, con un aumento a $11.16 \text{ m}^2/\text{g}$ al adicionar el fármaco con un poro de 29.18 nm. Estas características e interacción de los polímeros con el fármaco permiten la liberación controlada en flujo sanguíneo simulado.

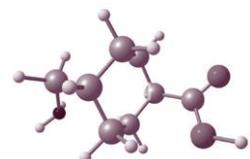


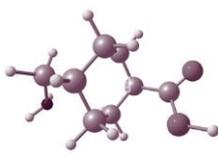


Adicionalmente, las evaluaciones biológicas demostraron que el composito obtenido tiene una actividad antibacteriana mayor al 70% con bacterias Gram negativas y positivas desde el tiempo cero y del 100 % a las 3 h; mientras que los cultivos celulares demostraron viabilidades mayores al 150%, retención y adherencia celular de fibroblastos que pueden moverse a estar sobre y entre la membrana para continuar con sus funciones fisiológicas, debido al flujo de desechos y nutrientes por los poros interconectados entre las fibras.

PALABRAS CLAVE

Colágeno, Quitosano, Electrohilado, Coagulación.



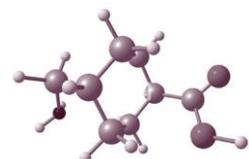


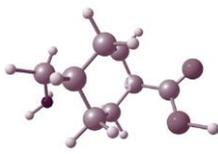
ABSTRACT

Biopolymeric nanofibers are a crucial part of tissue engineering that have shown important results in adherence, and cell capacity and nutrient's source. These membranes synthesized by electrospinning allow to apply to different wounds in tissues, one of them is the walls of the blood vessels that are of vital importance to care for and recover during an accident. In this work, a collagen and chitosan nanofiber membrane synthesized by electrospinning is used to promote accelerated coagulation using tranexamic acid (TXA) as an antifibrinolytic as a first-aid material. Collagen was extracted from bovine tendons by the same hydrolysis with an extraction yield of 40% and the presence of Type I and Type V collagen was covered by infrared spectroscopy. Subsequently, this collagen was dissolved in PBS: ethanol, while chitosan was dissolved in acetic acid to mix them in a 4:1 ratio; the drug used was dissolved together with the collagen.

The fibers of the polymers without the drug obtained have an average diameter of 127 ± 17 nm while the fibers with a concentration of 40 mg/ml TXA were around 375 ± 129 nm, meanwhile the drug particle size was 137 ± 22 nm and were distributed throughout the fibers. The infrared spectrum demonstrates electrostatic interactions between the amino and hydroxyl functional groups of the polymers without losing the triple helix structure of collagen, while TXA was assigned into interacting through of hydroxyl group with the amino group; the swelling index of the membrane with the drug increased 5% compared to purely membrane, and this is related to the type IV isotherms obtained by BET shows a mesoporous material with a pore of 32.40 nm and a surface area of 4.49 m²/g, with an increase to 11.16 m²/g when TXA was adding and the pore was of 29.18 nm. These characteristics and interaction of the polymers with the drug could allow controlled release in simulated blood flow and promote fibroblast cell adhesion.

Additionally, the biological evaluations showed that the compound obtained has an antibacterial activity greater than 70% with Gram-negative and positive bacteria from time zero and 100% at 3 h; While viability greater than 150% was shown in

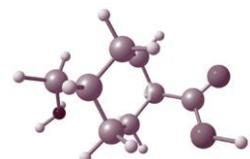


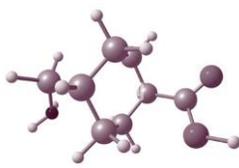


cell culture, retention and cell adhesion were observed by fibroblasts that can move on the surface to between the membrane and continue their physiological functions, due to the flow of waste and nutrients through the interconnected pores between the fibers.

KEYWORDS

Chitosan, Collagen, Electrospinning, Coagulation.





INTRODUCCIÓN

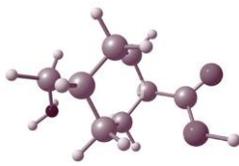
Los biomateriales son un elemento importante dentro de la ingeniería de tejidos debido a la posibilidad de recuperar tejidos dañados, como los que ocurren en accidentes donde existan sangrados masivos; además de mejorar su respuesta. Esta rama de la ciencia hace uso de los biomateriales para mejorar su respuesta dentro del organismo, otorgando mayor biocompatibilidad, bioinercia o biotolerancia.(Vasco et al., 2016)

Para perfeccionar estos biomateriales se han incorporado nuevas tecnologías, una de ellas es la nanociencia, debido a las propiedades que un nanomaterial integra al producto final.(Hosseinkhani, 2019) La unión de estas ciencias se conoce como nanomedicina, la cual aprovecha que los materiales pueden adquirir una mayor área superficial, facilitar la formación de sistemas biomiméticos, la transmisión de nutrientes así como de residuos extracelulares, proporcionar un sistema de andameaje para un mejor arreglo en el crecimiento celular, mejor especificidad y facilidad al penetrar diferentes tejidos.(Giersig & Khomutov, 2008)

Se ha buscado aplicar estos nanomateriales a tratamientos de heridas en la piel o diversos tejidos que contengan una lesión con un sangrado masivo con el cual pueden perder la vida muchos pacientes. Estos sangrados reciben el nombre de hemorragia, que es una extravasación de sangre desde los vasos al espacio extravascular. 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.(Híjar-Medina, 2014) 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.

Las lesiones en los tejidos sanguíneos tienen como base de tratamiento el principio de control de la hemorragia mediante la prevención de 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.

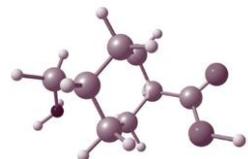




Introducción

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. Es por lo que se vuelve de gran importancia seguir mejorando los materiales coagulantes que pueda promover una rápida y mejor coagulación; debido al efecto antifibrinolítico de algunos fármacos, y a las propiedades mecánicas, de biocompatibilidad y antibacterianas de ciertos polímeros, se puede crear un biomaterial que podría actuar como una barrera física para la lesión y que tenga actividad bioquímica sobre el proceso de hemostasia. Además, que sea de bajo costo, sustentable y biodegradable; debido a que los productos actuales consideran disolventes que aun siendo de grado biológico pueden presentar citotoxicidad perdiendo viabilidad de fabricación para lograr un alto costo-beneficio, y, por ende, una alta biocompatibilidad.

Este trabajo de investigación pretende obtener una membrana de nanofibras de colágeno/quitosano con la capacidad de liberar ácido tranexámico mediante la técnica de electrohilado, que pueda intervenir en el proceso hemostático.





ANTECEDENTES

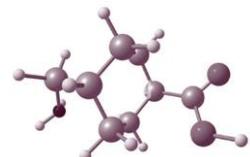
HERIDAS CON LESIONES DE TRAUMA

Un trauma es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como aquel evento o acontecimiento fortuito, por lo general dañinos, independientemente de la voluntad humana, provocados por una fuerza exterior que actúa con rapidez y que se manifiesta por medio un daño corporal o mental.(Peden, 2004) A nivel mundial alrededor de un tercio de las muertes por trauma se deben a sangrados masivos que ocurren durante las primeras 24 horas tras el accidente;(Alberdi et al., 2014; OPS/OMS | Ácido Traxenámico En Pacientes de Trauma, n.d.) mientras que en México el 40% de las muertes por trauma se deben a sangrados (En et al., n.d.; Manuel et al., 2016).

Estos sangrados reciben el nombre de hemorragia, que es una extravasación de sangre desde los vasos al 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.(Híjar-Medina, 2014)

La hemorragia es la mayor causa de muertes que ocurren antes de que los pacientes lleguen al hospital (56%) y es la responsable del 80 % de estas muertes tempranas una vez dentro del hospital (Mejia-Mantilla et al., 2009) en perioperatorio o postoperatorio,(Adriana Denise Zepeda-Mendoza & Carrillo-Esper, 2014a) por lo cual se vuelve muy importante el tratamiento y control de la herida.

TRATAMIENTO DE HEMORRAGIAS



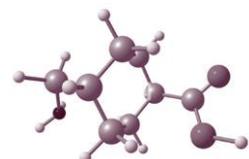


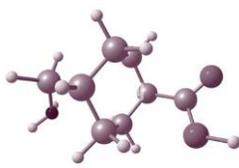
Los tratamientos que actualmente se llevan a cabo involucran el control de la hemorragia producida por un sangrado masivo, prevenir su contaminación e inmovilizar la parte afectada. Esto puede lograrse con técnicas de vendaje y colocación de férulas temporales del segmento lesionado, lo que alivia el dolor y facilita el transporte (Híjar-Medina, 2014). Sin embargo, los tratamientos típicos tienen dos mecanismos: el primero es físico, que previene la pérdida de sangre; y la segunda que contiene agentes coagulantes que pueden promover la adsorción de agua y los demás elementos de la sangre durante una herida o promover una respuesta intrínseca en la cascada de coagulación (Kheirabadi, 2011).

Estos materiales tópicos se dividen en agentes activos y pasivos: los agentes activos tienen como fin participar en la cascada de coagulación para formar el coagulo de sangre, estos materiales contienen fibrinógeno, fibrina o trombina porque son los más efectivos; y algunos también son conocidos como adhesivos, que son líquidos que polimerizan en pocos segundos formando un sólido que los vuelve agentes efectivos como tópico, pero no para uso interno por su potencial toxicidad. Mientras que los agentes pasivos participan permitiendo la adhesión, agregación plaquetaria y pueden adsorber los fluidos de la herida por un tiempo, por lo que actualmente se utiliza colágeno, gelatina o celulosa (Emilia et al., 2011).

Por otro lado, existe la desarrollada reanimación con control de daños (RCD), el cual busca minimizar el sangrado, prevenir la coagulopatía y evitar disfunciones orgánicas;(Adriana Denise Zepeda-Mendoza & Carrillo-Esper, 2014b) se basa en el control del sangrado y contención por medio de cirugía, las reconstrucciones definitivas se realizan una vez que el paciente sea estabilizado y haya recuperado su homeostasis. Pero no existe un producto que contenga ambos procedimientos, tanto una barrera física como una respuesta química al proceso hemostático, que sea fácil de usar, biodegradable y cumpla con los requisitos para ser un biomaterial aplicable por vía tópica.

HEMOSTASIA





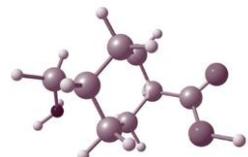
El proceso de hemostasia permite que un organismo cierre una ruptura en los vasos sanguíneos. Este proceso conlleva varias etapas que permiten recuperar un flujo continuo de la sangre y remover los coágulos de sangre una vez restaurada la integridad vascular.

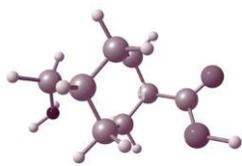
La hemostasia se divide en tres etapas: (Versteeg et al., 2013) la hemostasia primera involucra la adhesión plaquetaria; la secundaria es la agregación plaquetaria también conocida como coagulación; y la hemostasia terciaria, donde se remueve el coagulo. Para llegar a la coagulación existen dos diferentes cascadas de señalización: la vía intrínseca, en la cual todos los componentes se encuentran en la sangre; mientras que en la vía extrínseca se requiere de un factor externo.

El proceso hemostático involucra varios factores de plasmáticos (14 factores), a las plaquetas y a los factores vasculares (pared celular, endotelio y subendotelio), estos factores son generados por el hígado excepto por el factor de von Willerbrand, el cual es posible que se produzca en células endoteliales y megacariocitos (Mari et al., 2008).

HEMOSTASIA PRIMARIA

La hemostasia primaria involucra a la fase de iniciación que está relacionada con la vía extrínseca, debido a la activación de pocos factores de coagulación, en esta fase se lleva a cabo la ruptura vascular donde las células subendoteliales de los músculos y los fibroblastos son expuestas. En esta etapa las plaquetas se adhieren al sitio de la lesión, a través del Factor von Willebrand (VWF) al colágeno, el cual a su vez interacciona con la glicoproteína Factor VI (Versteeg et al., 2013). Lo que provoca el inicio de la cascada de señalización del Factor Tisular (TF) al Factor VII de coagulación para promover proteólisis y activar el Factor VIIa.





Antecedentes - Heridas con lesiones de trauma

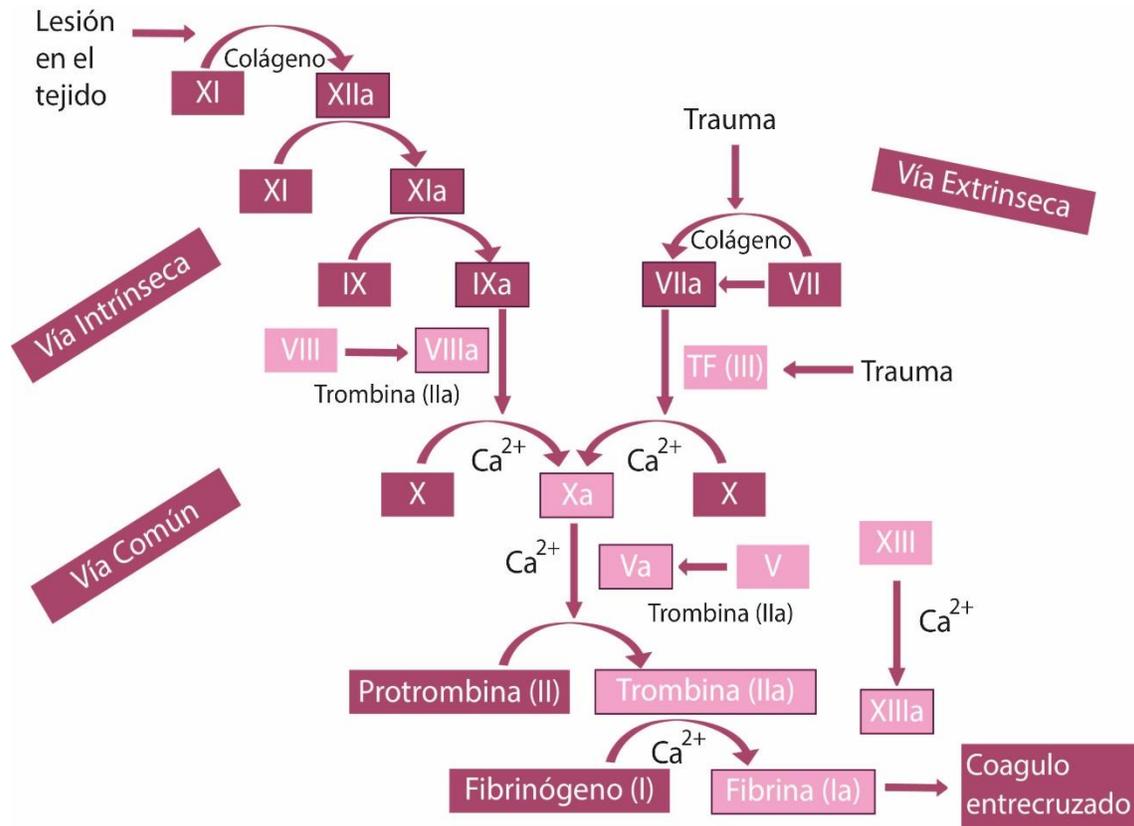


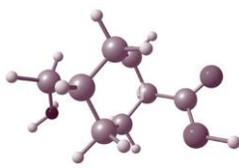
Figura 1. Proceso de coagulación con factores (modificado de McMichael, 2012).

Posteriormente como se observa en la Figura 1 se forma el complejo Factor TF/VIIa para convertir al Factor IX y X a IXa y Xa respectivamente; el Factor IXa se asocia con las plaquetas, mientras que el Factor Xa se asocia con Va para convertir la protrombina (Factor II) a trombina. La trombina se forma en pericitos y puede promover la formación local pero no lo suficiente para promover la hemostasia en la herida (Monroe, 2010).

La fase de iniciación conta solamente de iniciar la producción de trombina antes de neutralizarla rápidamente al Factor Xa, ya en el proceso de propagación se obtiene trombina suficiente para la coagulación completa.

HEMOSTASIA SECUNDARIA





En esta etapa la trombina permite amplificar el coagulo de plaquetas y proteína. La trombina interactúa con la glicoproteína Factor Ib que se encuentra en las plaquetas; además cambia su estructura conformacional para modificar la actividad de la proteína y evitar su inhibición, así como unir dos plaquetas por medio de los receptores activados de proteasa (PARs). En esta etapa las plaquetas cambian su citoesqueleto y se consideran que están activadas porque son requeridas en el sitio dañado para proveer la superficie fosfolipídica para el anclaje de los factores necesarios.(McMichael, 2012)

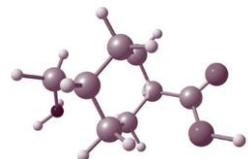
Por otro lado, el factor VWF se enlace a la glicoproteína Ib, el cual a su vez permite que se una el Factor VIII a la misma. A partir de aquí comienza la amplificación de las plaquetas activadas que tiene enlazados los cofactores Factor Va y VIIIa en la superficie.

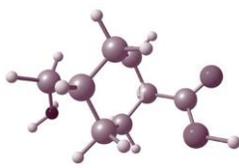
HEMOSTASIA TERCERA

El factor IXa que se forma durante la fase de iniciación se une a las plaquetas activadas. El factor complejo IXa/VIIIa activa al factor X en la superficie de la plaqueta, para que a su vez Xa se una al factor Va para formar un complejo en la superficie.(Monroe, 2010)

En la presencia de protombina el factor Xa se protege con la inhibición de antitrombina, a su vez el factor Xa activa el cofactor VIIa/factor tisular. Que promueve que la protrombinasa active la protrombina a trombina, a su vez genera una activan la formación del coagulo con fibrina (Bevan & Sørensen, 2011).

La aparición de trombina durante la fase de propagación permite la unión de fibrinopeptidos con fibrinógeno, lo que provoca la aparición de nuevos sitios que son complementarios a los sitios de las moléculas de fibrina. Estas interacciones provocan que la fibrina se ensamble en cadenas largas y ramificadas en los receptores glicoprotéicos IIb/IIIa de las plaquetas, con eso se obtiene un coagulo más consolidado (Campbell, 2020).

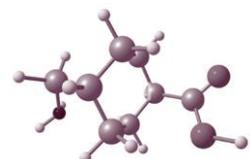




Los altos niveles de trombina generada en la fase de propagación están unidos a la fibrina y cuando se unen están protegidos por inhibición con antitrombina, esta unión provoca que se mantenga el proceso de hemostasis. (Monroe, 2010)

Por último, ocurre la fibrinólisis, es un proceso esencial en la disolución del coágulo en la reparación de un tejido dañado. En esta etapa es muy importante la fibrina como cofactor para una óptima función. El plasminógeno sintetizado en el riñón se transforma a plasmina, y el plasminógeno activado se une a la fibrina. Aquí ocurre la degradación de la fibrina en fragmentos correspondientes a conjunto de productos de degradación del fibrinógeno. (Versteeg et al., 2013)

Es por lo que se utilizan anticoagulantes cuando se extrae sangre y se almacena en tubos o jeringas, ya que la sangre coagula lento en plástico, un poco más rápido en vidrio y mucho más rápido sobre una superficie cargada negativamente. (McMichael, 2012).





INGENIERÍA DE TEJIDOS

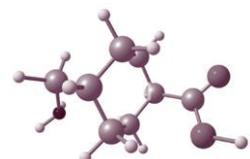
La ingeniería de tejidos da un enfoque científico al tratamiento de heridas se basa en utilizar sustitutos biológicos para reparar el órgano dañado; tiene tres componentes importantes por igual: las células, factores de crecimiento y un andamio. Este último, sirve como soporte de los otros dos componentes, además permite la penetración celular dependiendo de su morfología, y promueve la proliferación y diferenciación celular para formar un nuevo tejido u órgano. (Gandhimathi et al., 2014)

Para aplicar la regeneración de un tejido se debe tomar en cuenta que los tejidos complejos dañados involucran diversos pasos: como la inflamación de las células, la formación de colágeno, acción de la citocina, deposición de la matriz extracelular y la reorganización con la aparición de una cicatriz. Podemos considerar que el material ideal para tratamiento de una herida debería actuar contra la infección, permitir el flujo de gases con el ambiente, absorber flujo sanguíneos o líquidos de la herida y debe promover la proliferación y migración celular.(Weng & Xie, 2015):

BIOMATERIALES

Los materiales que se utilizan como parches o injertos en los tratamientos de hemorragias deben ser materiales biocompatibles, de no ser así pueden provocar la inflamación y calcificación de esa zona dañada que puede hacer fallar todo el proceso de recuperación.

Otra característica que deben tener es ser biodegradables con una velocidad óptima, si es muy rápida solo de deformara el material y si es muy lento la proliferación e integración celular puede no ocurrir.(Islam et al., 2020)



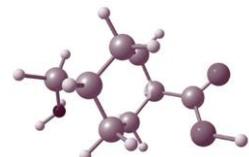


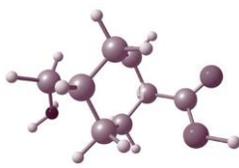
Existen diferentes biomateriales como son los bioelementos, biocerámicos, biopolímeros, material biológico y los compositos de todos los mencionados que se utilizan en infinidad de formas como tratamientos para cualquier lesión de un organismo; actualmente los materiales más utilizados son biopolímeros por sí solos o en mezcla (Love, 2017).

Dentro de los biomateriales que se han trabajado con este fin, encontramos matrices de fibrina, un polímero natural que promueve la hemostasia mediante la contracción de la herida (Krishnan et al., 2004). Otro de los biomateriales ampliamente utilizados es el quitosano como promotor de la aceleración de sanar heridas, ya sea por sí solo o en mezcla con otros polímeros como puede ser la heparina (Kweon et al., 2003) para mejorar la activación de las proteínas del plasma que tienen actividad antitrombótica; esponjas con colágeno (X. H. Wang et al., 2003) debido a la biocompatibilidad y morfología fibrosa que influye en el crecimiento fisiológico de las células; junto con polietilenglicol (PEG) que permite mejorar su adhesión a los tejidos dañados y promueve una rápida formación de la dermis (Lih et al., 2012). Otro biomaterial utilizado en los compositos es el alginato, para aumentar la capacidad de absorción del hidrogel, así como de adhesión celular (US5836970A - Hemostatic Wound Dressing - Google Patents, n.d.).

Como agente tópico se utiliza además celulosa por ser un hidrogel biodegradable que no tiene riesgos inmunológicos y su actividad antibacterial, y se aplica en cirugías generales junto con otros adhesivos, como el cianocrilato para unir heridas de piel o zonas que no pueden ser suturadas. Estos agentes son utilizados como películas o polvos y en su mayoría contienen además como ingredientes activos fibrinógeno y trombina extraída de humanos o bovinos (Emilia et al., 2011).

Por otro lado, se han realizado estudios con una morfología de fibras debido a los efectos de adhesión y flujo de compuestos biológicos, se han trabajado andamios que están conformados con nanofibras poliméricas como son de polilactato-co-glicolato (PLGA) (H. Wang et al., 2013), colágeno con óxido de polietileno (PEO) que permite la obtención de fibras (Huang et al., 2001), nanofibras de celulosa junto con nanopartículas de plata, que demostraron un balance de fluidos en las heridas y alta





biocompatibilidad(R. Liu et al., 2018). Algunos de estos andamios contienen fármacos o factores antimicrobianos que promuevan la aceleración hemostática, así como prevenir de infecciones bacterianas. Así mismo, se han trabajado con nanofibras de fibrinógeno, quitosano, gelatina, ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL) y compositos de estos polímeros ya mencionados(Nakielski & Pierini, 2019).

Sin embargo, los productos obtenidos consideran disolventes que aun siendo de grado biológico pueden presentar citotoxicidad; en la búsqueda de alta biocompatibilidad se pierde viabilidad de fabricación para lograr un alto costo-beneficio, que promueva alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y pueda promover una respuesta física y bioquímica al proceso hemostático.

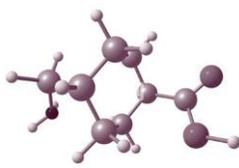
BIOPOLÍMEROS

Existen biopolímeros naturales o sintéticos, que son los materiales más utilizados para ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad y en muchos casos la biodegradabilidad.

Los biopolímeros naturales son los más utilizados debido a su menor toxicidad y a la bioactividad comparado con los polímeros sintéticos; estos polímeros tienen una actividad biológica o pueden provocar una. Para incrementar las propiedades de los biopolímeros o disminuir algunos riesgos de degradación incontrolada, propiedades mecánicas, resistencia al ambiente se busca mezclar los biopolímeros para generar compositos con propiedades superiores(Love, 2017).

Una ventaja más de los biopolímeros es su posibilidad de generar diferentes estructuras y tamaños, estos permiten aumentar la interacción de las células lo que se refleja en una buena respuesta de viabilidad celular. Dentro de las morfologías encontramos películas delgadas, hidrogeles, membranas, partículas por mencionar algunos(Kannan et al., 2022; Rohani Shirvan et al., 2021).





Para generar los compositos y las diferentes estructuras mencionadas existen una lista grande de biopolímeros, tanto naturales como sintéticos, por mencionar algunos tenemos al quitosano, colágeno, gelatin, alginato, fibrina, hidroxiapatita, ácido hialurónico, polietilenglicol, entre otros (Tang et al., 2014). Cada uno de estos tienen diferentes propiedades tanto físicas como químicas donde se tiene que considerar la aplicación para realizar la selección de biomateriales.

QUITOSANO

El quitosano es un copolímero policatiónico, compuesto de glucosamina y N-acetilglucosamina con enlaces glicosídicos β -(1,4), el cual se obtiene del esqueleto de crustáceos, insectos u hongos. (Szymańska & Winnicka, 2015) Es un polímero natural biodegradable por enzimas, que lo transforman a componentes básicos no tóxicos; una de las enzimas que degradan al quitosano es la lisozima, que se encuentra en los tejidos de mamíferos y produce oligosacáridos no tóxicos que después se incorporan a glicoproteínas.

El quitosano es higroscópico por naturaleza, tiene una alta capacidad para formar puentes de hidrógeno, los cuales se forman con los grupos amino e hidroxilo (Figura 2). La cantidad de agua absorbida depende de la concentración, de la temperatura y la humedad relativa; (Szymańska & Winnicka, 2015) es por lo que se recomienda medir la cantidad de agua que los materiales con quitosano pueden contener, el método más utilizado es la humedad.



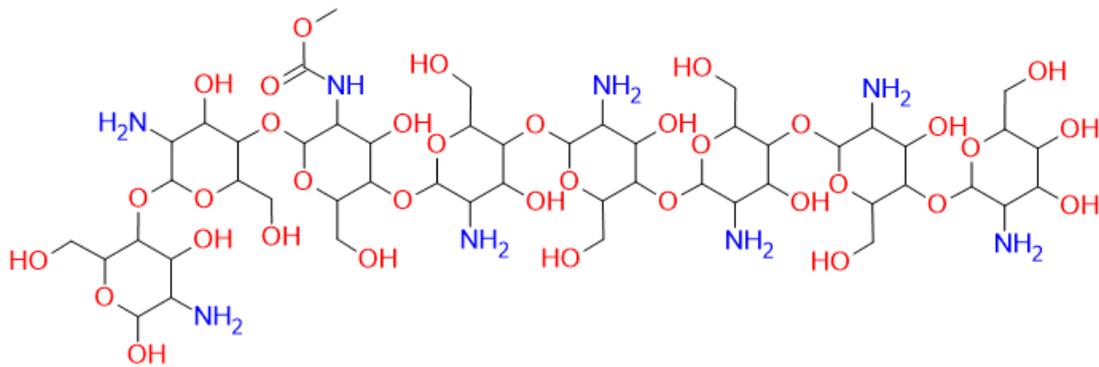
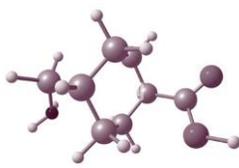
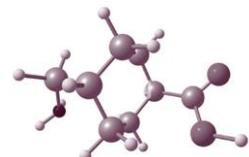


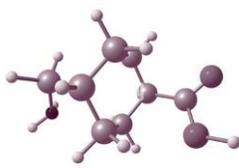
Figura 2. Molécula de quitosano (ChemSketch 2.0).

Los ácidos son mayormente utilizados como disolventes para este biopolímero, entre ellos el ácido acético, láctico, clorhídrico y tricloroacético (Jayakumar et al., 2010) siendo el primero el más común, en diferentes concentraciones ya que afecta la velocidad de degradación.

Para incrementar la estabilidad del quitosano se mezcla con otros polímeros, ya sean naturales o sintéticos como han sido polivinilo alcohol, óxido de polietileno, colágeno, por mencionar algunos. Otro método de estabilización es entrecruzar el biopolímero, puede ser químicamente con el cual se producen enlaces covalentes utilizando glutaraldehído o glioxal. Sin embargo, estos compuestos modifican las propiedades biológicas del quitosano y limita su aplicación biomédica. El entrecruzamiento físico, es producido por interacciones iónicas, entre las cargas positivas de las cadenas de quitosano y un componente con carga negativa; pueden ser aniones como citratos o sulfatos, o moléculas iónicas como cadenas con grupos fosfatos, colesterol, y otras proteínas (Pita-López et al., 2021).

El quitosano ha demostrado buenos resultados en ingeniería de tejidos por su bioactividad en tejidos como la piel, huesos, cartílago y vasos sanguíneos, y ha sido utilizado como tratamiento de heridas debido a que promueve la generación de trombina y la activación de las plaquetas; esto se debe a que la matriz extracelular de los tejidos sanguíneos está





hecha de glucosaminoglicanos los cuales tienen una estructura similar al del quitosano.(Islam et al., 2020)

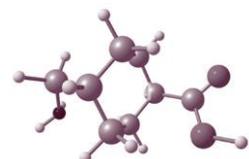
Adicionalmente a las propiedades mencionadas el quitosano es inerte, no toxico, tiene alta afinidad a proteínas, propiedades intrínsecas de actividad antibacterial, se puede transformar en diversas formas, permite encapsular o acarrear fármacos, puede generar estructuras con poros interconectados, tiene la habilidad de generar interacciones electrostáticas con especies negativas(Qu & Luo, 2020).

COLÁGENO

Otro más de los biopolímeros utilizados en la industria de los biomateriales es el colágeno, es utilizado desde hace tiempo en los parches y férulas para reducir la pérdida de sangre, y por eso mismo es utilizado en el desarrollo de nuevos materiales.

El colágeno es un polisacárido natural en todos los seres humanos del reino animal ya que existen más de 20 tipos de colágeno que pueden ser utilizados de forma estructural o en procesos fisiológicos. El colágeno es el mayor elemento estructural, el cual debido a su estructura fibrilar contribuye como soporte extracelular para dar estabilidad a los tejidos y los órganos para mantener integridad (Gelse et al., 2003).

Todos los tipos de colágeno contienen un dominio con receptores de un tripéptido rico en prolina Gly-X-Y, donde X y Y dependen del tipo de colágeno y son los encargados de la formación de la triple hélice. Por eso mismo, los colágenos se pueden agrupar en los colágenos formados de fibras, los asociados a fibras, formadores de redes, fibras de anclaje transmembranas de colágeno, membranas de base colágeno y otros con funciones únicas(Rezvani Ghomi et al., 2021). En la Tabla 1 se muestra la distribución de algunos tipos de colágenos.



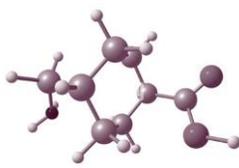
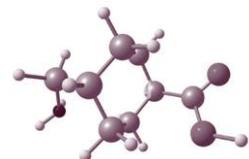
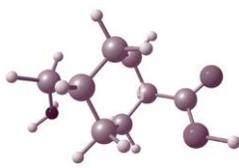


Tabla 1. Distribución de los tipos de colágeno (modificado de Gelse et al., 2003).

Tipo	Composición molecular	Tejido
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Huesos, dermis, tendón, ligamentos, cornea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartílago, cuerpo vitreo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Piel, paredes de vaso, fibras reticulares de hígado, riñones, entre otros
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	Riñones, cornea, huesos, membrana fetal; se encuentra junto al tipo I
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$	Cartílago, cuerpo vitreo
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Piel, epidermis, mucosa oral, cerviz
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	Cartílago, cornea
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Dermis, tendón, pared vascular, placenta
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	Pared de los vasos sanguíneos
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	Fibroblastos, páncreas, células de músculos
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	Fibroblastos, queratinocitos

polipeptídica repite la estructura Gly-X-Y. Donde X y Y se ocupen mayormente por prolina e hidroxiprolina respectivamente y en algunos casos por lisina; la 4 hidroxiprolina es esencial por la formación de interacciones intermoleculares de hidrogeno y son





los que contribuyen con la estabilidad de la conformación de triple hélice. El dominio de la triple hélice de colágeno (tipo I, II y III) tiene una longitud de 300 nm a los cuales corresponde alrededor de 1000 aminoácidos (Radhakrishnan et al., 2020; Rezvani Ghomi et al., 2021).

El colágeno tiene propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad y biofuncionalidad que le brindan adherencia y viabilidad celular, lo que lo hace un biomaterial investigado en ingeniería de tejidos y en el área médica.

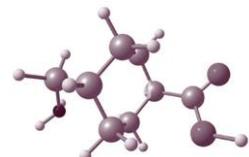
Por otro lado, el colágeno puede ser extraído de fuentes naturales como tendones, patas de pollo o colas de rata, pero también puede ser sintético. Existen diferentes procesos de extracción del colágeno como es el método de hidrólisis alcalina (Mamani Huamán, 2018) o por el método enzimático, el cual utiliza pepsina y en conjunto se lleva a cabo purificación con sales, que dependen del tipo de colágeno a precipitar (Trelstad et al., 1976).

NANOMEDICINA

La nanomedicina es definida como el uso de nanomateriales para diagnóstico, monitoreo, control, prevención y tratamiento de enfermedades (Soares et al., 2018)

Para considerar que es nanomedicina, el material utilizado debe tener al menos un componente en escala nanométrica. Un nanomaterial ofrece una alteración en la farmacocinética, ya sea en la absorción, distribución, metabolismo y eliminación; se facilita el cruce de las barreras biológicas y disminuye las propiedades tóxicas (Nanomedicine | Definition, Research, & Applications | Britannica, n.d.).

Dependiendo de la aplicación que se desea hay diferentes materiales que se utilizan como son los diferentes biopolímeros, materiales con base carbono, silicio o con metales; y con diferentes morfologías que permiten cambiar el tamaño, el área superficial y algunas propiedades físicas y químicas de estos materiales (Adabi et al., 2017).





Los nanomateriales que se utilizan en el ámbito biomédico pueden ser en regeneración de tejidos y liberación de fármacos, como método de imagen o cuantitativos para detección de enfermedades, modificación de la superficie de materiales o nanodispositivos implantados que ayuden a tratar diversas enfermedades haciendo uso de las propiedades de los nanomateriales (Webster, 2006).

NANOFIBRAS

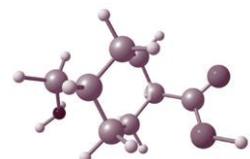
Dentro de las diferentes estructuras que puede tener un nanobiomaterial para ser aplicado a la ingeniería de tejidos se encuentran las nanofibras, las cuales nos permiten obtener un arreglo celular ordenado además brindan la posibilidad de transportar nutrientes y desechos celulares;(Kingsley et al., 2013) además, permiten la migración y movimiento de las células para infiltrarse en la membrana, lo que puede facilitar la liberación de fármacos y transferencia de masa.

Para sintetizar las nanofibras se utilizan diversos polímeros, ya sea naturales o sintéticos, como se menciona con anterioridad en el capítulo.

Dependiendo del material del que estén hechas las nanofibras se puede tener una superficie bioactiva que permita generar un ambiente mimético de la matriz extracelular(Weng & Xie, 2015)

Existen diversas técnicas para desarrollar micro y nanofibras como son la separación de fases, síntesis de plantilla, extrusión por soplado en caliente, impresión 3D(C. Wang et al., 2019), sin embargo, el electrohilado permite obtener nanofibras por su posibilidad de ajuste de parámetros(Dahlin et al., 2011).

LIBERACIÓN DE FÁRMACOS





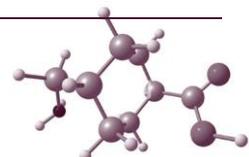
La aplicación de fármacos en zonas específicas se busca como alternativa a dosificar e incorporar un medicamento más personalizado. Con nanotecnología se busca hacer más específica la liberación de fármacos, ya que el tamaño del material permite una mejor interacción con las células ya sea de manera externa o interna; esto debido a que las nanopartículas pueden penetrar la membrana extracelular, una vez endocitadas se libera la formulación o en algunos casos los trozos de ADN o ARN dentro de la célula y lleva a cabo su acción (Kajdič et al., 2019).

Además, pueden utilizarse otras estructuras (nanoesponjas, membranas de nanofibras, por mencionar algunas) que le permiten interaccionar de manera externa con las células para que estas se adhieran al material, lo degraden y se libere el fármaco que logra entrar por sí solo (Luraghi et al., 2021).

Una ventaja de una liberación controlada es incorporar dosis menores, debido a que pueden incorporarse en la zona de daño lo que puede disminuir la pérdida del fármaco en lo que llega a la zona requerida, y por ende la bioacumulación y desecho es un proceso menos tardado.

Esta liberación se puede incorporar a ingeniería de tejidos con diferentes fármacos, los cuales dependerán de la aplicación que se desea, ya que se pueden incorporar los fármacos utilizados comúnmente (Gorain et al., 2022). En el caso del tratamiento de heridas con sangrados, no existe un fármaco utilizado en el momento del accidente, sin embargo, durante cirugías y postcirugías se utiliza el ácido tranexámico o el ácido aminocaproico (Ockerman et al., 2021) para disminuir la transfusión de sangre y disminuir la pérdida sanguínea.

ÁCIDO TRANEXÁMICO





Algunas de las investigaciones en este tipo de tratamientos han buscado la incorporación de diferentes agentes, por ejemplo, el ácido tranexámico (TXA, un antihemorrágico) el cual es un compuesto antifibrinolítico que actúa como un potente inhibidor competitivo de la activación del plasminógeno a plasmina; en concentraciones mucho más altas es un inhibidor no competitivo de la plasmina. Diferentes estudios han reportado que la aplicación local de TXA reduce significativamente la pérdida de sangre y el decremento de hemoglobina (Zareh et al., 2016; Zhong et al., 2019).

El TXA es un análogo a la lisina sintética como se observa en la Figura 4, y es ampliamente utilizado como prevención de un sangrado perioperativo. Es un tratamiento que lleva utilizándose para hiperfibrinólisis desde los años 60; el ácido tranexámico es mayormente administrado por vía parenteral e intravenosa, y se difunde lentamente hacia el interior celular y el líquido cefalorraquídeo; es distribuido a través de todos los tejidos del cuerpo y su vida promedio en el plasma es de 120 min; después de la aplicación se encuentran altos los niveles TXA en el hígado, riñones y pulmones, y es mayormente eliminado por el sistema renal. Diferentes estudios confirman que es metabolizado en el riñón en un 95 % (Pabinger et al., 2017).

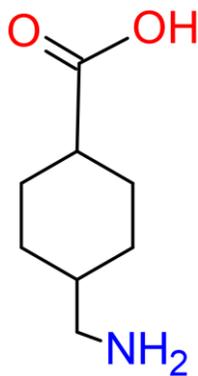
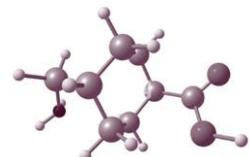
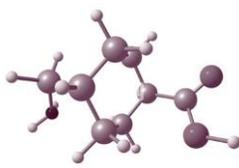


Figura 4. Estructura molecular del ácido tranexámico (modificado de Dowd, n.d.)





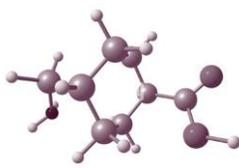
Ha sido reportado que el TXA aplicado de manera tópica se mantiene efectivo a bajas y alta concentraciones, además no incrementa el riesgo de provocar trombosis, ya que resulta en una reducción del 90% en la concentración del plasma comparado con la aplicación intravenosa (Montroy et al., 2018; Roberts et al., 2012), y la reducción de transfusión de sangre del 45% (Evaniew & Bhandari, 1999; Teoh et al., 2021). Y se ha demostrado además que la administración del fármaco aumenta la supervivencia de las personas con un trauma severo, además de disminuir la pérdida sanguínea en cirugías cardíacas.

Diversos estudios clínicos han reportado concentraciones de 1-100 mg/ml obteniendo resultados sin diferencia significativa entre rango, sin embargo K. Ausen demostró disminución del 39% con una dosis de 25 mg/ml (Ausen et al., 2015), mientras que Sasmal utilizan una concentración de 40 mg/ml distribuido en una membrana de quitosano (Sasmal & Datta, 2019).

ELECTROHILADO

La técnica de electrohilado permite la obtención de fibras que pueden tener una dimensión en micras y hasta nanómetros, funciona mediante la aplicación de un alto voltaje a una solución viscoelástica polimérica (de magnitudes de hasta 30 KV) para generar un campo eléctrico entre la punta de la jeringa donde se encuentra la solución y la placa recolectora de las fibras (Figura 5). Al incrementar el campo eléctrico, la superficie del líquido se carga eléctricamente y produce un estrés que genera repulsión entre estas cargas, debido a que estas cargas son opuestas a las fuerzas de tensión superficial, la gota se elonga y se transforma hasta un punto crítico llamado el Cono de Taylor (C. Wang et al., 2019). Como consecuencia el chorro continúa con la elongación hasta arrojar las fibras del capilar mientras el solvente se evapora y deja que se formen las fibras que llegan secas al colector (Qasim et al., 2018).





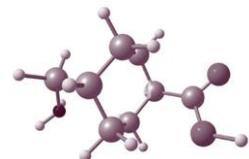
Para llevarse a cabo la obtención de fibras son necesarios diversos parámetros, como son la magnitud del voltaje, el flujo de salida de la solución polimérica, la distancia del campo eléctrico, la humedad relativa del ambiente, la concentración, la conductividad de la solución, el disolvente y por ende la viscosidad de la solución(Sill & von Recum, 2008).

Los resultados de modificar cada uno de los parámetros mencionados se observan en el diámetro, morfología, estructura, homogeneidad y alineación de las fibras. Se considera que el flujo de la solución determina el diámetro de las fibras debido a su influencia en la densidad de carga, si ese flujo sobrepasa el valor crítico la solución es arrojada por la aguja por el campo eléctrico(Torres-Martínez et al., 2018).

Mientras que la morfología de las fibras se controla con la intensidad del campo eléctrico y la distancia entre la placa recolectora y la aguja, el campo eléctrico está relacionado con la tensión superficial para determinar la morfología final, los polímeros que se utilizan tienen una baja conductividad que provoca que se acumulen en la punta de la aguja para después romper esa tensión superficial y llegar al recolector en forma de fibras. Un campo eléctrico alto no siempre es lo mejor, ya que se puede volver muy inestable la solución y genera más impurezas(Weng & Xie, 2015).

La velocidad de evaporación del solvente afecta la formación de fibras o las puede volver uniformes, solventes no volátiles y poco volátiles provocan fibras húmedas o con impurezas. La humedad del mismo modo puede generar estructuras porosas o con impurezas porque no se volatiliza el solvente y la solución continúa alargándose, pero al final sale la gota directamente a la placa.

El recolector juega un papel importante en la dirección de las fibras, comúnmente se utiliza una placa de aluminio, pero se puede utilizar otro material conductor; con diferentes formas, una de las más utilizadas es el recolector rotatorio que permite orientar las fibras, así como modificar el diámetro de estas, altas velocidades tienden a dar como resultado fibras alineadas(Qasim et al., 2018).





Una de las modificaciones necesarias para tener una mejor adherencia y crecimiento celular es tener un ordenamiento de las fibras, es decir, tener las fibras en una sola dirección, además de una homogeneidad en el tamaño y su porosidad. Un alto ordenamiento puede mejorar las propiedades mecánicas, la adhesión celular y proliferación (Sill & von Recum, 2008). El electrohilado permite producir un material con una alta porosidad y área superficial, estas características favorecen el crecimiento celular.

En el caso de unos polímeros como el quitosano, alginato, por mencionar algunos se vuelven difíciles de electrohilar debido a la alta tensión superficial (Ifuku, 2014); sin embargo, hay otros polímeros de cadenas muy cortas que además contienen grupos funcionales como el hidroxilo que permiten que la solución conduzca la electricidad lo que resulta en un rango amplio de los parámetros de electrohilado.

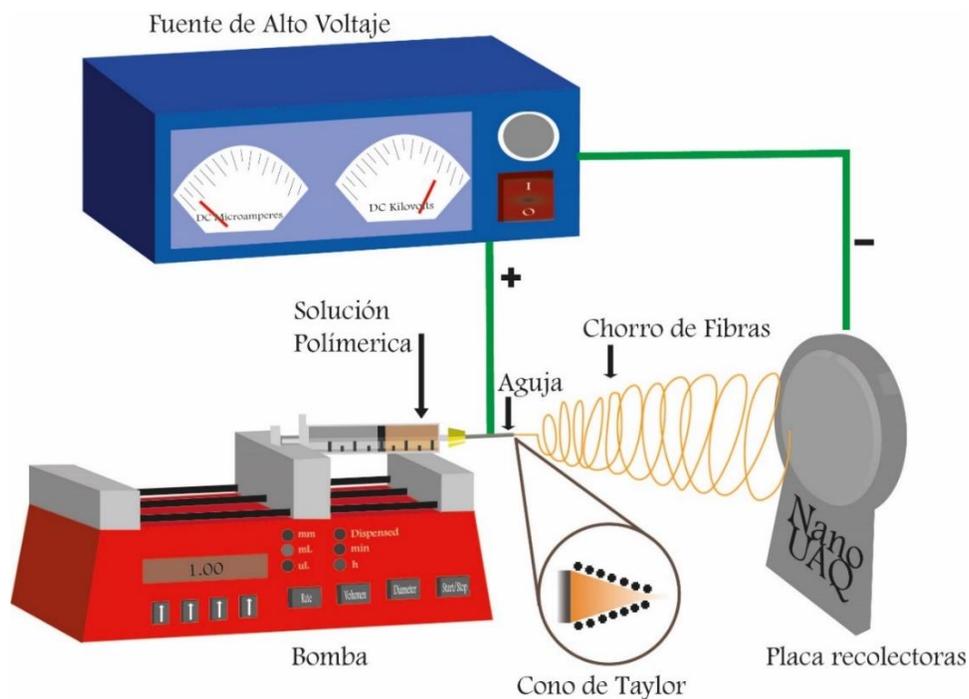
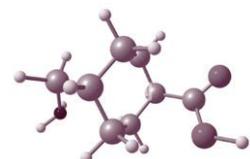
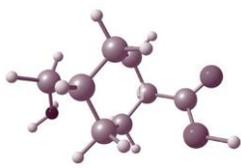


Figura 5. Esquema del funcionamiento del electrohilado (modificado de Long et al., 2018).





HIPÓTESIS

Debido a las propiedades mecánicas, de biocompatibilidad y antibacterianas del colágeno y quitosano, el biomaterial obtenido actuará como barrera física para la lesión y tendrá activada bioquímica sobre el proceso de hemostasia (Figura 6).

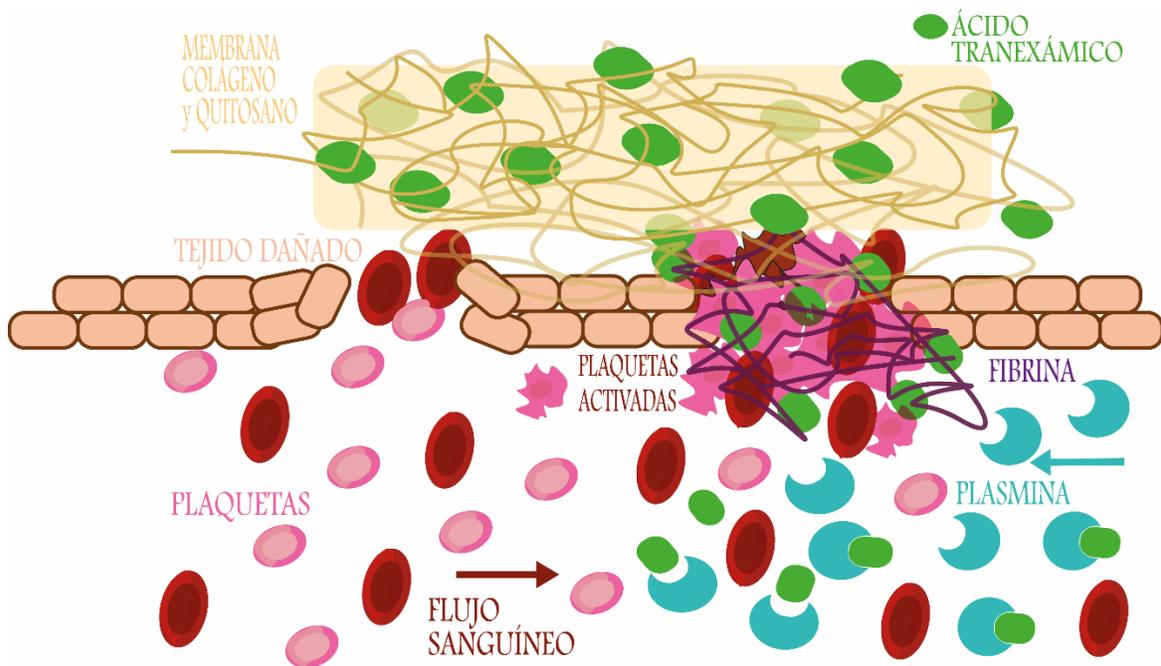
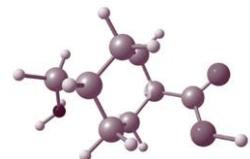
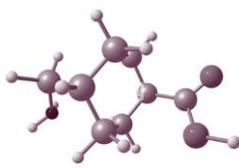


Figura 6. Acción de la membrana de nanofibras sobre una herida con sangrado (modificado de Madhusudhan et al., 2016).





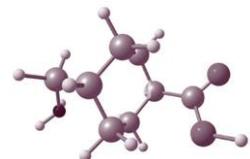
OBJETIVOS

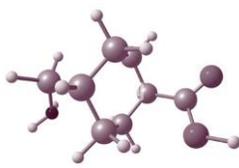
OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una membrana de nanofibras de colágeno/quitosano y TXA mediante la técnica de electrohilado capaz de interactuar en el proceso hemostático.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ζ Extraer colágeno de tendones de bovino por el método de hidrolisis alcalina.
- ζ Estandarizar los parámetros necesarios para electrohilar el composito polimérico.
- ζ Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de la membrana obtenida mediante el Microscopio Electrónico de Barrido, Espectroscopía de Infrarrojo, espectrofotómetro UV-vis, así como propiedades mecánicas por medio de la técnica de rayado e hinchamiento.
- ζ Evaluar la cinética por medio de la liberación de ácido tranexámico en pruebas *in vitro*.
- ζ Evaluar la citotoxicidad del composito por medio de la prueba MTT.
- ζ Evaluar la actividad antibacteriana del composito con *E. Coli* y *S. Aureus*.





METODOLOGÍA

SÍNTESIS DE LOS MATERIALES

EXTRACCIÓN DEL COLÁGENO DE TENDÓN DE BOVINO.

Los tendones de bovino se obtuvieron de patas de bovinos para carne procedentes de un rastro en el municipal de Santiago de Anaya, Hgo. (Figura 7). Posteriormente se procedió a secarlos en horno de convección a una temperatura de 50 °C por 24 h, y se trituró la muestra. Mediante la técnica de hidrolisis alcalina (Mamani Huamán, 2018), con un diseño de experimento 2^4 (Figura 8), se disolvió la muestra en hidróxido de sodio (0.2 y 0.3 M) con diferentes relaciones de hidróxido y muestra de colágeno (10:1 y 20:1), los tiempos de hidrolisis son de 6 y 8 h.

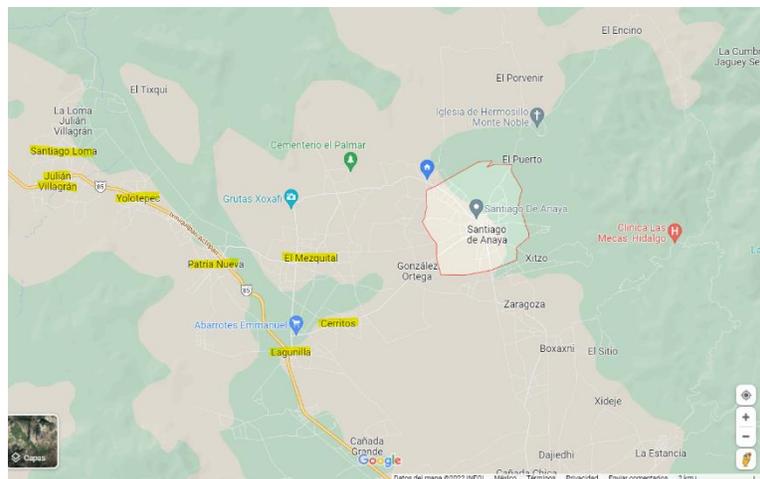
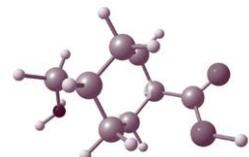
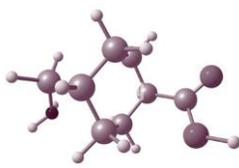


Figura 7. Mapa de la región que incluye el rastro donde se obtuvieron los tendones de bovino para carne (Obtenido de Google Maps).





Pasado el tiempo de hidrolisis se niveló el pH a 7-8 con 0.4 M ácido acético y se procedió a dejar en extracción a 80 °C por 1 y 3 h. Finalmente la muestra se centrifugó a 4536 RCF por 15 min para dejar secar el colágeno extraído a 50 °C por 24 h.

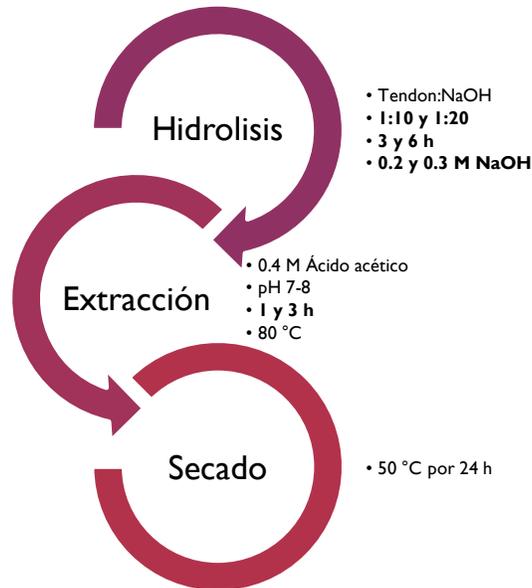
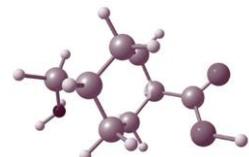
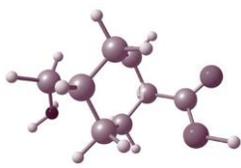


Figura 8. Diagrama de extracción de colágeno.

Otro procedimiento utilizado para la extracción de colágeno¹ se describe en la Figura 9, donde la muestra de tendones se limpió en acetona por 48 horas a 4°C, posteriormente se trituro con ácido acético frío (alrededor de 4 °C) hasta obtener una masa homogénea sin grumos o trozos grandes de tendones. Una vez obtenida esta muestra con peso en húmedo se colocó a extracción en calor (como el método anteriormente descrito), con las condiciones estandarizadas de 3 h a 70 °C, la relación de ácido y muestra fue de 1:1. Pasado el tiempo se dejó enfriar la muestra para centrifugar a 1800 rpm por 15 min, además se lavó

¹ El último procedimiento utilizado durante este proyecto se describe en Anexo II.

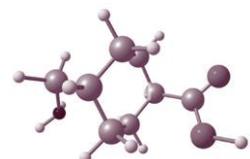




el precipitado con etanol para recuperar la mayor cantidad de colágeno, y finalmente el sobrenadante se liofilizó por 48 h para obtener una muestra seca.



Figura 9. Procedimiento de extracción de colágeno.





SÍNTESIS DE NANOFIBRAS DE COLÁGENO CON QUITOSANO Y ÁCIDO TRANEXÁMICO

En una solución de PBS: etanol con relación de 3:1 se disolvió colágeno extraído con una concentración de 30-50 p/v% (T. Liu et al., 2010), mientras que el quitosano se disolvió en ácido acético con concentraciones de 70 y 90 % v/v a concentraciones de 0.2 al 1 p/v% (Figura 10), posteriormente se mezclaron ambos polímeros en una relación 4:1 (colágeno: quitosano).

En el caso de las muestras con ácido tranexámico se preparó las soluciones a diferentes concentraciones de 40, 30, 20, 10 y 5 mg/ml (Sasmal & Datta, 2019) utilizando PBS: etanol como disolvente en una relación 3:1, posteriormente se añadió los polímeros en la misma concentración y relación mencionada con anterioridad, primero el colágeno y por último quitosano, así como Triton x100 en una relación de 40 μ L por 1 ml de la solución final.

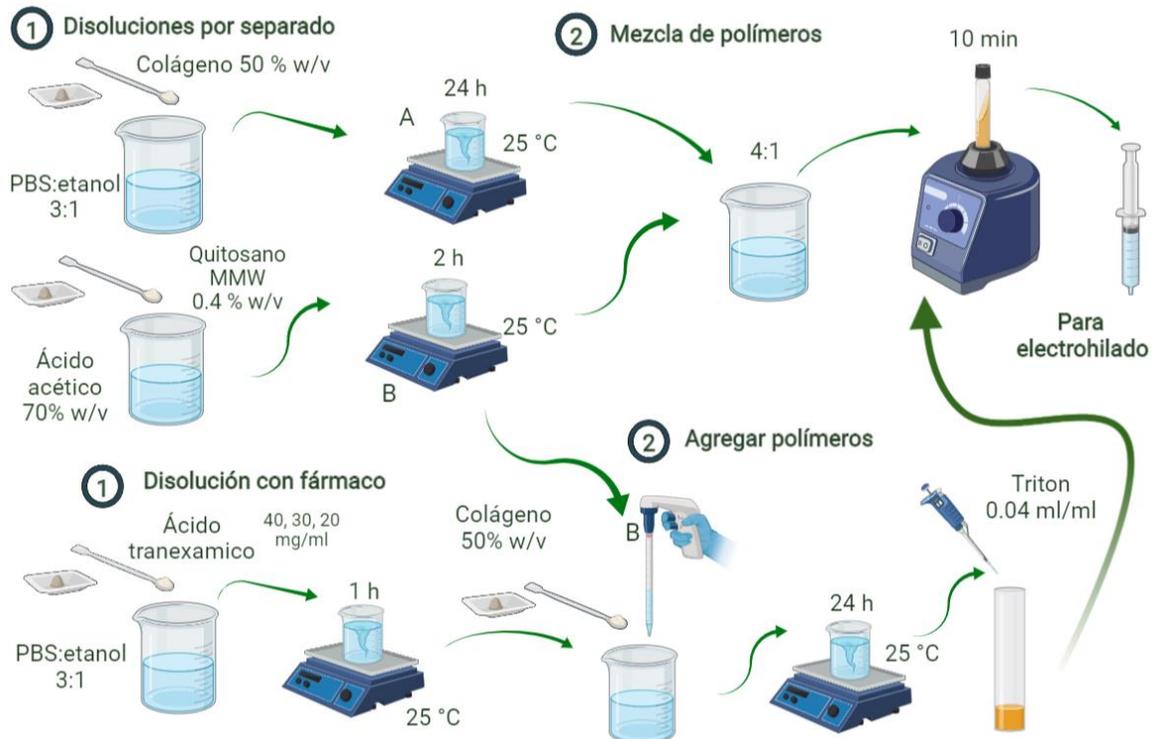
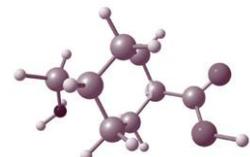
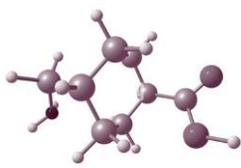


Figura 10. Preparación de disoluciones para electrohilado.





Posteriormente se colocó las soluciones finales en el equipo de electrohilado (en la Figura 11 se muestran las condiciones del equipo), en el cual se utilizó un campo eléctrico de entre 1 a 2 kV/cm con flujos de 0.1 – 2.0 ml/h.

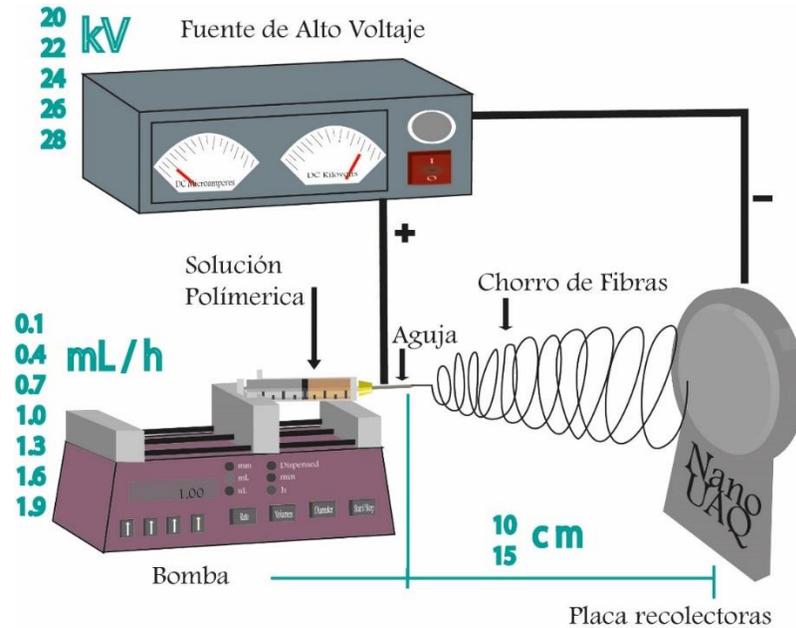
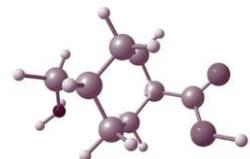
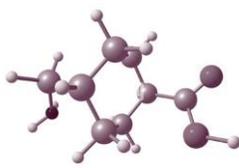


Figura 11. Valores utilizados de electrohilado.





CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

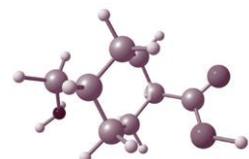
El análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) permitió obtener imágenes de la morfología y el diámetro de las fibras obtenidas, así como las posibles impurezas y la uniformidad de estas.

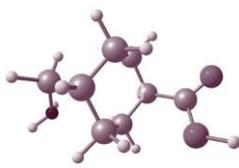
Para el análisis se utilizó el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) marca JEOL JSM-7610F con un voltaje de 1.0 y 5.0 KV, aproximación de 5 000, 10 000, 20 000 y 25 000 X. La muestra fue montada sobre una tira de carbono para después ser bañada con una capa de oro.

ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

El análisis de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier, FTIR por sus siglas en inglés, se utilizó para la determinación de los modos vibracionales e identificación de grupos funcionales de la membrana obtenida a partir de los datos anteriores por comparación bibliográfica.

El análisis se realizó por un Espectrómetro Perkin Elmer GX (modelo Spectrum One), en el rango de 4000 a 650 cm^{-1} , con la técnica de reflectancia totalmente atenuada (ATR) con punta de diamante, 34 barridos, 4 cm^{-1} de resolución.





ESPECTROSCOPIA UV-VIS

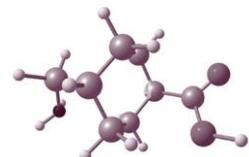
El análisis de espectroscopia UV-vis permitió determinar el cambio de concentración del ácido tranexámico al momento de ser evaluada la liberación de la membrana. El análisis fue realizado por el Espectrofotómetro Perkin Emler Lambda 35 con un rango de 190-1000 nm de absorbanza de 3.2 Å .

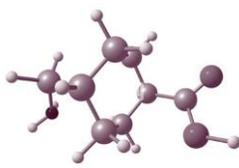
RESISTENCIA A LA RUPTURA (TENSIÓN EN LA RUPTURA)

La resistencia del composito se evaluó soportando la membrana por un extremo y por el otro se aumentó el peso gradualmente hasta el punto de ruptura del material, considerando a la Norma Mexicana NMX-E-005-CNCP-2004 y la ASTM-D882-12. A cada trozo de la membrana se le tomó sus medidas dimensionales (largo, ancho y espesor) para colgarlas y a su vez cargarle de poco a poco un aumento de peso (Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, n.d.).

PRUEBAS DE HINCHAMIENTO

La membrana polimérica se cortó en piezas rectangulares y se pesó cada una en seco. Se procedió a colocar las piezas en un recipiente con agua destilada durante 0, 30 y 60 min a temperatura ambiente, posteriormente se extrajo a los tiempos mencionados y se retiró el agua en la superficie para volver a pesarlas; el análisis se realizó por triplicado (Zhong et al., 2019).





EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS MATERIALES

LIBERACIÓN DE ÁCIDO TRANEXÁMICO EN PRUEBAS *IN VITRO*.

El experimento propuesto por Peipei Hou se adecuó a una solución de fluido de sangre simulada (SBF) y al igual que los tiempos para la toma de las alícuotas (Huo et al., 2021). En este proyecto se utilizó tres recipientes con el mismo volumen de 20 ml de SBF (Figura 12), en cada uno se colocó la membrana con diferentes concentraciones de TXA (40, 30, 20 mg/ml), en otro recipiente se colocó una membrana de quitosano y colágeno, y por último se consideró un blanco sin membrana, el experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente. De cada recipiente se tomó una alícuota de 1.5 ml a tiempos determinados (1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h y 24 h). Posteriormente, se midió la absorbancia de la solución usando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 220 nm (Zhong et al., 2019).

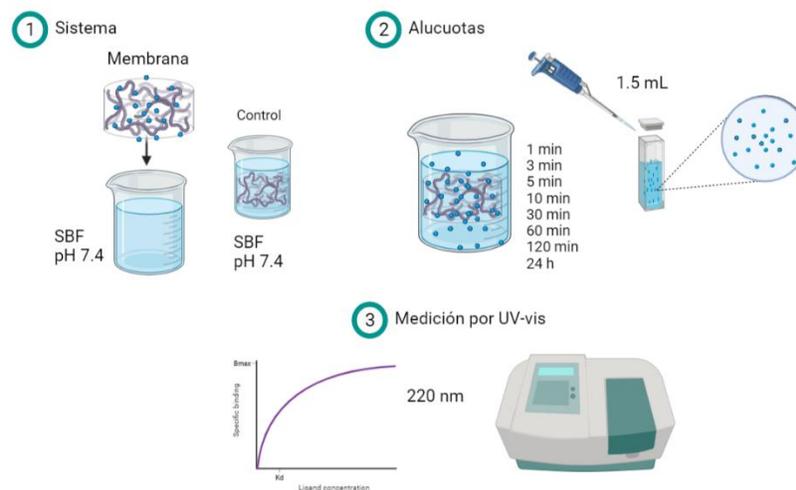
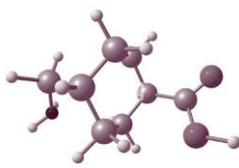


Figura 12. Diagrama de evaluación de liberación de ácido tranexámico (Modificado de Huo et al., 2021).



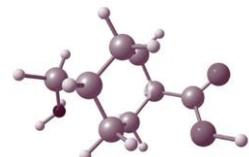


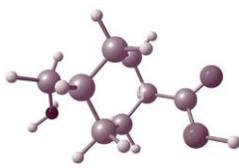
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La determinación de la actividad antimicrobiana de las membranas de quitosano y colágeno, así como las membranas con TXA se llevó con el protocolo de la norma ASTM E2149-Actividad antimicrobiana de antimicrobianos inmovilizados en superficies irregulares (Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions, n.d.).

Primero se realizó un cultivo líquido en medio Muller Hilton con las bacterias *E. coli* y *S. aureus* el cual se dejó incubar aproximadamente 18 h a 37°C , posteriormente se estandarizó una concentración para cada bacteria, se vertieron 5 ml de solución PBS con medio Muller Hilton y se ajustó a una absorbancia de 0.1 que fue el equivalente de una concentración microbiana de 1×10^8 , posteriormente se realizó diluciones seriadas con 550 μ l de inóculo estandarizado más 5 ml de solución PBS con medio Muller Hilton, las diluciones se hicieron hasta llegar a una concentración de 1×10^5 en el caso de *E.coli* y 1×10^6 para *S. aureus*.

Una vez obtenida la concentración final se realizó la incubación de 1 y 3 h de las bacterias sobre la membrana a evaluar. Se evaluó la actividad antimicrobiana de cuatro membranas: quitosano-colágeno (Q-C), Q-C con 20, 30 y 40 mg/ml de TXA, así como una película de quitosano, de todas estas membranas se cortó un cuadrado de 1cm x 1cm, este se colocó al centro de la caja Petri, a los lados se colocaron dos trozos de papel filtro cortados en forma de trapecio y se humedecieron con 300 μ l de agua desionizada estéril cada filtro, sobre la membrana se colocó un inóculo con 20 μ l de la concentración final del cultivo, se cubrió con un cubre objetos, se metió a incubar por 1 h (T1) y 3 h (T3) respectivamente. También se realizó un tiempo cero (T0), en este caso solo se colocó la membrana, el inóculo y el cubreobjetos; posteriormente se realizó un lavado con 2 ml de solución PBS + Tween al 1%, se agitó circularmente hasta separar la membrana del cubreobjetos, de esto se tomaron 50 μ l y se colocó en una placa con medio Muller Hilton para realizar el sembrado por





dispersión mediante el uso de perlas de vidrio. Una vez que terminó la incubación de T1 y T3 se retiró el papel filtro, se realizó el lavado y el sembrado por dispersión.

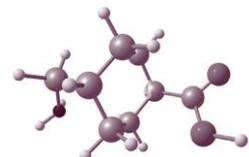
Se dejó incubar por 18 h y se realizó el conteo de colonias para el cultivo de cada membrana con su respectiva bacteria, para determinar el porcentaje antimicrobiano de la membrana.

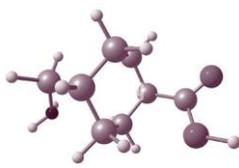
CITOTOXICIDAD DEL COMPOSITO POR MEDIO DE LA PRUEBA DE MTT.

En placas de 96 pozos se colocaron piezas rectangulares de la membrana previamente pesadas (con un arreglo representado en la Figura 13), posteriormente se agregó células con confluencia de 4 000 células/pozo (de una línea celular de fibroblastos OP9 de roedor que fueron previamente cultivados con los protocolos establecidos de cultivo celular especificados en el Anexo III)² y 100 μ L de medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico al 1%, posteriormente se dejaron incubar por las horas que de muestran en la Figura 13 a 37 °C y en oscuro. Para el ensayo de dosis respuesta (Figura 13a), se probaron las membranas con TXA a las concentraciones de 40, 30 y 20 mg/ml en a tiempos de 1, 2, 4 y 24 h; mientras que para un ensayo prolongado de viabilidad se evaluó la membrana con una concentración de 40 Y 30 mg/ml de TXA contra una muestra control de la membrana de colágeno-quitosano. En ambos ensayos se consideró un blanco (células con medio de cultivo suplementado al 12% de SFB y 1% de antibiótico) y un control negativo (células, medio y heparina al 1%).

Pasado los tiempos establecidos se prosiguió a desarrollar el ensayo MTT modificado por la guía de ensayos de viabilidad celular de Terri L Ruis (Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf, n.d.), la modificación consistió en evitar la interferencia provocada por la membrana al medir en el espectrofotómetro. El protocolo consistió en retirar el medio de cultivo por completo, sin retirar la membrana, para posteriormente

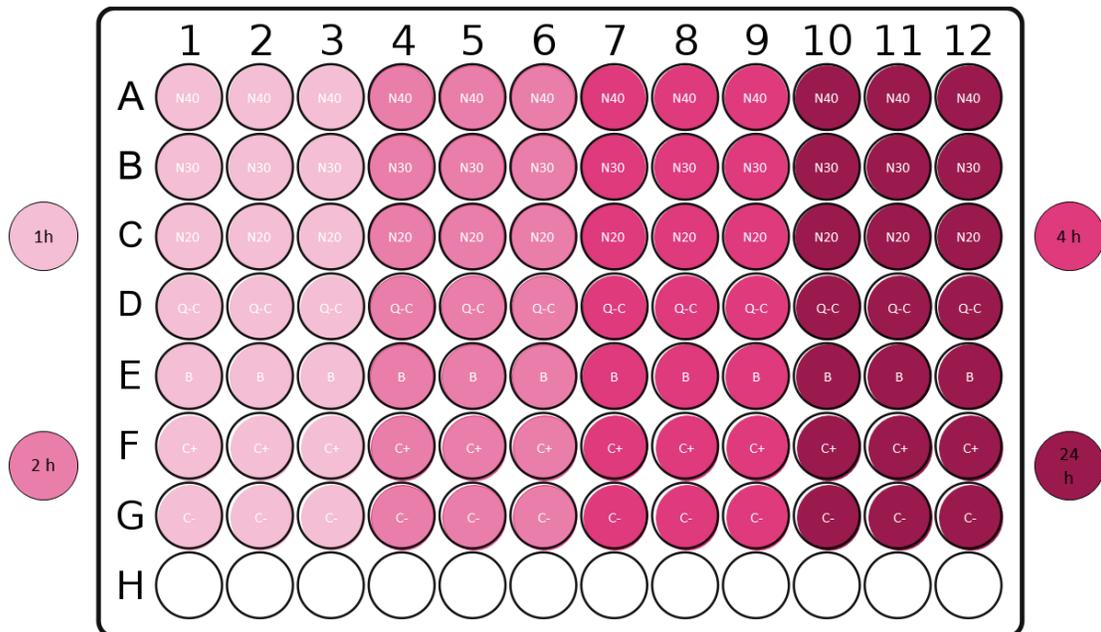
² Los procedimientos de subcultivo celular se describen en el Anexo III



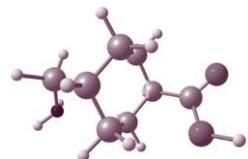


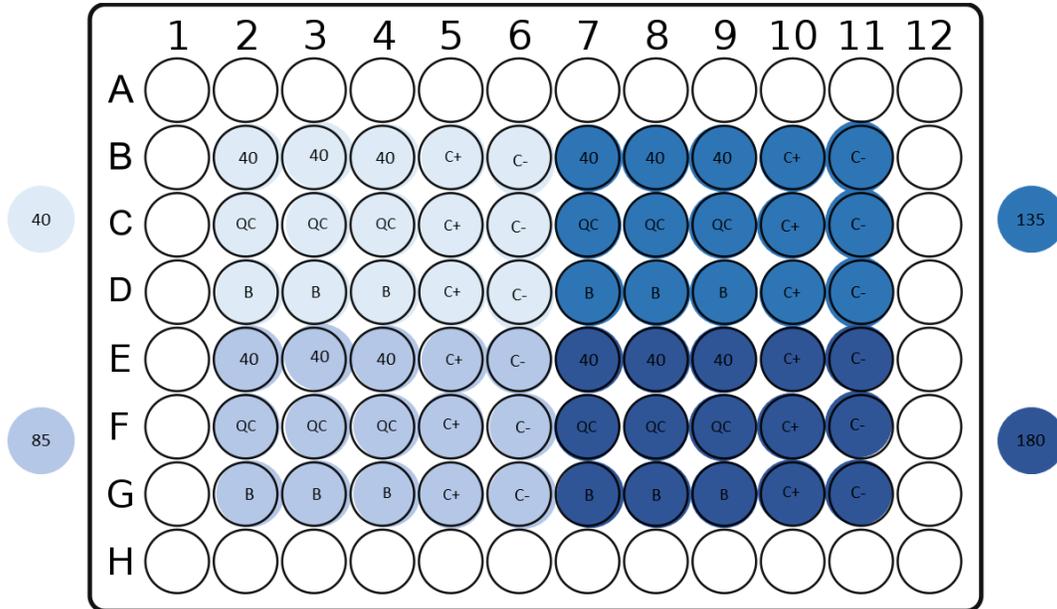
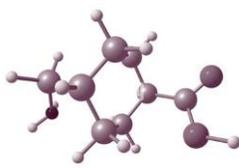
agregar 10 μL de una solución de MTT con una concentración de 5 mg/ml (Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf, n.d.), y 90 μL de medio de cultivo. Se dejó incubar por 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ en oscuro. Pasado este tiempo se retiró la solución sin retirar o destruir la membrana, y después se agregaron 100 μL del solvente de MTT (isopropanol). Finalmente, se retiró la solución de cada pozo para transferirla a placas de 96 pozos limpias, para finalmente medir la absorbancia espectrofotométrica (Figura 14) en un lector de microplacas ELISA a una longitud de onda de 595 y 655 nm.

a)



b)





c)

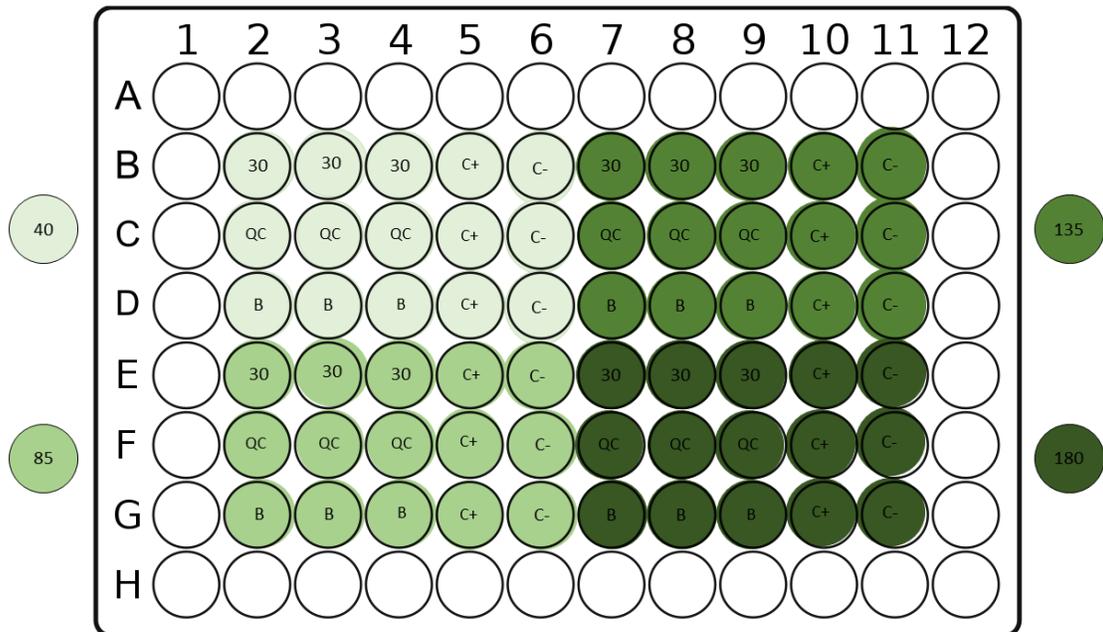
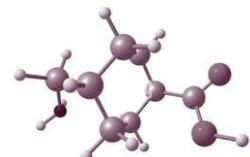


Figura 13. Arreglo de placas de ensayo de viabilidad celular: a) ensayo MTT dosis respuesta de TXA, y b) ensayo MTT prolongado por días para membrana de 40 mg/ml, mientras que c) membrana de 30 mg/ml



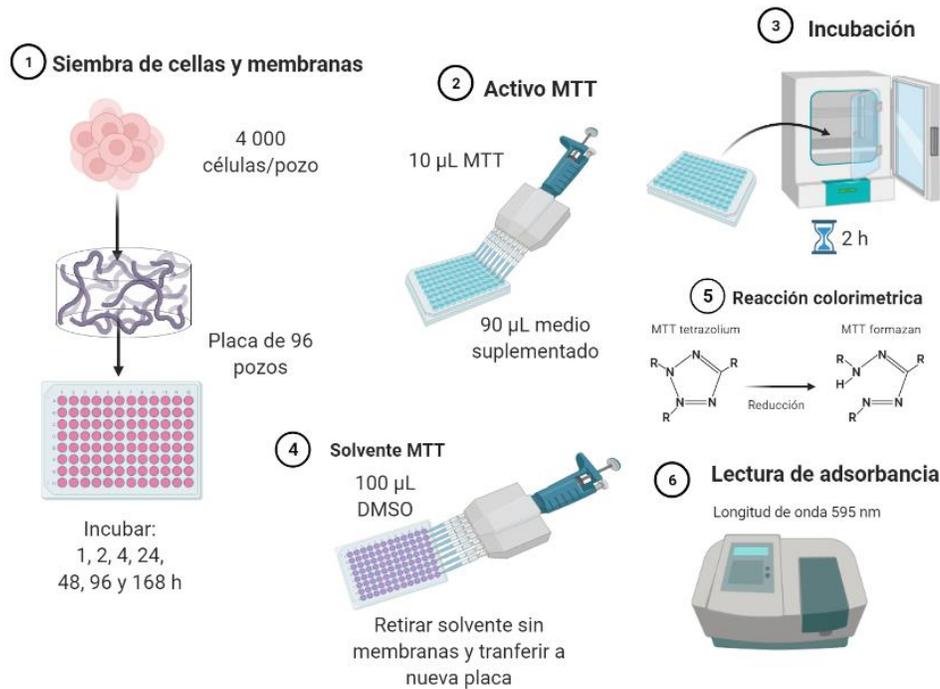
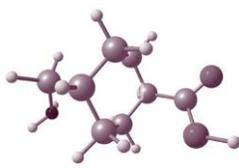
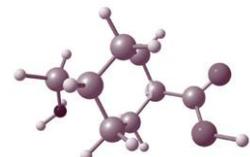


Figura 14. Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT ((Modificado de Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf, n.d.).

TÉCNICA DE RASGUÑO

Sembrar células con una densidad de 4×10^3 células/pozo en una placa de 24 (Figura 15) y dejar incubar hasta una confluencia de 80-90% en cada pozo. Una vez alcanzada esa confluencia se realiza un rallado con una micropunta de 1000 µL en el centro de cada pozo, de extremo a extremo y se coloca una membrana (previamente lavada) sobre el rasguño, se añaden 3 ml de medio suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico sobre la membrana asegurando que quede cubierta por completo. Se observa el cerrado del rasguño por tiempos de 48 y 96 h, durante ese tiempo se evalúa a su vez MTT para ver la tinción de la membrana y observar adherencia celular.



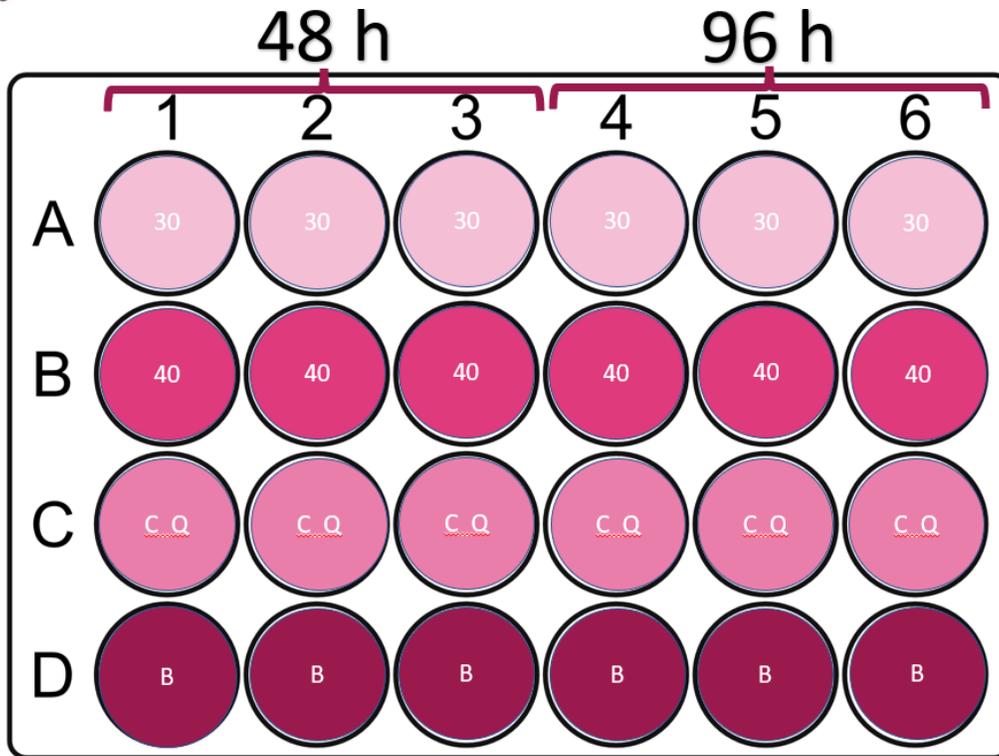
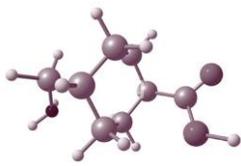
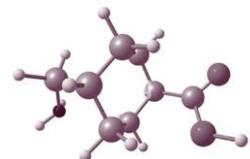


Figura 15. Esquema de arreglo experimental de técnica de rasguño en placa de 24 pozos.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

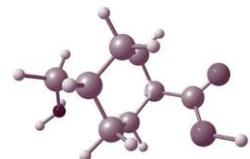
EXTRACCIÓN DE COLÁGENO

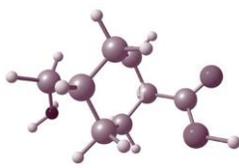
Una vez obtenido los tendones de las patas de bovino (Figura 16a) se prosiguió a secarlos a 50 °C por 48 h para posteriormente rayarlos y obtener las fibras que se muestran en la Figura 16b, debido a que se observó que entre menor sean los trozos del tendón mayor es la extracción del tendón, esto lo podemos atribuir a una mejor interacción del disolvente (ácido acético) con el colágeno para poder cambiar la conformación de las cadenas de polímero, es decir, separar las fibras de colágeno en la moléculas el mismo.



Figura 16. Fotografía de tendones de bovino a) enteros y húmedos, b) rayados después de secarse.

Para obtener las condiciones óptimas de extracción se llevó a cabo un análisis ANOVA del experimento 2^4 , de donde se obtuvo el gráfico de la Figura 17 para determinar la relevancia de cada parámetro utilizado en el porcentaje de rendimiento. En la Figura 17, se observó que el factor más relevante para la extracción es el tiempo de hidrolisis, ya que a 6 horas el





porcentaje de rendimiento en mayor, de alrededor de 21 %. El segundo factor que puede afectar el rendimiento es el tiempo de extracción seguido de la concentración del NaOH; por último, la relación de la muestra y la solución de NaOH no tiene un efecto significativo, sin embargo, con la relación de tendones y ácido acético de 20:1 hay alrededor de un 2 % más alto de rendimiento.

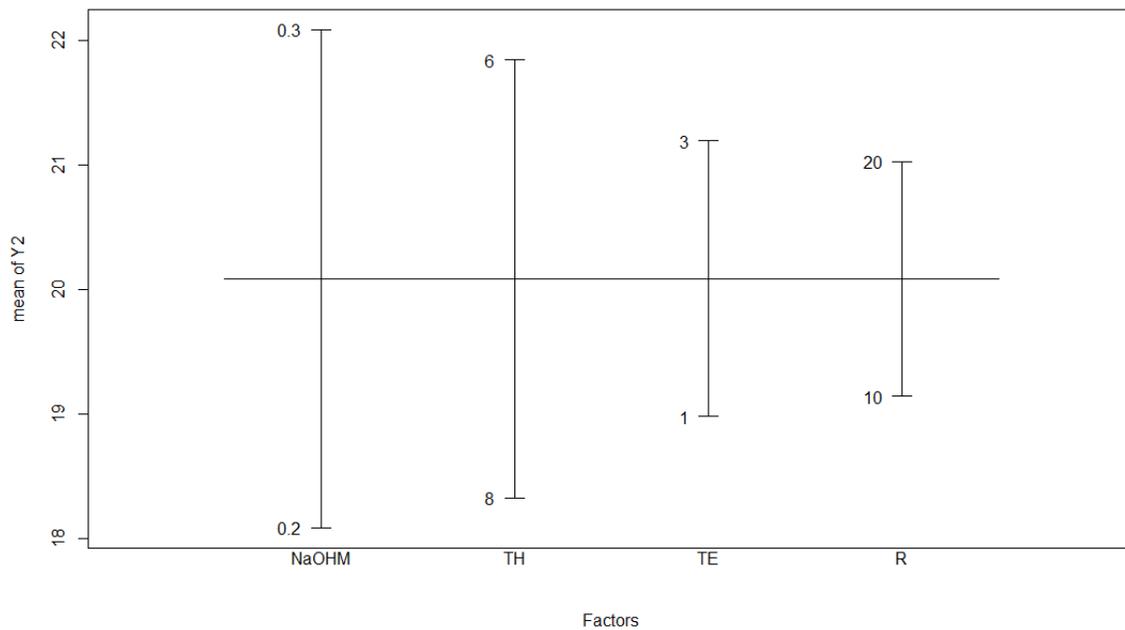
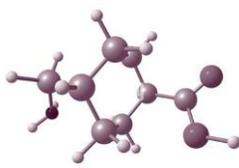


Figura 17. Gráfico ANOVA de experimento 2⁴.

Con base en este análisis se pueden descartar parámetros no significativos en la extracción y los valores con menor rendimiento para lograr parametrizar el experimento. Se repitieron los experimentos correspondientes con la concentración 0.3 M de NaOH, denominados con la numeración de 9 a 14 (Tabla 2), se omitieron los experimentos de 8 h de hidrolisis y 3 h de extracción por el exceso de tiempo.

En la Figura 18, se pueden observar los resultados obtenidos de los experimentos mencionados por triplicado. La relación de muestra seca y solución de NaOH incrementa



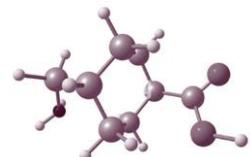


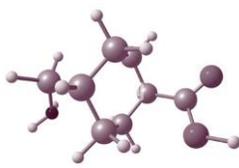
ligeramente la extracción de entre 1 a 10%, en cambio hay un mayor porcentaje de rendimiento (15% más) al aumentar el tiempo de extracción.

Por otro lado, con 8 h de hidrolisis los promedios de rendimiento aumentan arriba del 31%, sin embargo, las desviaciones estándar son mayores tanto a valores bajo y alto de rendimiento, razón por la cual se descartó ese tiempo de hidrolisis.

Tabla 2. Numeración de experimentos de extracción.

Experimento	Concentración NaOH (M)	Hidrolisis (h)	Extracción (h)	Relación (tendón: NaOH)
1	0.2	6	1	01:10
2				01:20
3			3	01:10
4				01:20
5		8	1	01:10
6				01:20
7			3	01:10
8				01:20
9	0.3	6	1	01:10
10				01:20
11			3	01:10
12				01:20
13		8	1	01:10
14				01:20
15			3	01:10
16				01:20





Finalmente se eligió al experimento 12 como las condiciones óptimas de extracción debido a que a pesar de que en promedio solo sea 9% mayor que el experimento 11, la variación de resultados muestra que hay posibilidad de obtener hasta un 50% de extracción y como mínimo un rendimiento de alrededor del 20%, mientras que el promedio de utilizar menos NaOH es de 24%.

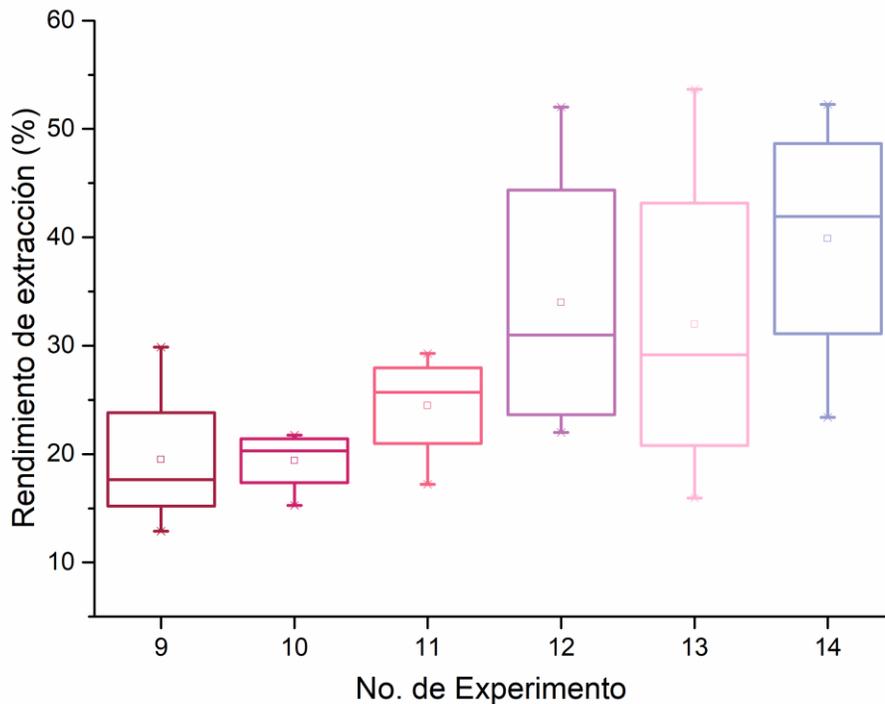


Figura 18. Gráfico de rendimiento de extracción de colágeno.

Posteriormente para determinar el tipo de colágeno se analizó la muestra obtenida por espectroscopia infrarrojo (FTIR), en la Figura 19 se observan señales características del grupo amida I a los 1629 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de C=O del grupo carbonilo, a 1543 cm^{-1} se encuentra el grupo amida II con el estiramiento del grupo C-N (de Campos Vidal & Mello, 2011); mientras que las bandas del grupo amida III se encuentra a 1450 cm^{-1} y 1234 cm^{-1} donde hay pequeñas señales correspondiente a interacciones intermoleculares





que representan el estiramiento de C-N y N-H (Stani et al., 2020), estas señales también representan la estructura de triple hélice del colágeno que sugiere que no se pierde esa estructura terciaria en el método de síntesis aplicado (Akram & Zhang, 2020).

Por otro lado, el grupo amida A que se encuentra a 3303 cm^{-1} y amida B a 3072 cm^{-1} las cuales son señales que están relacionadas a puentes de hidrogeno entre NH y otros grupos de la proteína, así como las tensiones asimétricas de los grupos $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}$, respectivamente (León-López et al., 2019).

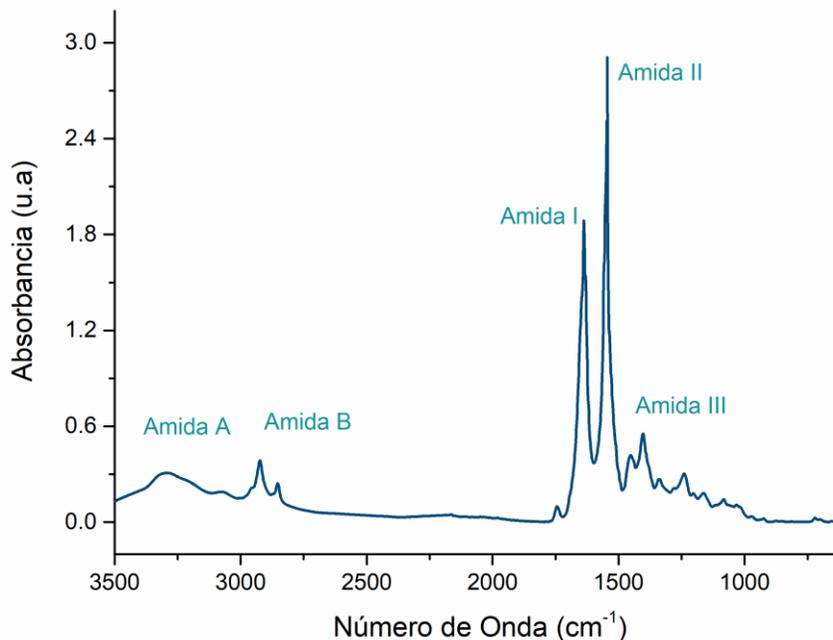
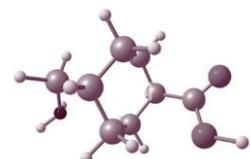


Figura 19. Espectro de FTIR de colágeno extraído.

Por último, las señales que se encuentran a 14401 cm^{-1} , 1335 cm^{-1} y 1236 cm^{-1} corresponden al estiramiento asimétrico de C-O-C, balanceo del CH_2 relacionado al glicógeno y el estiramiento de CN junto con la deformación de NH, respectivamente (Bachmann et al., 2005; Cao & Xu, 2008). La señal a 1035 cm^{-1} representa el grado de hidrolisis del colágeno correspondiente al estiramiento del grupo OH, en la muestra obtenida la





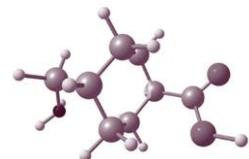
señal es muy pequeña por lo cual no se considera que el colágeno extraído se encuentre hidrolizado.

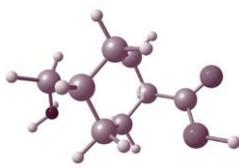
La señal del grupo amida I es una banda característica de la cadena de hélice α que permite analizar la estructura secundaria del colágeno. La determinación del tipo de colágeno se obtiene por las señales: en 1629 cm^{-1} que nos indican la presencia de la triple hélice, 1450 cm^{-1} la diferenciación del colágeno V, al igual que la señal a 1201 cm^{-1} y 1078 cm^{-1} ; por otro lado, la señal en 1340 cm^{-1} indica la presencia de hélices α , así como la presencia de hélices β sheet en 1240 cm^{-1} y β turns en 1276 cm^{-1} (Stani et al., 2020) estas señales están relacionadas con el colágeno de tipo I que tiene dos cadenas α y una β (Belbachir et al., 2009), mientras que el tipo V, tiene 3 cadenas α (Gelse et al., 2003).

Debido a que la modificación de proceso de extracción se realizó en el proceso de limpieza y trituración de los tendones, se considera un rendimiento similar al proceso de extracción seleccionado con anterioridad, así como el espectro infrarrojo que muestra las mismas señales correspondientes al colágeno tipo I.

ELECTROHILADO DE POLÍMEROS

La solución de quitosano disuelto en ácido acético en diferentes concentraciones de 1 a 3 p/v % así como con diferentes pesos moleculares (alto, medio y bajo) no permitió electrohilarse por sí solo debido a la dificultad que presenta el polímero en separar las cadenas poliméricas y creando repulsión iónica entre sus grupos asociado a la carga eléctrica (Jayakumar et al., 2010) aun utilizando una alta concentración de ácido acético debido a la alta tensión superficial del quitosano (Ifuku, 2014), ya que se reportan disolventes fuertes como ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico o 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propano (HFP) (Jayakumar et al., 2010). Por otro lado, se reportan estudios de quitosano en composito con polivinilo alcohol (PVA), oxido de polietileno (PEO),





hidroxiapatita (HAp), o ácido poli glicólico (PGA) por mencionar algunos (Haider et al., 2013).

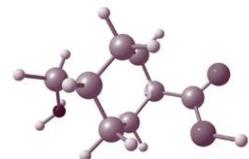
Por lo anterior, se probaron dos métodos de electrohilado, uno consistió en el uso de ácido acético como único disolvente para ambos polímeros; mientras que el otro consiste en utilizar buffer de fosfatos (PBS) y etanol como disolvente del colágeno y ácido acético para el quitosano.

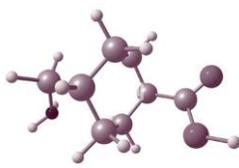
ELECTROHILADO CON ÁCIDO ACÉTICO

Después de no obtenerse fibras de quitosano por sí solo, se realizó el electrohilado en conjunto de quitosano y colágeno. A concentraciones mayores del 2 % p/v de quitosano de alto (Q-HMW) y medio peso molecular (Q-MMW) la solución se vuelve muy viscosa y no es posible romper la tensión superficial, por lo que se trabajó en su mayoría con las concentraciones de 1 % p/v y en algunos casos que se mencionaran adelante se trabajó con 2 % p/v. Por otro lado, el ácido acético se limitó a una concentración de 70 %v/v porque a concentraciones mayores el disolvente se evapora muy rápido lo que provoca que la disolución se vuelva viscosa en un corto tiempo.

En el caso del colágeno, se trabajó con altas concentraciones de 40 y 60 % p/v debido a que al mezclarlo con el quitosano disminuye la viscosidad de la solución para permitir romper la tensión superficial del compuesto, a concentraciones menores del 30 % p/v la solución no logra formarse el cono de Taylor por ende no se observa la formación de fibras como en la Imagen 1.

Una vez acertadas las concentraciones de las componentes se prosiguió con los parámetros del equipo de electrohilado, se eligió un rango de voltaje de 20-26 kV, flujo de la solución de 0.1-2.0 ml/h, así como una distancia entre la placa recolectora y la aguja de 10-15 cm.





Por medio de microscopía óptica se descartaron parámetros del equipo y concentraciones de los polímeros para determinar su efecto en las fibras del compuesto, en la Imagen 1 se observa la morfología de fibras que se encuentran en capas, así como la presencia de fibras de mayor diámetro compuestas por fibras más delgadas.

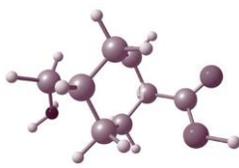


Figura 20. Fotografía de microscopio óptico (a 40X) de la membrana de quitosano-colágeno, datos EXIF: f/1.89, 1/30 e ISO900.

Posteriormente se realizó caracterización con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para determinar el efecto de cada parámetro en el diámetro, morfología y homogeneidad e impureza de las fibras.

DISOLUCIONES CON QUITOSANO DE ALTO PESO MOLECULAR





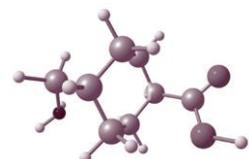
Las soluciones con quitosano de alto peso molecular que permitieron electrohilar corresponden a una concentración de 1 % p/v, adicionadas con 40 y 50 %p/v de colágeno, ambos disueltos en ácido acético al 70 v/v% y diluidos en etanol con una relación 1:1.

Los parámetros que permitieron electrohilado de la solución polimérica 1 Q-HMW-40 C se enlistan en la Tabla 3 junto con el diámetro de las fibras obtenidos con estos valores. Se puede observar que al aumentar el voltaje se obtienen fibras de un diámetro menor, sin embargo, al disminuir el flujo hay un aumento del diámetro. La distancia no se evaluó, sin embargo, no se observaba un cambio notorio en la disminución de las gotas que llegaban a placa recolectora, por lo contrario, al aumentar la distancia las fibras se dispersaban hacia la zona cargada por el campo eléctrico generado por el equipo.

Tabla 3. parámetros de electrohilado de Q-HMW.

Voltaje	Flujo	Distancia	Diámetro de Fibras	Desviación estándar
20 kV	1.0 ml/h	10 cm	173.114 nm	33.603 nm
23 kV	0.8 ml/h	10 cm	127.173 nm	16.900 nm
23 kV	0.5/h	10 cm	143.221 nm	18.962 nm

En la Figura 21 se observa el cambio en la morfología de las fibras al aumentar el flujo, las fibras pierden una morfología más definida, esto lo podemos atribuir a que un flujo mayor no permite la formación estable del cono de Taylor lo que refleja que no se forma el chorro de fibras y llega la muestra polimérica húmeda sin que se formen fibras de manera homogénea (Figura 21 b). Sin embargo, en la membrana de la Figura 21a aún se observan impurezas por no tener un flujo estable, la mezcla sin electrohilar que se agrega de manera no uniforme sobre las fibras y entre las mismas.



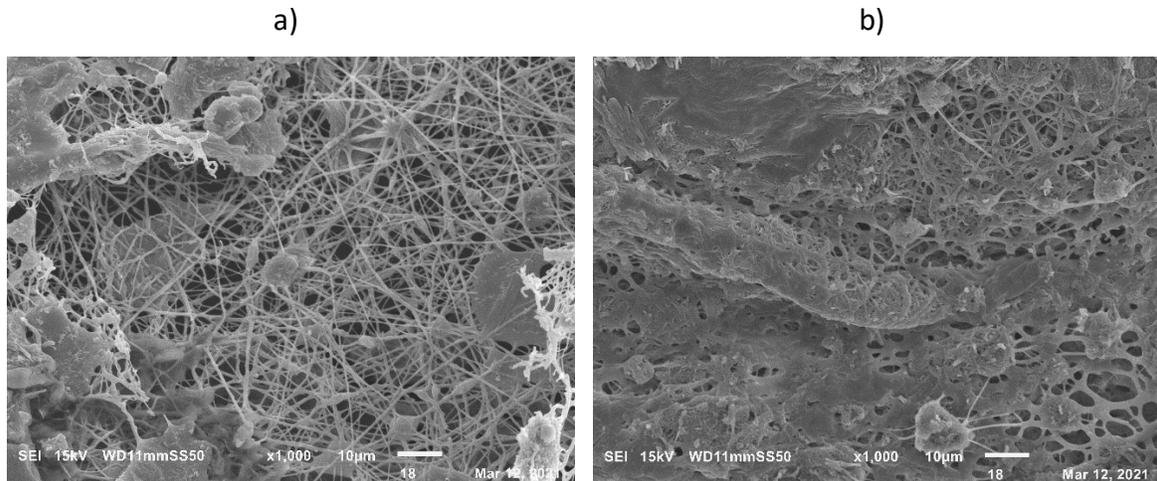
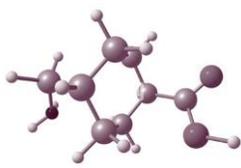


Figura 21. Micrografía de nanofibras con 1 % Q-HMW y 40 % C: a) flujo de 0.5 ml/h y b) 0.8 ml/h.

Por otro lado, en la Figura 22a se identifican las impurezas de gotas del polímero sobre las fibras y entre ellas (flechas de color rosa), así como impurezas en la formación de las fibras que se conocen como rosario (círculos color rojo); estas últimas se pueden formar por la acumulación del polímero en la aguja, se considera que esta acumulación es debida al quitosano el cual puede dificultar el electrohilado del compuesto. Sin embargo, las fibras tienen un diámetro homogéneo de 127.17 ± 16.9 nm. Por otro lado, en la Figura 22b se muestran la mezcla sin electrohilar que se agrega de manera no uniforme formando impurezas sobre las fibras; así como cristales que se forman sobre las mismas, estos cristales se pueden atribuir al colágeno ya que este polímero puede cristalizar, así como posibles residuos de hidróxido de sodio que se utilizan en el proceso de extracción los cuales a pesar de los lavados pertinentes pueden quedar en la muestra seca de colágeno.

Por último, se probó una solución de quitosano al 2% con la misma cantidad de colágeno que requirió de un voltaje de 26 kV para poder tener un Cono de Taylor estable sin embargo al observar la muestra por SEM no hay una morfología de fibras, lo que podemos atribuir al aumento de quitosano.

a)

b)



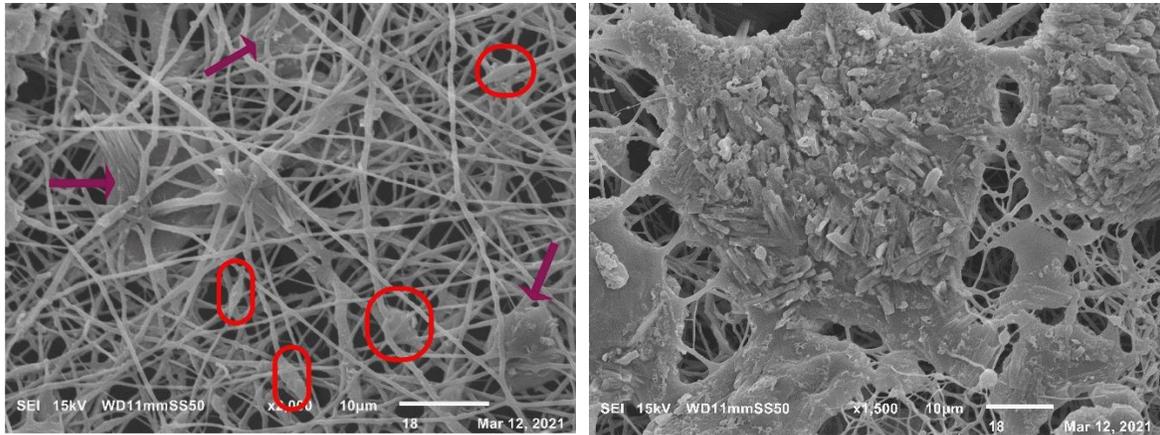
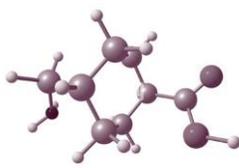


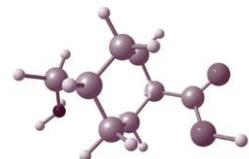
Figura 22. Micrografía SEM de fibras de colágeno y quitosano a 23 kV, 1 ml/h y 10 cm: a) fibras y sus impurezas sobre la membrana (fechas rosas) y entre las fibras (círculos rojos) y b) manchas de impurezas.

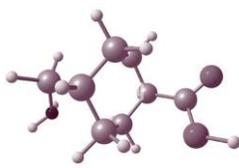
DISOLUCIONES CON QUITOSANO DE MEDIO PESO MOLECULAR

En las soluciones con quitosano de medio peso molecular se pudo observar un rango más amplio de condiciones que permitieron electrohilado, en la Tabla 4 se encuentran los diámetros de las fibras obtenidas con sus respectivos valores de electrohilado, los cuales corresponden a una solución con 1 % p/v de Q-MMW y 50 % p/v de C, ambos disueltos en ácido acético al 70 % v/v y diluidos en etanol con una relación 1:1.

En la Tabla 4 se observa que al aumentar el voltaje el diámetro de las fibras aumenta, caso contrario al aumentar el flujo de la solución polimérica; esto se lo podemos atribuir a la estabilidad que tiene el cono de Taylor con un flujo mayor porque no permite que se acumule la solución en la punta de la aguja y a su vez se solidifique formando gotas que caen fuera de la placa recolectora. Por otro lado, el incremento de tamaño ocurre por el aumento de voltaje, debido a la velocidad mayor en la que viajan las fibras a la placa que no permite que se evapore por completo el disolvente.

Tabla 4. Parámetros de electrohilado de la solución con Q-MMW.

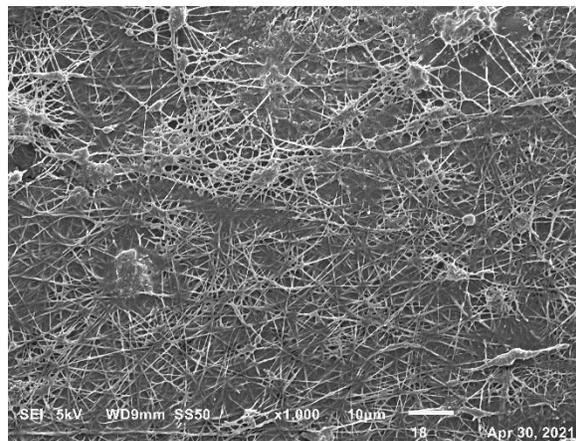
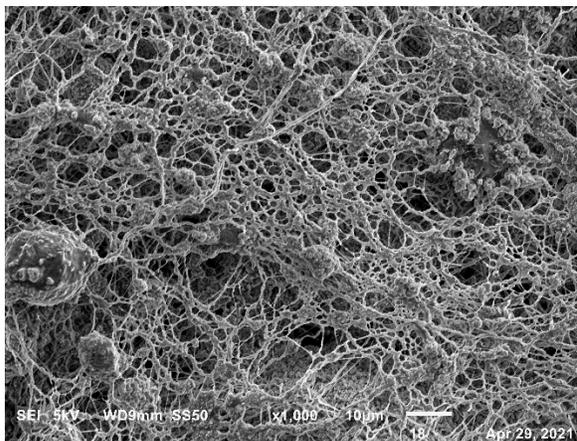




Voltaje	Flujo	Distancia	Diámetro de Fibras	Desviación estándar
24 kV	0.4 ml/h	10 cm	118.741 nm	21.79 nm
26 kV	0.4 ml/h	10 cm	168.319 nm	28.423 nm
26 kV	0.7 ml/h	10 cm	138.663 nm	25.672

En las Figura 23 se observa el efecto del voltaje en la morfología de las fibras, ya que a pesar de tener fibras más pequeñas estas tienen un efecto rugoso (Figura 23a), así como la presencia de cuentas entre las fibras con una apariencia igualmente rugosa; a diferencia de las fibras con 26 kV que se encuentra más definidas (Figura 23b), sin embargo, se encuentran unidas con una capa que las recubre.

Por otro lado, conservando un voltaje de 26 kV y modificando el flujo a 0.7 ml/h se obtienen fibras como las que se muestran en la Figura 24 que tienen una morfología semirugosa en comparación con la Figura 24. Sin embargo, hay un aumento de cúmulos en las membranas, los cuales tienen una apariencia rugosa y un diámetro de alrededor de $3.8 \pm 4 \mu\text{m}$.



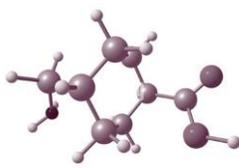
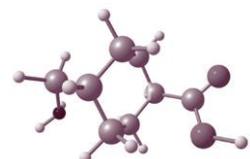


Figura 23. Micrografía SEM de nanofibras de 1% Q-MMW, 50 % C, 0.4 ml/h y 10 cm: a) 24 kV y b) 26 kV.

Por otro lado, al tener un aumento de quitosano al 2 %p/v conservando la concentración de colágeno aun permite el electrohilado de la solución con un tamaño de fibras de 142.08 ± 27.1 nm, se obtuvieron con los parámetros de 24 kV, 0.7 ml/h y 10 cm.

Caso contrario ocurre al conservar el 1 % p/v de Q-MMW y disminuir a 40 % p/V de C no permite la obtención de fibras, debido a que por SEM se observa una película rugosa (Anexo III). En base a estos resultados, se puede decir que el colágeno es un parámetro importante en la obtención de las fibras de este composito.

Posteriormente se evaluó la interacción de los polímeros en el composito por medio de FTIR, en la Figura 25 se observa el espectro IR de la membrana obtenida y los polímeros por separado. En el caso de colágeno ya se mencionaron las señales correspondientes en la sección de extracción de colágeno.



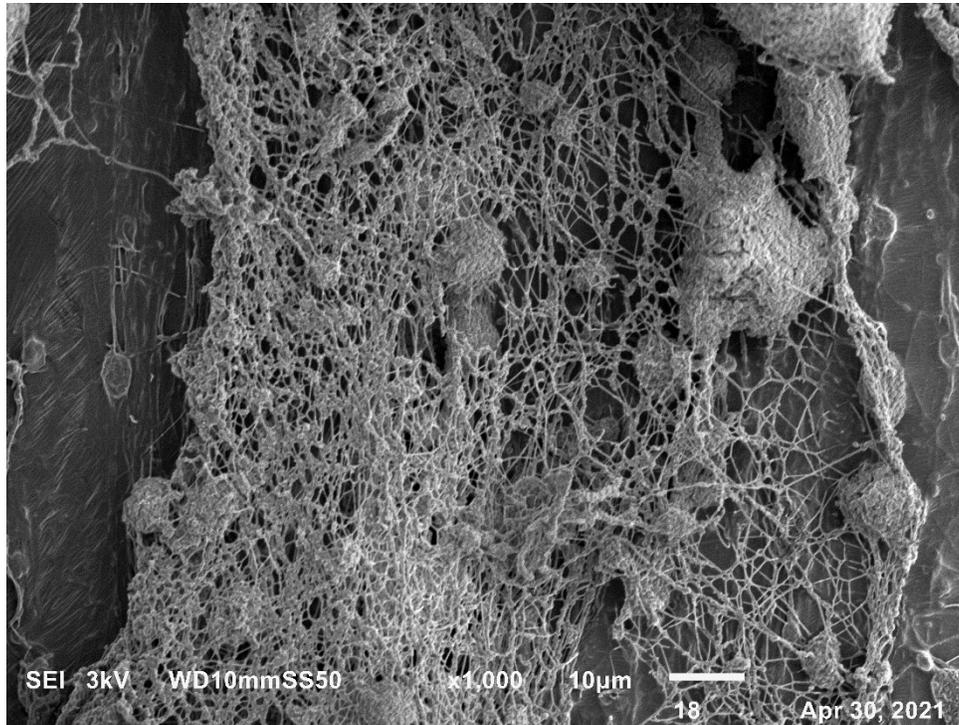
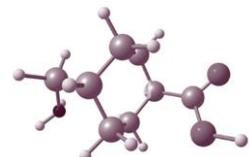


Figura 24. Micrografía SEM de 1 % Q-MMW y 50 % C con 26 kV y 0.7 ml/h.

Por otro lado, en el espectro de quitosano podemos observar la señal correspondiente al grupo amina I en 1648 cm^{-1} con el estiramiento de C=O que indica que esta desacetilado el quitosano, al grupo amida II en 1555 cm^{-1} con la vibración de $-\text{NH}_2$, y el grupo amida III en 1256 cm^{-1} y 1418 cm^{-1} con los estiramientos de C-N, N-H y C-H del grupo alcohol, respectivamente; mientras que en 1148 cm^{-1} encontramos a la señal correspondiente al estiramiento de C-O-C, junto con las señales a 1059 cm^{-1} y 1024 cm^{-1} que corresponden a los enlaces glicosídicos de la proteína, otras señales representativas del quitosano las encontramos a 655 cm^{-1} que representan a CH_3COH (Cárdenas & Miranda, 2004; Pawlak & Mucha, 2003).

Del mismo modo, se identificaron las señales para el compuesto polimérico donde aún encontramos la banda correspondiente al grupo amida I en 1639 cm^{-1} la cual concuerda con la posición del colágeno el cual se encuentra en mayor proporción y se puede decir que se mantiene la estructura hélice α (Andonegi et al., 2020), al grupo amida II en 1555 cm^{-1} que tuvo un corrimiento entre las señales de quitosano y colágeno, mientras





que la amida III se encuentra en 1350 cm^{-1} hay un corrimiento de número de onda hacia la derecha además de que disminuye su intensidad hasta casi desaparecer al estar presente el quitosano. La señal en 1418 cm^{-1} del quitosano la cual corresponde a los estiramientos de $-\text{CH}$, tiene un corrimiento a menor número de onda al tener el compuesto.

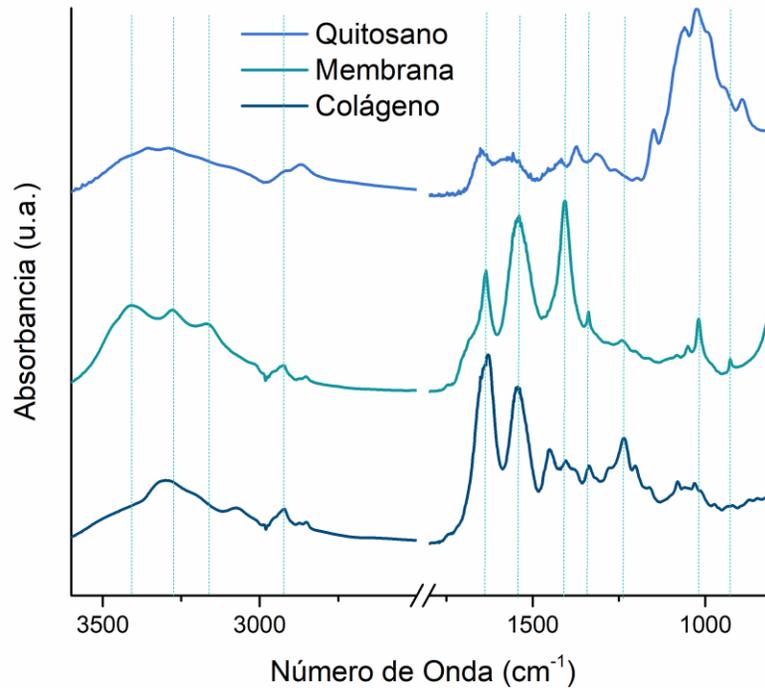
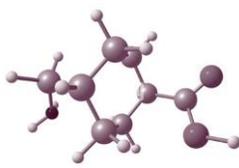


Figura 25. Espectro IR de nanofibras de colágeno y quitosano.

Por otro lado, las señales correspondientes al estiramiento de C-O-C y enlaces glicosídicos disminuye en el compuesto, salvo por la señal en 1019 cm^{-1} correspondiente al grupo OH relacionada a la hidrolisis de los polímeros, y en comparación con el quitosano tienen un corrimiento a menor número de onda y disminuye la intensidad. Estas señales que casi desaparecen las podemos atribuir a rompimientos de las cadenas de quitosano por lo que desaparece la señal correspondiente a C-O-C , sin embargo, no hay señales de un rompimiento completo que nos deje con solo monómeros es por lo que la señal desaparecida se sugiere es debida a interacciones destructivas en las cadenas cortadas del





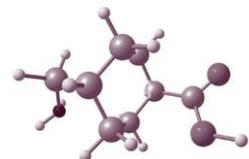
quitosano. Mientras que la señal correspondiente al estiramiento $-\text{CH}_3\text{COH}$ tiene un corrimiento a un menor número de onda en 645 cm^{-1} .

La intensidad de las señales las podemos atribuir a la presencia de puentes de hidrogeno entre las cadenas de colágeno por sus grupos $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$, así como con el quitosano por sus grupos $-\text{NH}_2$ y la gran cantidad de $-\text{OH}$ (Sionkowska et al., 2004). Por estos grupos con cargas opuestas se puede decir que se encuentran con enlaces iónicos (Z. Chen et al., 2007), ya que el quitosano se considera un grupo catiónico ($-\text{NH}_3^+$) mientras que el colágeno en un grupo aniónico ($-\text{COOH}$) lo que puede provocar la formación de un complejo polianionico-policationico (Taravel & Domard, 1995). Puede suceder que el quitosano se encuentra alrededor de la triple hélice de colágeno formando un polielectrolito (Z. Chen et al., 2007).

ELECTROHILADO DE POLÍMEROS ADICIONANDO EL FÁRMACO

El proceso de electrohilado añadiendo el ácido tranexámico se llevó a cabo en dos etapas, la primera en las disoluciones poliméricas considerando al ácido acético como único disolvente; mientras que la segunda fue añadiendo PBS y etanol como solventes del fármaco y el colágeno.

Para el primer caso, la membrana obtenida al agregar el fármaco TXA se obtuvo un efecto de disminución de fibras en la morfología final, así como la presencia de puntos sobre toda la membrana como se observa en la Figura 26. Los parámetros del equipo que se utilizaron fue 26 kV, 0.7 ml/h y 10 cm, que fueron parámetros donde se observó estable el cono de Taylor en el composito de los polímeros por sí solos.



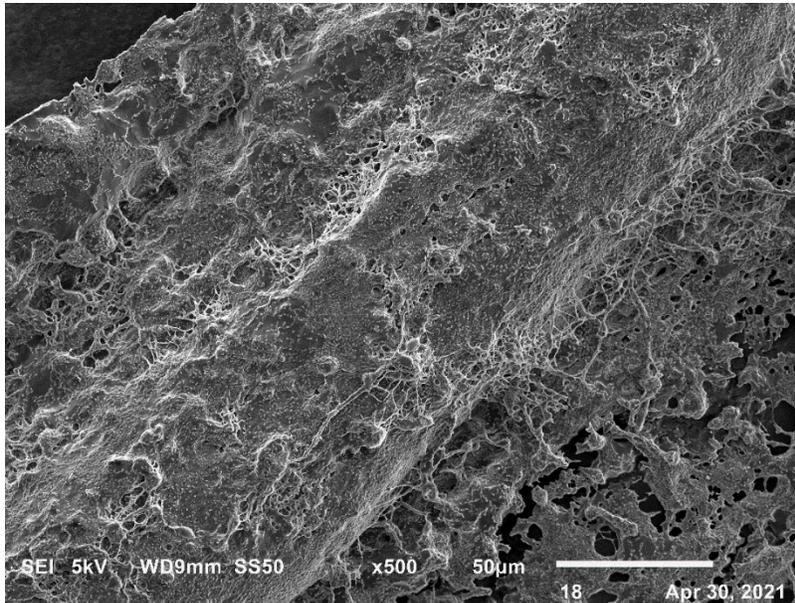
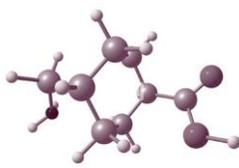


Figura 26. Micrografía SEM de nanofibras de colágeno y quitosano con ácido tranexámico.

Los puntos que se observan de manera homogénea sobre la muestra los podemos atribuir al TXA, que tiene en este caso una concentración de 40 mg/ml que se puede considerar que está afectando la tensión superficial de la muestra que no permite la formación homogénea de fibras; las cuales tiene un diámetro de $152,822 \text{ nm} \pm 19.657 \text{ nm}$, mientras que los cúmulos tienen un diámetro de $544.77 \text{ nm} \pm 161.46 \text{ nm}^3$.

Por otro lado, en la Figura 27 podemos observar como el TXA se encuentra sobre toda la superficie del material, así como sobre y dentro de las nanofibras como se observa en los círculos verdes, lo que nos permite mejorar los parámetros de electrohilado para mejorar la homogeneidad de la membrana.

³ Imágenes de los cúmulos sobre las fibras se encuentran en Anexo I.



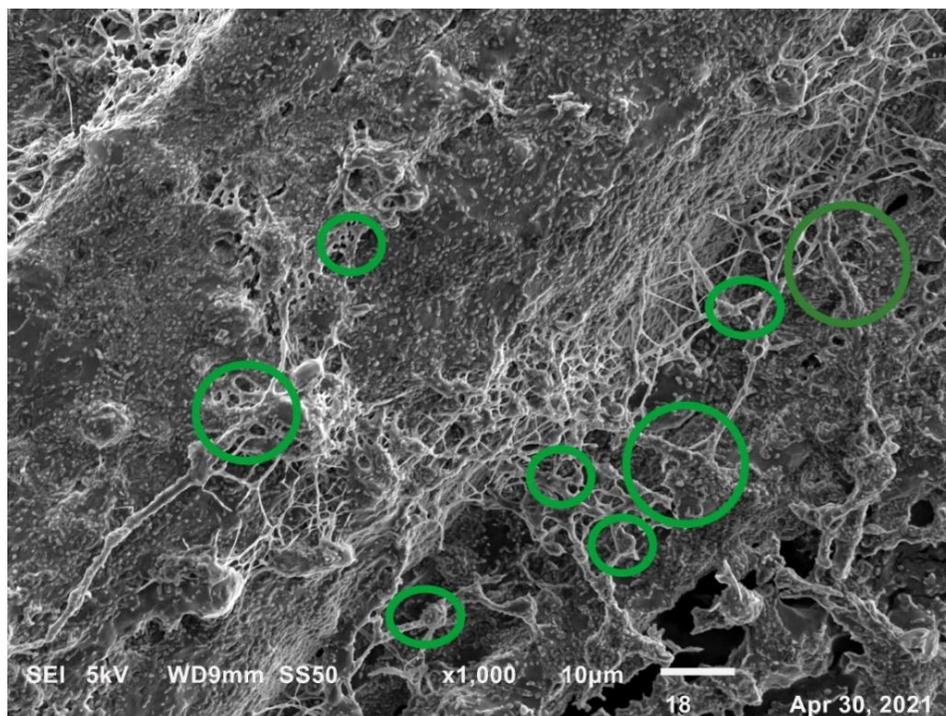
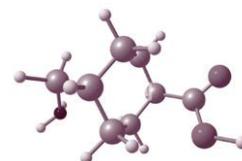


Figura 27. Micrografía SEM de TXA entre las nanofibras de quitosano/colágeno.

Para identificar la interacción del fármaco con los polímeros, se realizó espectroscopia infrarroja del ácido tranexámico, donde en la Figura 28 se observan las señales correspondientes del compuesto, a los 2859 cm^{-1} está relacionado al estiramiento del C-H, mientras que a 2921 cm^{-1} indican la presencia de un estiramiento entre N-H junto con la señal a 1636 cm^{-1} correspondiente al balanceo y en 917 cm^{-1} correspondiente a la deformación de este. Mientras que las señales correspondientes al estiramiento C=O los encontramos a 1532 cm^{-1} , en 1450 cm^{-1} se encuentra el balanceo de C-H del grupo metileno, y en 1278 cm^{-1} a la señal del C-C-O (Arayne et al., 2008). Por otro lado, a 2606 cm^{-1} encontramos el estiramiento de O-H-C, en 1087 cm^{-1} encontramos el balanceo en el plano del grupo O-H, mientras que en 1224 cm^{-1} encontramos los estiramientos en el plano del ciclohexano (Muthu & Prabhakaran, 2014)



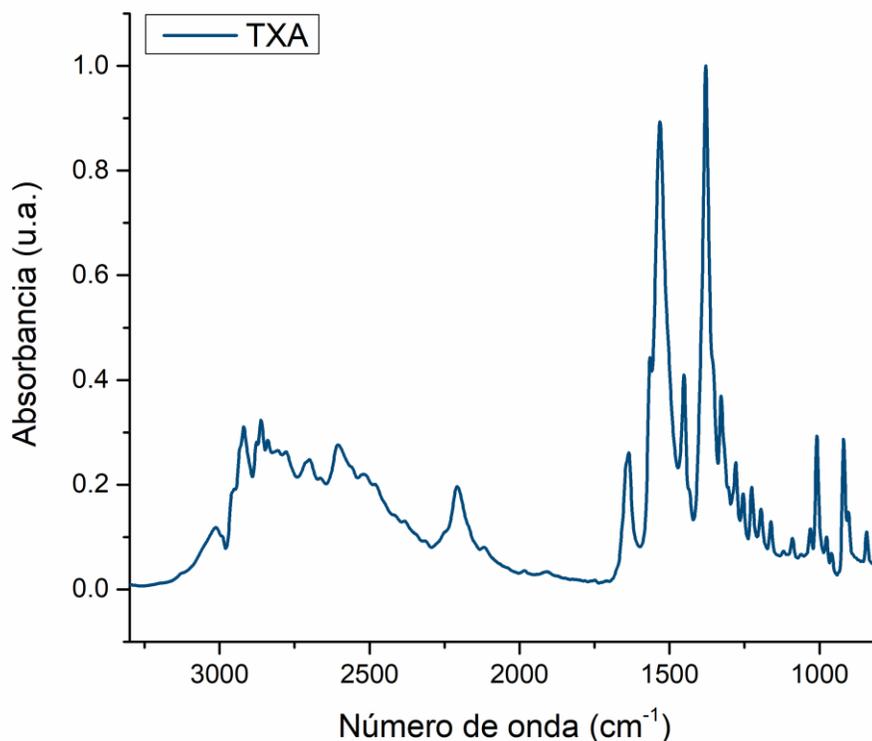
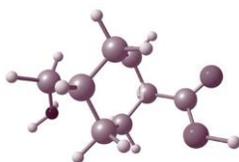
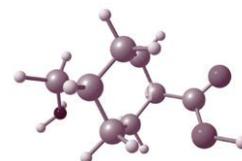


Figura 28. Espectro IR de Ácido Tranexámico en polvo.

De este mismo modo se observa en la Figura 29 la interacción de los polímeros utilizados y TXA. Se puede observar un corrimiento en comparación a la muestra sin TXA (línea azul cielo) con la muestra que tienen TXA (línea turquesa) de las señales en 2859 cm^{-1} correspondiente a estiramiento de C-H, en 1532 cm^{-1} correspondiente a la vibración amina II y en 1380 cm^{-1} del correspondiente al grupo C-O; el corrimiento se observa a la derecha, lo que implica que se requiere menor energía para generar el movimiento, que se refleja en mayor movimiento de estos grupos funcionales (Zhong et al., 2019).



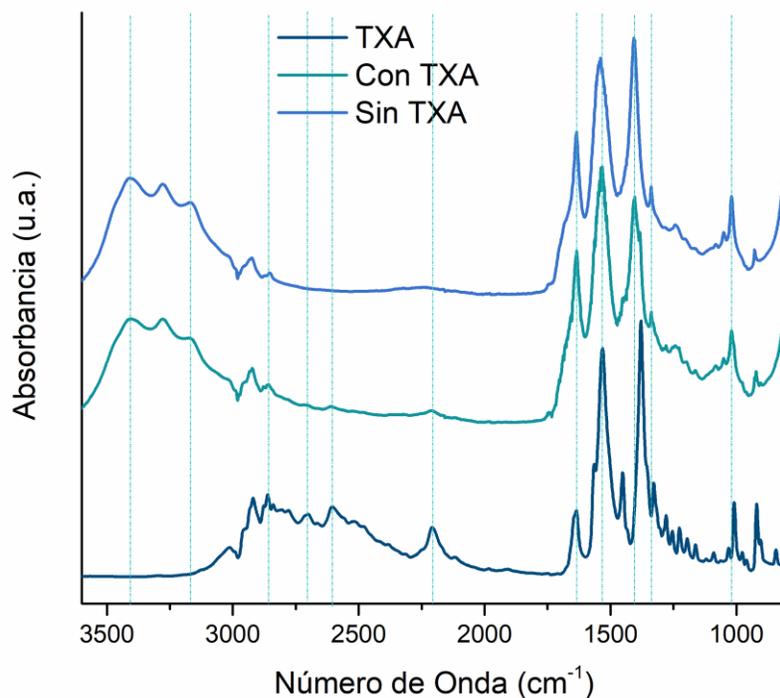
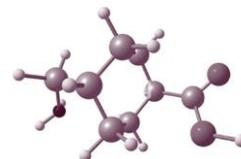


Figura 29. Efecto del ácido tranexámico en la membrana polimérica de colágeno y quitosano.

Por otro lado, en el fármaco encontramos una señal en 2208 cm^{-1} que se atribuye al movimiento de C-H del ciclohexano, y esta señal permanece, aunque con menor intensidad en el composito. Se puede decir que el ácido tranexámico interactúa de manera intermolecular por puentes de hidrogeno entre los grupos carbonilo y amino de los polímeros y del fármaco.

ELECTROHILADO CON PBS, ETANOL Y ÁCIDO ACÉTICO

Para mejorar la morfología y repetibilidad de las fibras, se procedió a medir la conductividad de las soluciones utilizadas (Tabla 5), cambiando el disolvente utilizado a una solución de buffer de fosfatos (PBS) y etanol (Dong et al., 2011) en una relación 3:1.





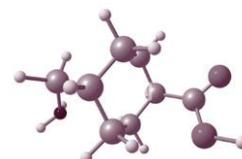
Estos disolventes demostraron repetibilidad de electrohilado en cada una de las soluciones con diferente concentración del fármaco.

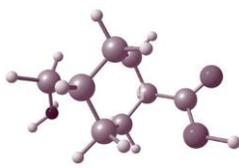
Tabla 5. Conductividad de soluciones a electrohilar.

Solución	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Electrohila
Quitosano	1 106	No
Q_C con acético	1 856	Si, no repetible
Q_C con PBS	7 370	Si
Q_C y 5 TXA	1 257	Si con pedida de material
Q_C y 10 TXA	1 737	Si con gotas en recolector
Q_C y 20 TXA	3 690	Si
Q_C y 30 TXA	5 770	Si
Q_C y 40 TXA	7 450	Si
PBS: etanol (3:2)	4 960	-

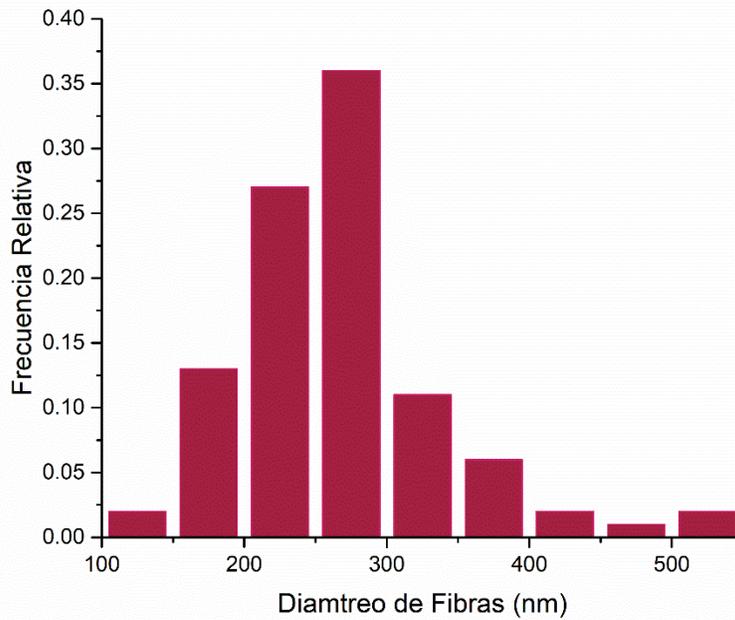
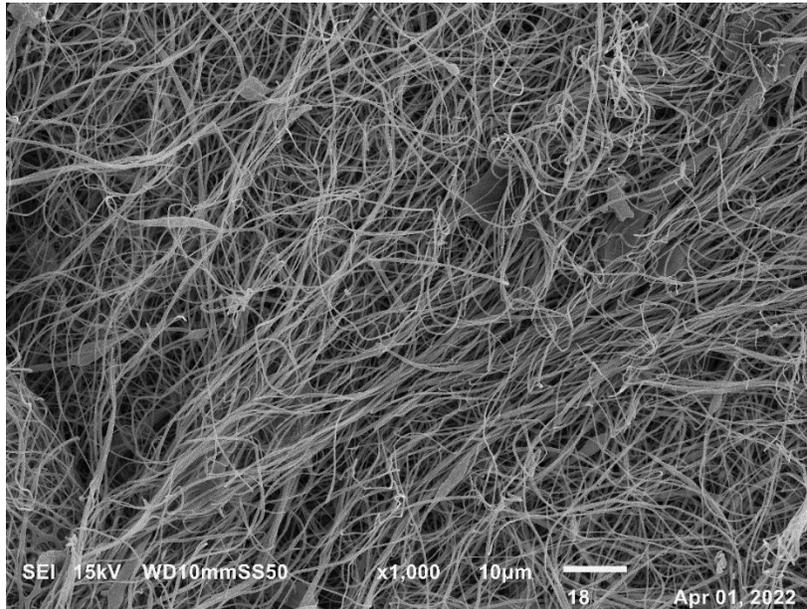
De la Tabla 5 se observa que el rango en que electrohilan los polímeros utilizados se encuentra entre 3000-8000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ya que a menor conductividad las soluciones no permiten electrohilar, y aun cuando las soluciones de ácido acético permitieron electrohilar no son soluciones repetibles.

Por esto mismo, las soluciones en este rango de conductividad permitieron obtener membranas repetibles. La solución de los polímeros (colágeno y quitosano) que permitió electrohilar una membrana se obtuvo con las concentraciones de 50 % w/v colágeno, 0.4 % w/p quitosano además de añadir 20 μL Triton x100 por 1 ml de la mezcla de polímeros. En la Figura 30a, se observan las fibras obtenidas de colágeno-quitosano, las cuales tienen un diámetro de 265.708 ± 70.62 nm (Figura 30b).





a)

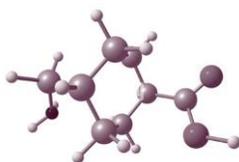


b)

Figura 30. Distribución de diámetro de fibras, a) micrografía de SEM de membrana de quitosano/colágeno y b) histograma de diámetro de fibras de Q-C.

Para determinar la interacción de los polímeros utilizados podemos observar el espectro infrarrojo en la Figura 31, donde observamos un corrimiento a la izquierda de la señal del grupo amina I (1629 cm^{-1}) del colágeno, así como un corrimiento del





grupo amina III y disminución de intensidad del estiramiento de C-N en 1234 cm^{-1} ; por otro lado las señales correspondientes al grupo -OH disminuyen su intensidad indicando menos libertad de movimiento así como interacciones electrostáticas con el grupo amina.

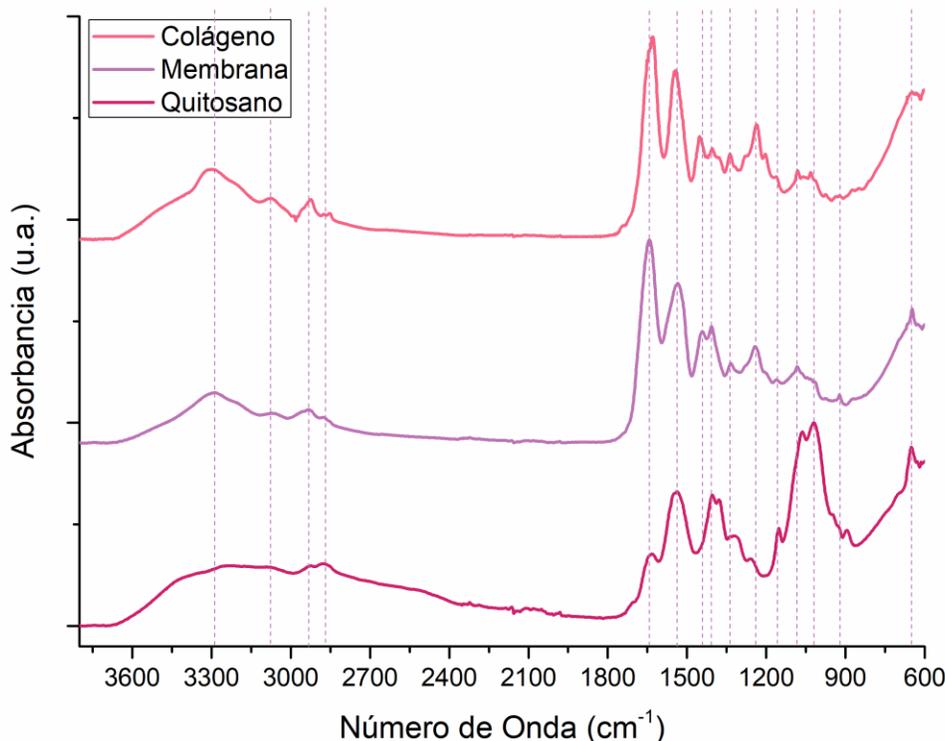
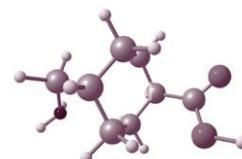


Figura 31. Espectro infrarrojo de membrana de colágeno-quitosano disueltos en PBS: etanol: ác. acético.

Como comparación entre los disolventes utilizados obtenemos el espectro infrarrojo de la Figura 32, donde se observa una mayor intensidad en los grupos amina, tanto I, II y III, esto se atribuye a la concentración de colágeno y a una desnaturalización de este debido a la alta concentración de ácido acético (70% v/v); lo que provoca un rompimiento en la triple hélice del polímero en los enlaces glicosídicos C-O-C representados por las señales en 1377 y 1160 cm^{-1} . De esta manera podemos explicar la repetibilidad del electrohilado de los





polímeros, debido a que se conservan las características moleculares del colágeno al mantenerlo en un pH no menor de 5.

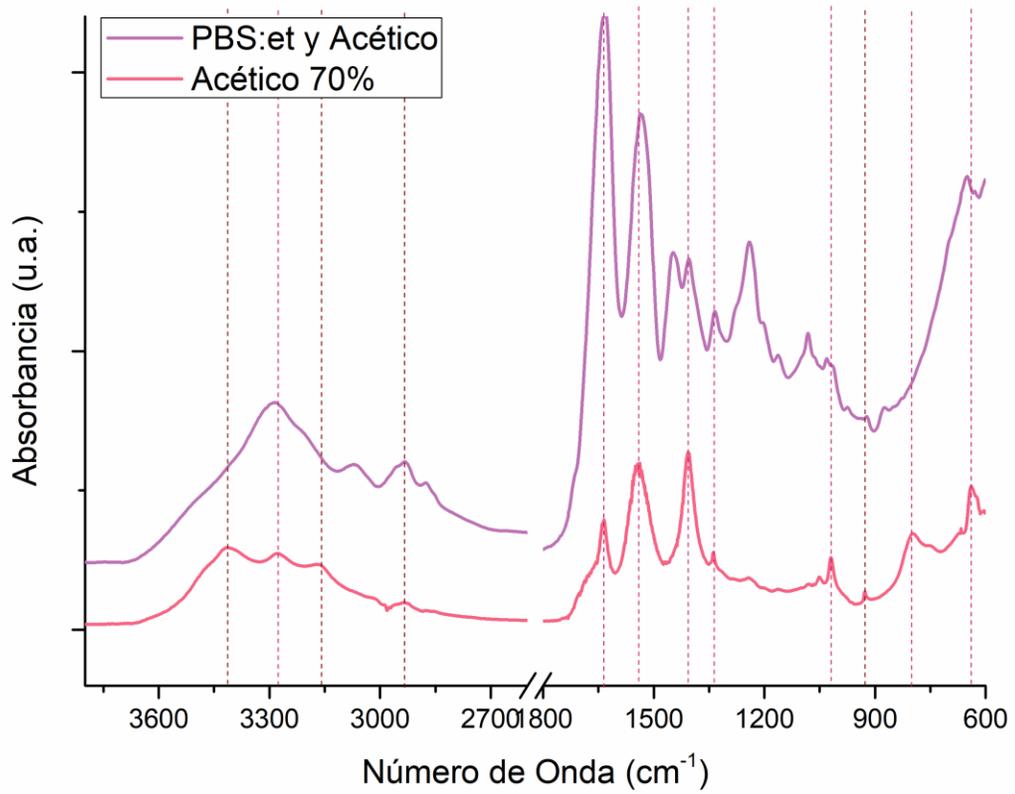
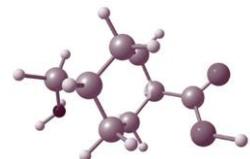


Figura 32. Espectro infrarrojo comparativo de los disolventes utilizados para electrohilado de colágeno-qitosano.

NANOFIBRAS ADICIONADAS CON FÁRMACO





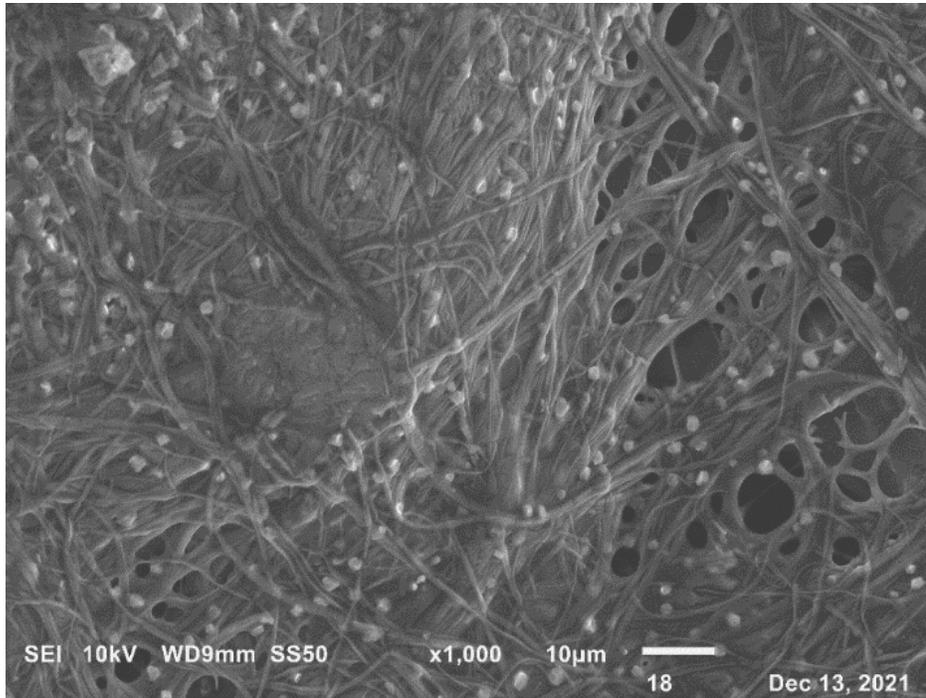
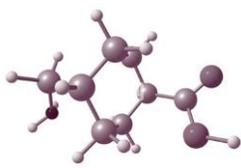
Una vez definidas las concentraciones de los polímeros se añadió el fármaco. Las membranas adicionadas con TXA se muestran en la Figura 33, donde se observaron fibras con partículas del fármaco y residuos de los cúmulos poliméricos. Así como un aumento en la capacidad de electrohilado de la solución conforme aumenta la concentración del TXA, debido a un mejor enrejado de las fibras al aumentar la concentración del fármaco, lo que su vez se atribuye a una mayor conductividad de la solución.

De modo que el diámetro obtenido en la membrana con 20 mg/ml de TXA puede ser distribuido en tres diámetros diferentes como se muestra en el histograma obtenido (Figura 34) cuyos valores son: 413.87 ± 111.62 nm, 757.75 ± 90.90 nm y 1112.65 ± 84.52 nm, estas distribuciones de tamaños se corroboran en Figura 33a donde encontramos fibras grandes (alrededor del 6%) pero a la vez hay un 31% de fibras formadas por fibras más delgadas que se enrollan entre sí; por otro lado, se puede observar que el tamaño de los cristales de TXA se encuentra en un diámetro de 105.389 nm \pm 21.802 nm distribuidos homogéneamente sobre la membrana (alrededor del 92% de cristales de TXA) así como adheridos entre los conjuntos de fibras.

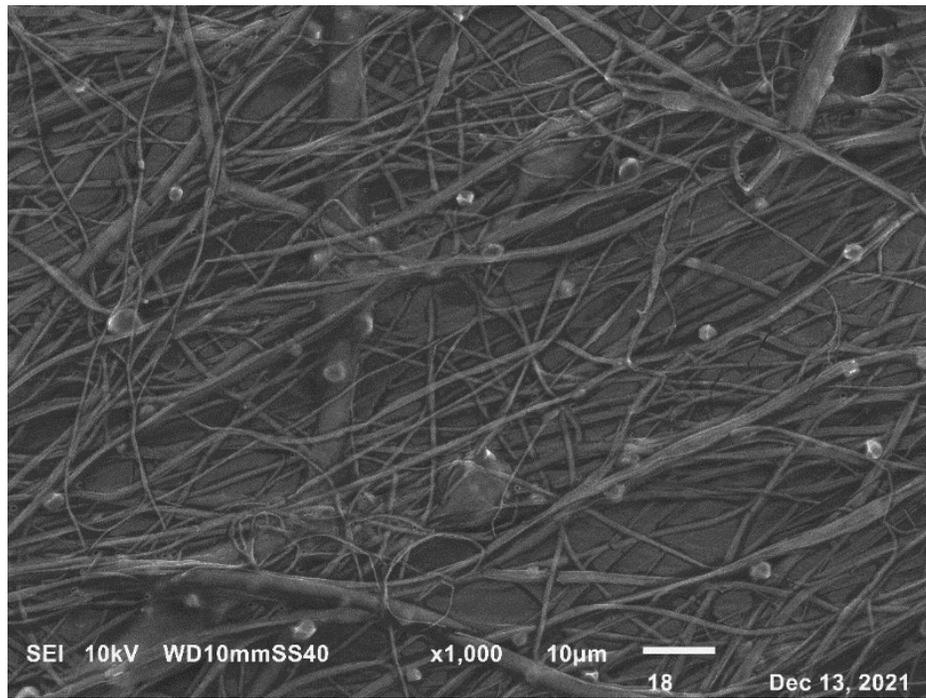
Posteriormente, se encontró que las fibras con 30 mg/ml de TXA tiene un diámetro (Figura 36) de 331 ± 101 nm, 755 ± 114 y 1332 ± 305 considerando la distribución de tamaño que se obtienen de las muestras, sin embargo, más de 62 % se encuentra en fibras entre fibras pequeñas las cuales se observan en la Figura 33b así como la disminución de fibras unidas; mientras que los cristales del fármaco tienen un diámetro de 112.2 ± 22.6 nm, los cuales los podemos observar en la Figura 35 que se encuentran pequeños cristales en la superficie de las fibras como puntos blancos sin embargo también se encuentran cristales de mayor tamaño sobre la membrana (72% de cristales de TXA) sin embargo en menor cantidad que la membrana de 20 mg/ml TXA.

a)

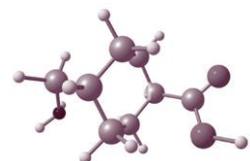




b)



c)



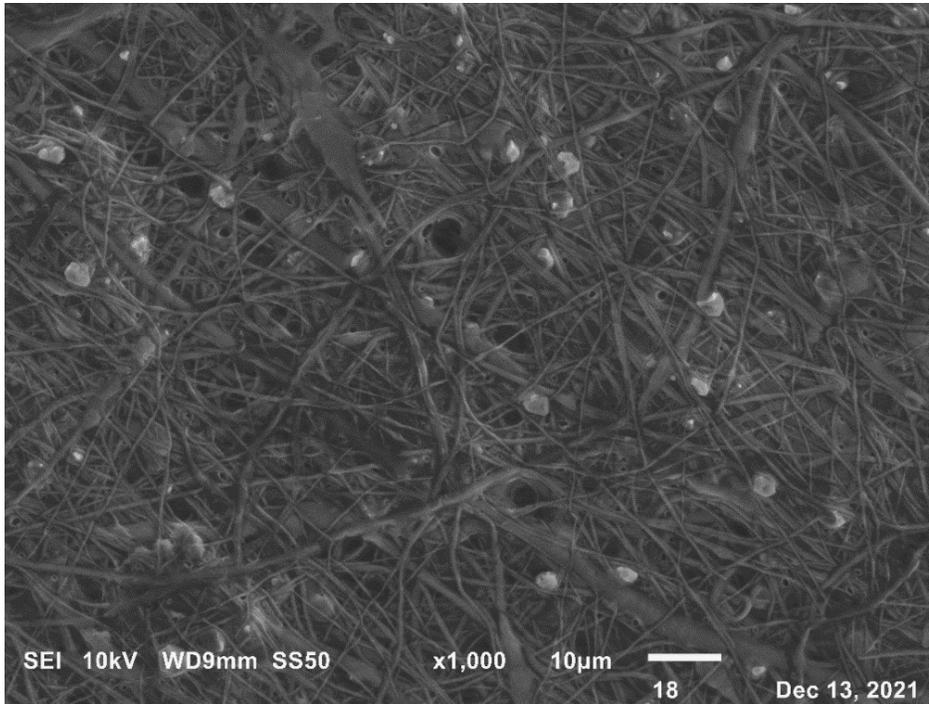


Figura 33. Microscopias de SEM de membranas de colágeno, quitosano y TXA: a) 20 mg/ml, b)30 mg/ml y c)40 mg/ml.

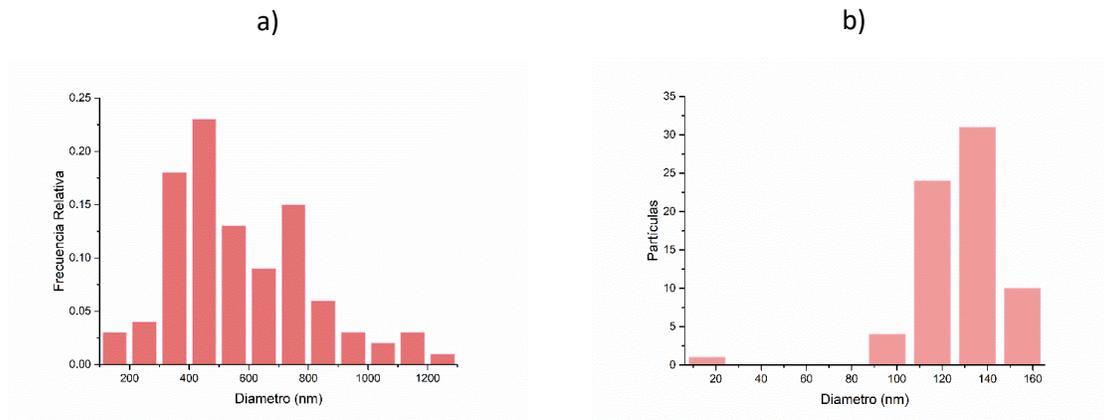
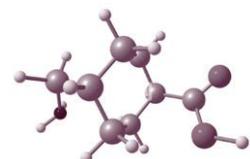


Figura 34. Histogramas de a) nanofibras de la membrana y b) partículas de TXA con concentración de 20 mg/ml.



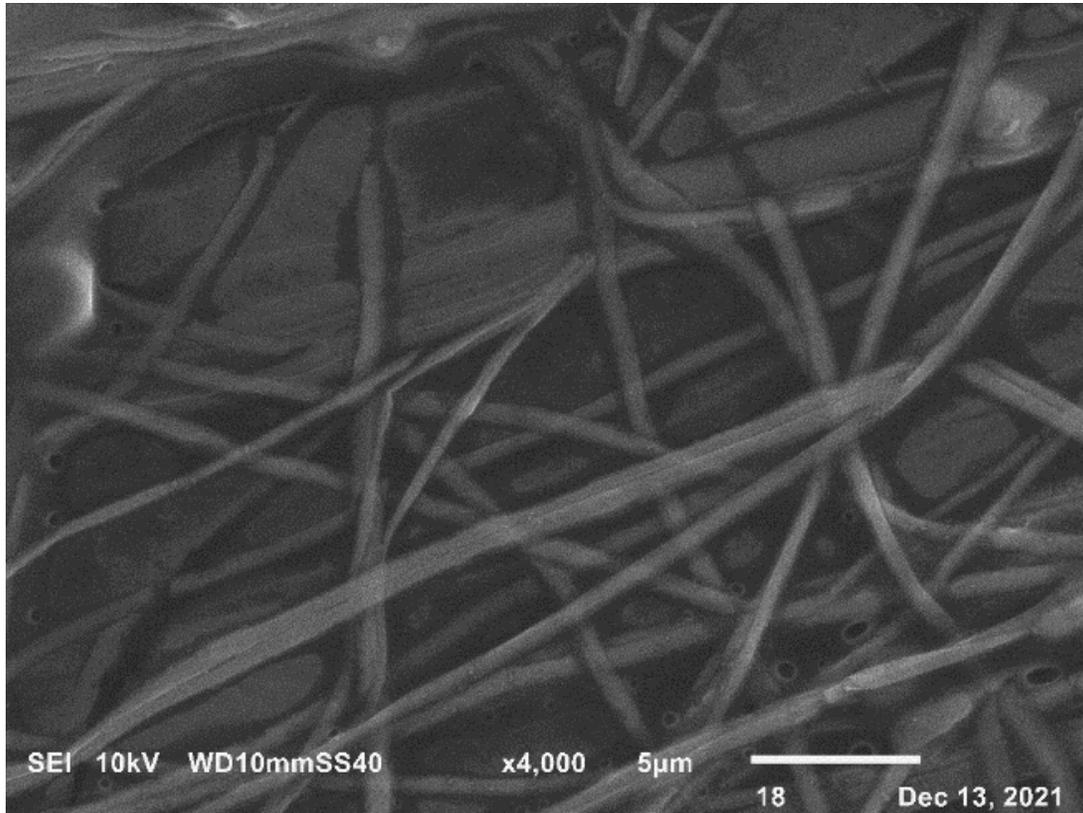
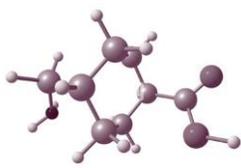
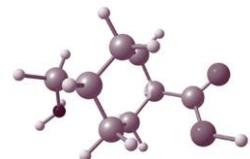
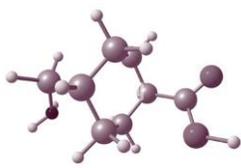


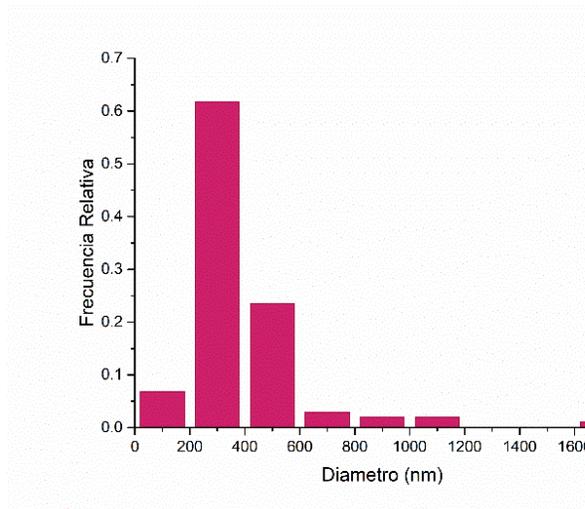
Figura 35. Micrografía de nanofibras de Q_C con 30 mg/ml de TXA.

Por último, se analizaron las fibras con una concentración de 40 mg/ml, las cuales obtuvieron diámetros de 375.92 ± 129.91 nm, 837.05 ± 161.75 nm y 1694.23 ± 464.70 los cuales se muestran en el histograma (Figura 37) mientras que en la Figura 33c se muestra la distribución mayor en fibras delgadas así como fibras formadas unidas formando fibras más gruesas; y las partículas del fármaco se encuentran en mayor cantidad y distribución homogénea sobre las fibras como se observa en la Figura 38 con un tamaño de 137.033 ± 22.318 nm, sin embargo, aún hay cristales con un tamaño mayor de 100 nm pero en menor porcentaje (alrededor de 27%) en comparación con las otras membranas.





a)



b)

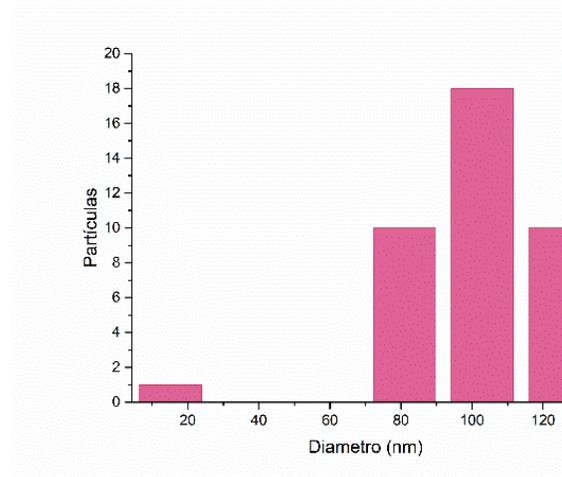
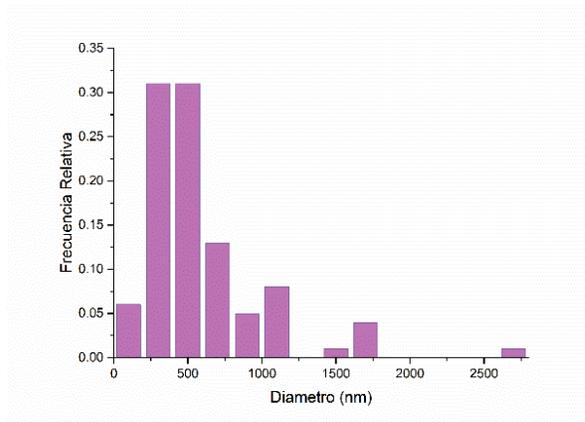


Figura 36. Histogramas de a) nanofibras de la membrana y b) partículas de TXA con concentración de 30 mg/ml.

a)



b)

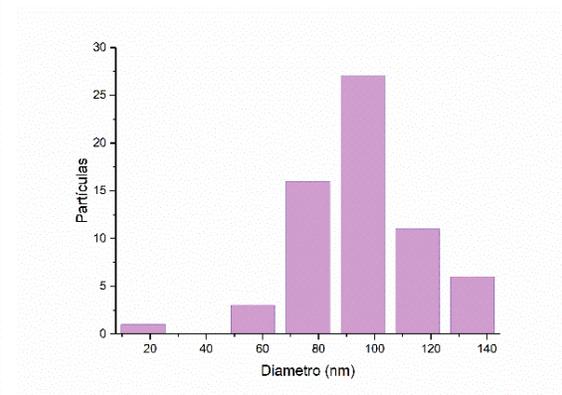
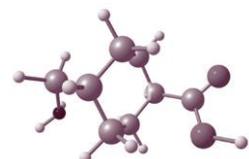


Figura 37. Histogramas de a) nanofibras de la membrana y b) partículas de TXA con concentración de 40 mg/ml.



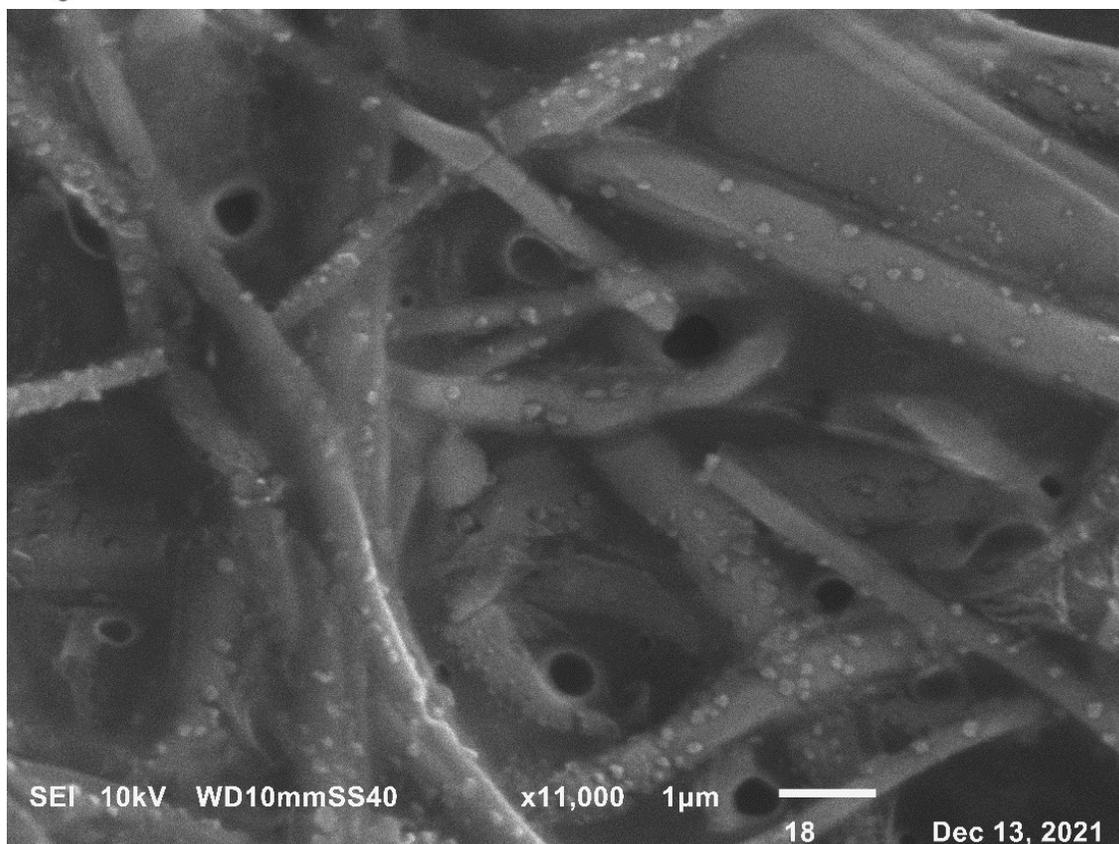
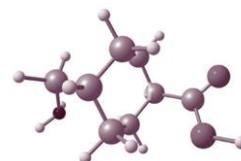


Figura 38. Micrografía de nanofibras con TXA distribuido en las fibras con una concentración de 40 mg/ml.

Posteriormente para evaluar la interacción de los polímeros con el fármaco se observa en la Figura 39 es espectro infrarrojo, donde los primeros cambios del espectro de la membrana con TXA se observan en un aumento de intensidad del grupo alifático en 2930 cm^{-1} donde se puede atribuir a señales características del fármaco, posteriormente se observa de igual modo aumento en intensidad y un ligero corrimiento en las señales correspondientes al grupo amida II y amida III y al estiramiento del grupo -C-O-C- (en 1403 cm^{-1}) así como el balanceo del mismo en 1100 cm^{-1} , esta mayor libertad de movimiento se puede atribuir a la presencia de interacciones intermoleculares entre el grupo amina de los polímeros y el grupo carboxilo del TXA.



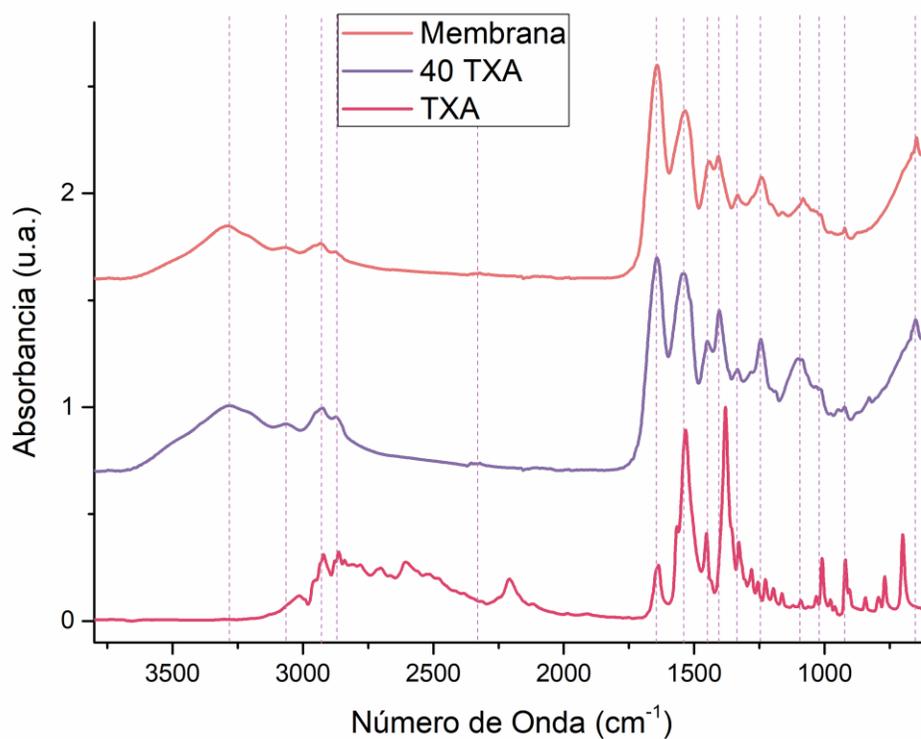
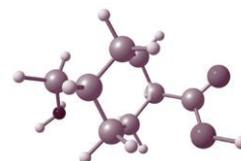
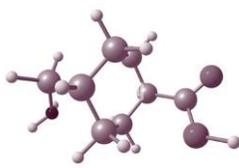


Figura 39. Espectro infrarrojo de interacción del fármaco con los polímeros quitosano y colágeno.

El ensanchamiento de la señal a 1100 cm^{-1} lo podemos atribuir a un solapamiento con las señales vibracionales del grupo O-H presentes en los cristales de TXA mencionados en las micrografías.





ENTRECRUZAMIENTO DE MEMBRANAS

Una vez obtenidas las membranas de colágeno y quitosano se prosiguió a entrecruzarlas por medio de luz ultravioleta con una longitud de onda de 253 nm. En la Figura 40 se puede observar un corrimiento en la señal a 1634 cm^{-1} la cual corresponde al grupo amida I y a la hélice α con el grupo funcional C=O, lo que está relacionado con el corrimiento de señal debido a que la luz ultravioleta produce radicales en los grupos aromáticos y estos a su vez pueden interactuar entre ellos de manera química lo que a su vez puede provocar desnaturalización del colágeno en su grupo amida I (Adamiak & Sionkowska, 2020). La presencia de los radicales se puede observar con un aumento en la intensidad de la señal a 1333 , 1240 y 1028 cm^{-1} los cuales corresponden a los estiramientos del C-O, C-N y O-H respectivamente.

Finalmente, se pueden observar en la Figura 41 los espectros infrarrojos de las membranas con TXA y entrecruzadas con TPP y UV, el cambio en las señales se observa en disminución

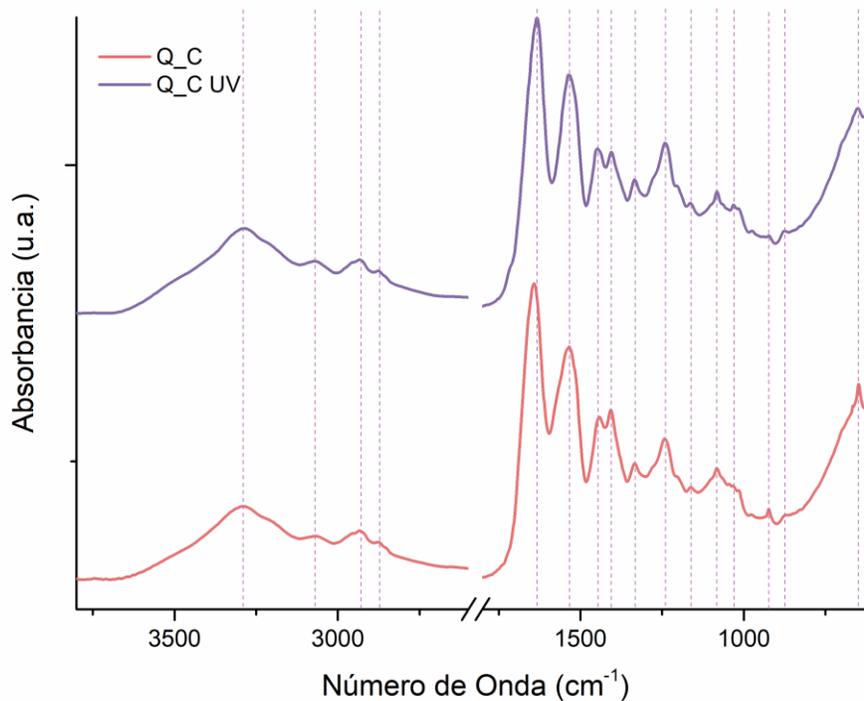
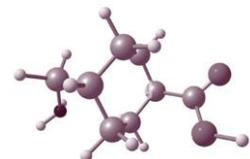
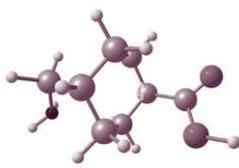


Figura 40. Espectro infrarrojo del efecto de luz ultravioleta en la membrana de quitosano-colágeno.





de intensidades del grupo amina I y II y el enlace glicosídico. Sin embargo, hay una mayor similitud de los espectros de 40 y 20 TXA al igual que en las micrografías SEM donde se observa una mayor incrustación del fármaco sobre las fibras y en general la membrana.

Mientras que la membrana 30 TXA conserva la señal en 1105 cm^{-1} la cual corresponde al grupo H-O, lo que podemos relacionar con señales de TXA los cuales no se encuentran interaccionando con las fibras como se observan en la micrografía, donde los cristales de TXA están sobre la membrana.

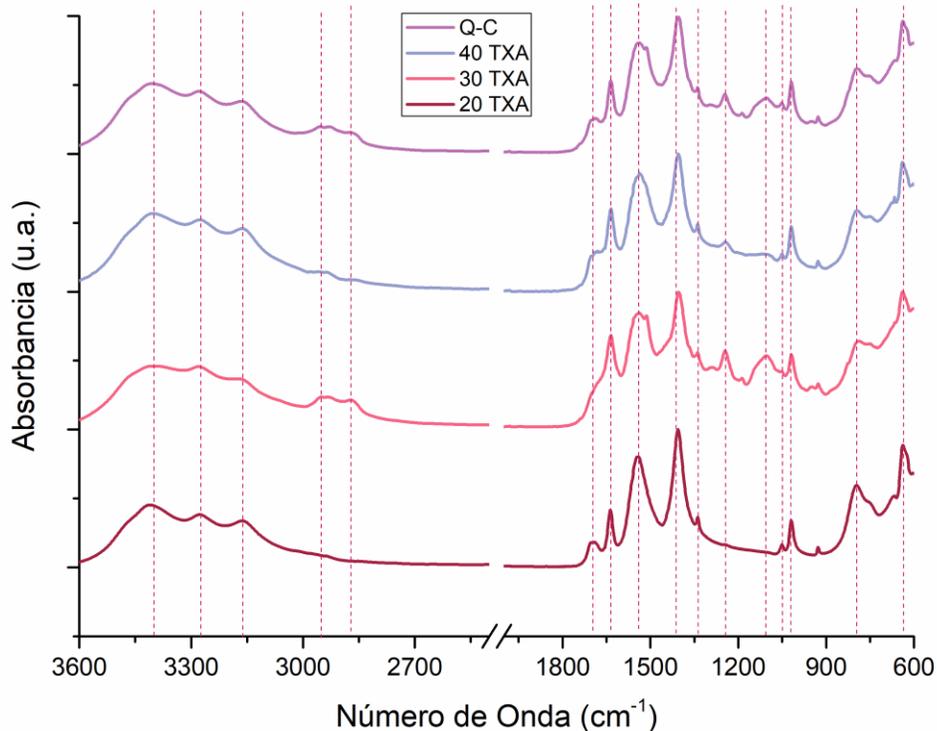
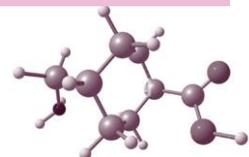
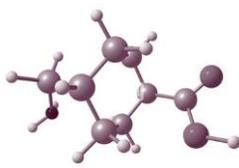


Figura 41. Espectros de membranas a diferentes concentraciones de TXA y la membrana de Q_C entrecruzadas con UV y TPP.

CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL COMPOSITO





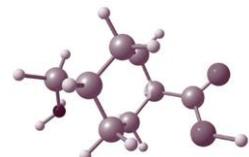
Además de las características ya descritas, se evaluó la tensión a la ruptura como caracterización mecánica del composito, así como la evaluación de porosidad y área superficial del mismo para relacionarlo con la absorción de agua y encontrar su índice de hinchamiento.

TENSIÓN EN LA RUPTURA

En la Figura 42 se observa la tensión en la ruptura que tiene el composito de colágeno adicionado con las membranas obtenidas de colágeno-quitosano, así como con el ácido tranexámico en diferentes. Se obtuvo un aumento de tensión al adicionar la membrana de colágeno_quitosano sobre la película de quitosano debido a que la película de quitosano tiene una tensión de 0.3658 MPa relacionada a los valores reportados, mientras que la tensión del composito sin fármaco tiene una tensión de 1.8142 MPa, es decir, hay un aumento del 506%. Sin embargo, la tensión al añadir TXA comienza a disminuir, desde la concentración de 5 mg/ml hasta 40 mg/ml, disminuyendo alrededor de un 53%, debido que llega una tensión de 0.8553 MPa.

Como se observa la tensión disminuye en concentraciones mayores de TXA, sin embargo, aún se encuentran sobre la película de quitosano en un 234%. Esto se atribuye a la distribución del fármaco sobre las todas las fibras no solo sobre la membrana que provocan esta disminución en sus propiedades mecánicas, mientras que las membranas con menor fármaco tienen al fármaco distribuido en cristales más grandes sobre la membrana con el caso de la concentración de 20 mg/ml, es decir, que las fibras se encuentran libres conservando una mayor fuerza de 545% arriba de la muestra de quitosano.

Estos valores de tensión se encuentran dentro de los valores reportados sobre membranas de colágeno y quitosano con datos de 1.35 MPa (J. P. Chen et al., 2008),





mientras que las membranas de colágeno se han sido reportadas con una tensión alrededor de 1 MPa (Lin et al., 2013) al igual que los valores con mayor concentración de quitosano cuyo valor es de 0.8 MPa (Cai et al., 2010).

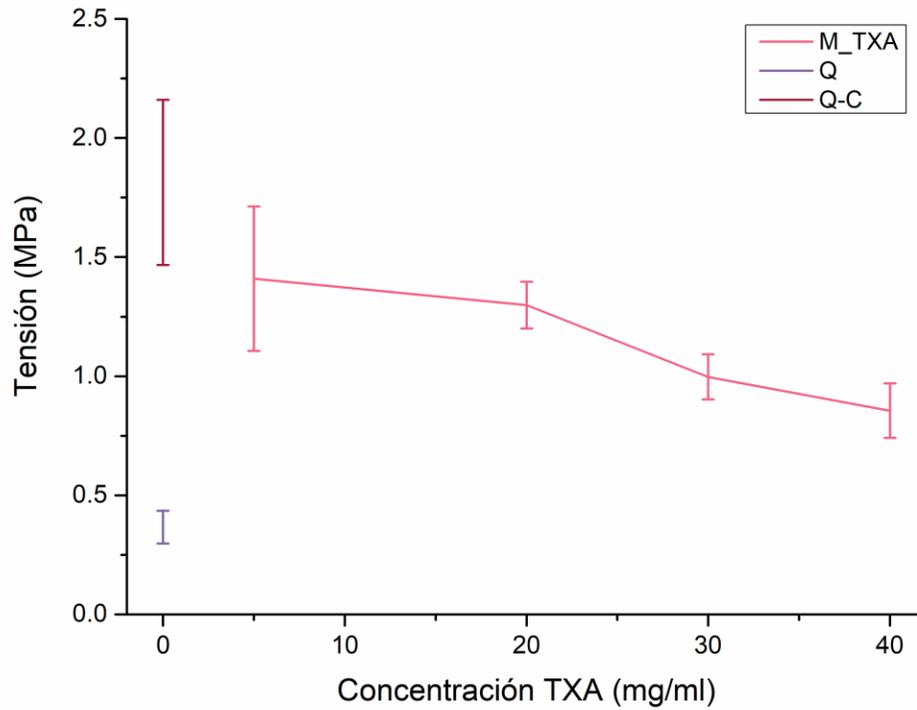
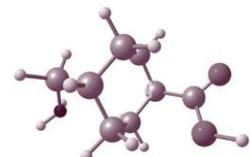


Figura 42. Tensión a la ruptura de membranas de colágeno_quitosano.

POROSIDAD Y ÁREA SUPERFICIAL

El método de caracterización de BET (Brunauer, Emmett and Teller) se utiliza para determinar el área superficial de las nanofibras o los cambios en la porosidad del material al ser sometido a la adsorción de gas (nitrógeno)(Jakubširc et al., 2012)⁴.

⁴ Descripción del proceso de caracterización en Anexo III





Las isothermas obtenidas se muestran en la Figura 43, donde se observan los resultados de la membrana de quitosano y colágeno sin TXA, así como las membranas en combinación con TXA a las concentraciones de 40, 30 y 20 mg/ml.

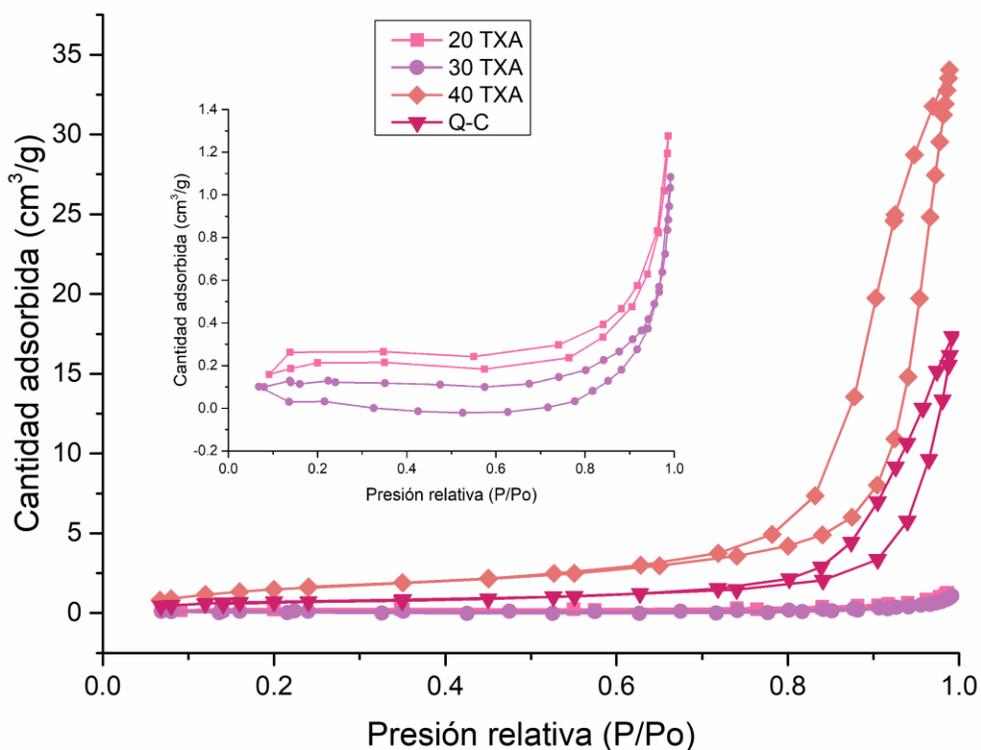
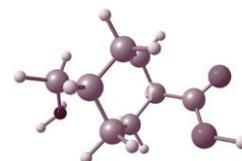
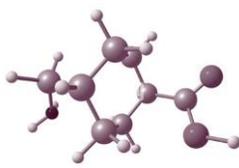


Figura 43. Isothermas de las membranas con TXA (20, 30 y 40 mg/ml) así como quitosano-colágeno.

Las características de las isothermas pueden ser clasificadas en tipo IV de acuerdo con la clasificación de la IUPAC (Lopez, 2004; Martínez Martín, 1990). Este tipo de isothermas tiene las características de representar materiales que adsorben en múltiples capas, por lo tanto, corresponden a materiales mesoporosos, los cuales tienen poros que se encuentran entre 2 a 50 nm; estos materiales producen el fenómeno de condensación capilar que da lugar a la aparición de la rama de desorción.





Tiene un lazo de histéresis donde existen dos ramas, una de adsorción y la otra de desorción, la cantidad adsorbida a una presión relativa sobre la rama de desorción es mayor que sobre la rama de adsorción (Lopez, 2004), en la Figura 43 se observa lo que corresponde a una histéresis tipo H3, la cual está relacionada con arreglos de poros en placas paralelas, que se encuentra relacionado a la morfología de la membrana de nanofibras.

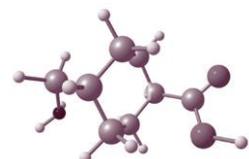
Las muestras de 20 y 30 TXA producen la presencia de la rama de Dubinin la cual está relacionada con la condensación en macroporos y está presente en las presiones relativas altas a partir del punto de unión de la rama de adsorción y desorción hacia arriba.

A partir de este tipo de isoterma IV se puede calcular la superficie y distribución de poros, que se muestran en la Tabla 6 para comparar el área superficial de las membranas donde 40 mg/ml TXA y Q_C tienen la mayor área superficial, esto lo podemos relacionar con las micrografías obtenidas debido al diámetro obtenido donde más del 70% se encuentra en un diámetro de 375.92 ± 129.91 y los cristales del TXA se encuentran distribuidos de manera homogénea; a diferencia de las otras membranas donde el fármaco se encuentra distribuido en cristales más grandes sobre la membrana lo que a su vez afecta la distribución de tamaños de las fibras y la aparición de impurezas.

Tabla 6. Área superficial y tamaño de poro obtenidos por BET.

Membrana (mg/ml)	Área Superficial BET (m ² /g)	Área superficial Langmuir (m ² /g)	Poros de Adsorción (nm)	Poros de desorción (nm)
40	6.7649	11.16	29.18701	29.05709
30	0.4483	0.6385	12.18373	7.52556
20	0.8536	1.3253	8.65053	6.02677
Q-C	2.9670	4.4955	32.40035	31.59619

ÍNDICE DE HINCHAMIENTO



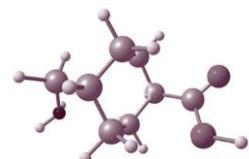


Se prosiguió a evaluar el índice de hinchamiento para determinar la capacidad de adsorción de líquidos que puede tener el compuesto. Los resultados obtenidos muestran que alrededor de los 40 min las membranas comienzan a equilibrarse debido a que el incremento es menor en comparación con los siguientes minutos, y es a los 50 min cuando todas las membranas alcanzan su máxima absorción de agua.

Debido a la presencia de la película de quitosano como matriz del refuerzo polimérico de nanofibras se puede comparar el índice de hinchamiento del quitosano que dio como resultado un valor de 8934% mil veces mayor a los valores reportados (Li et al., 2015), así como la reducción al incrementar la concentración de colágeno en un compuesto de quitosano-colágeno (X. Wang et al., 2011). Sin embargo, en el compuesto obtenido al añadir la membrana de colágeno aumenta alrededor del 500%, lo cual lo podemos atribuir a la presencia del quitosano en la membrana como se observa en la Figura 44.

Por otro lado, la composición del fármaco muestra una disminución del índice de hinchamiento, la concentración de 40 mg/ml es 57% mayor a la concentración de 30 mg/ml el cual a su vez es 7% mayor a la muestra de 20 mg/ml.

Esta capacidad de absorber agua la podemos relacionar con la morfología de las fibras cuyos diámetros son mayores en 40 TXA y disminuyen al disminuir la concentración de TXA. El mismo efecto que presentan las membranas en su tensión de ruptura.



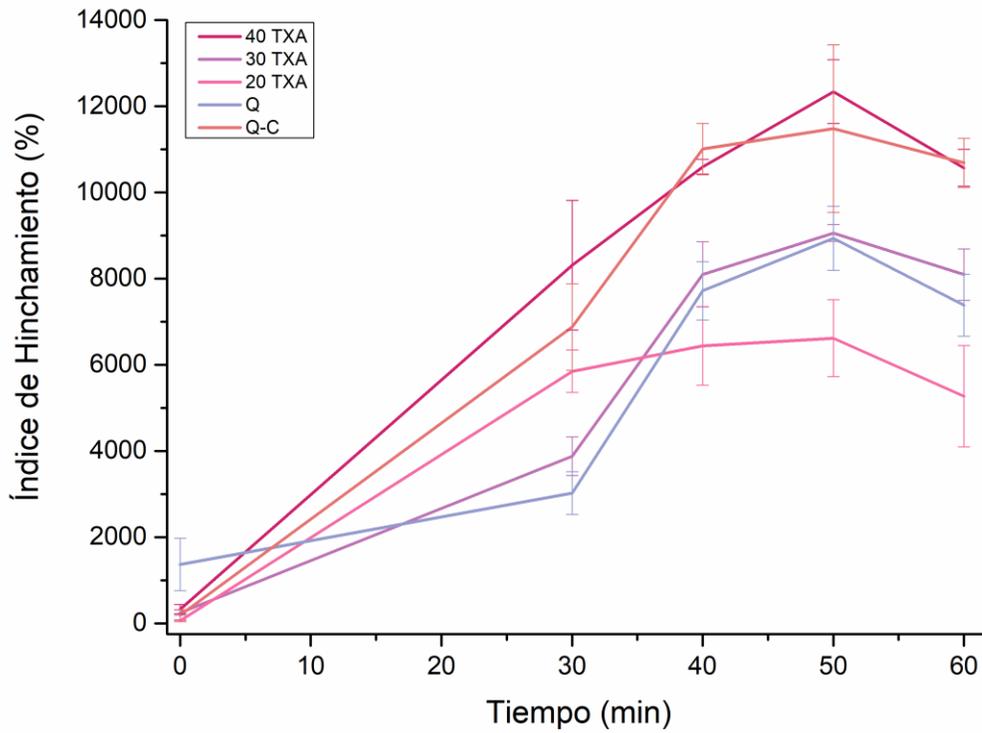
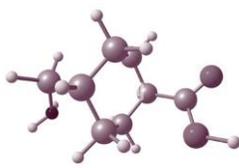
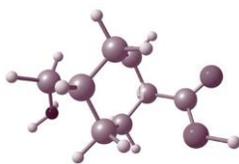


Figura 44. Índice de hinchamiento de las membranas.

Del mismo modo, este comportamiento de absorción de agua se puede relacionar con la porosidad y área superficial de cada membrana; debido a la mayor porosidad que tiene la membrana de 40 mg/ml le permite adsorber el porcentaje de líquido mencionado similar a la muestra de C-Q el cual corresponde al área superficial del compuesto.





EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA MEMBRANA

Como consiguientes caracterizaciones se evaluó su eficacia en liberación controlada del fármaco y su efecto citotóxico, de viabilidad y adherencia celular, capacidades importantes para ser poder ser definido como biomaterial.

LIBERACIÓN DE ÁCIDO TRANEXÁMICO

En primera estancia la curva de calibración del ácido tranexámico en la solución del flujo sanguíneo simulado se muestra en la Figura 45, donde el ajuste lineal nos da una r^2 de 0.997, valores con los cuales se puede proseguir a determinar las concentraciones de las alícuotas obtenidas durante la liberación.

Las alícuotas obtenidas fueron medidas en espectroscopía ultravioleta para convertir las absorbancias a concentraciones utilizando la ecuación del arreglo lineal y ver la liberación de TXA en cada membrana evaluada.

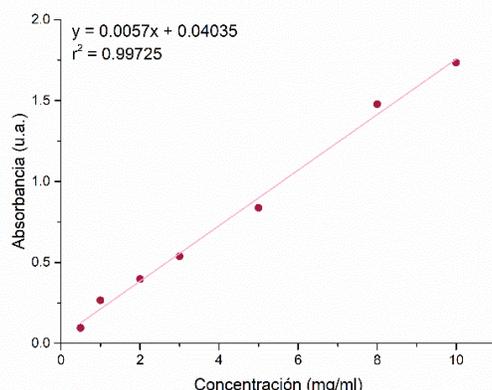
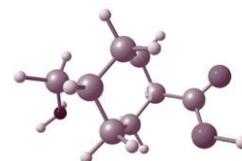
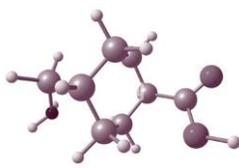


Figura 45. Curva de calibración de ácido tranexámico.





En la Figura 46 se muestra la desorción de TXA desde la membrana a la solución de flujo sanguíneo simulado, como se puede observar en las tres muestras la desorción se da en los primeros 60 min y después comienza a equilibrarse el sistema o hay una liberación total del fármaco. A los 60 min para el caso de la membrana de 40 mg/ml liberan el 65%, mientras que la membrana de 30 mg/ml libera el 100% y finalmente la membrana de 20 mg/ml libera el 82%.

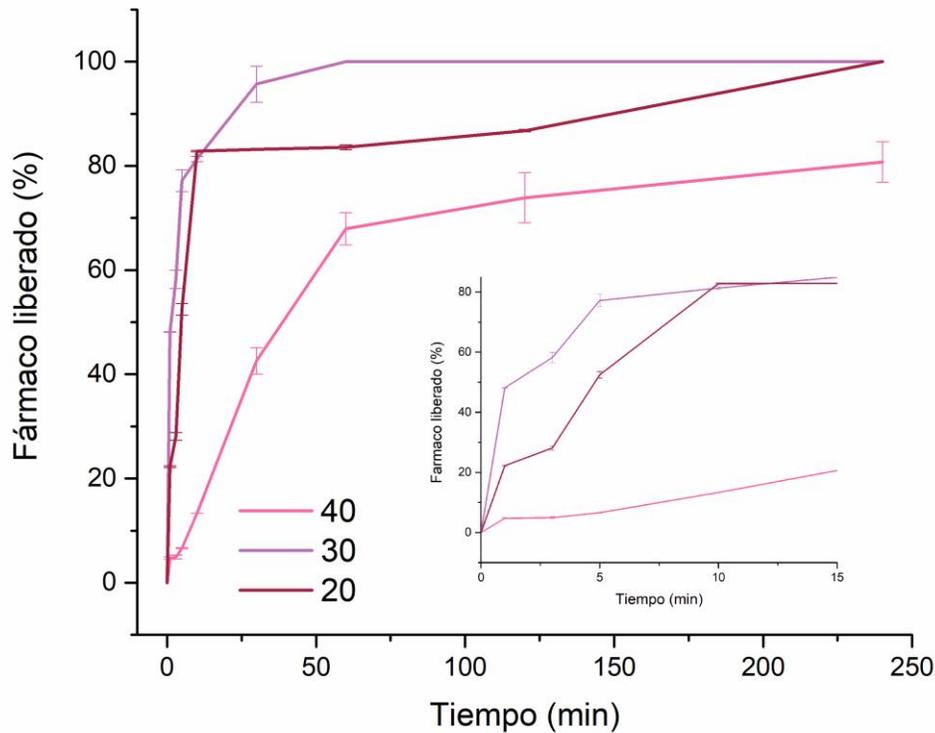
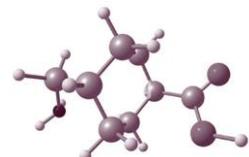
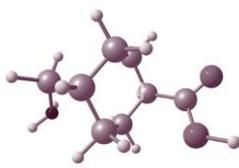


Figura 46. Perfil de liberación de ácido tranexámico de las membranas a tres concentraciones diferentes.

Mientras que en los minutos siguientes las membranas libera el fármaco restante, como en el caso de la muestra 20 TXA el cual a las 24 h libera el 100% de fármaco. En la Figura 47 se observa como las membranas de 20 y 30 liberan alrededor del 80% del fármaco en los 10





primeros minutos, este comportamiento similar lo podemos atribuir a la distribución del fármaco sobre la membrana, debido que en ambas membranas la mayoría del fármaco se encuentra en forma de cristales sobre la membrana a diferencia de la membrana de 40 mg/ml donde el TXA se encuentra distribuido en las fibras, lo que se refleja en una liberación menor del 10% en los primeros 10 min.

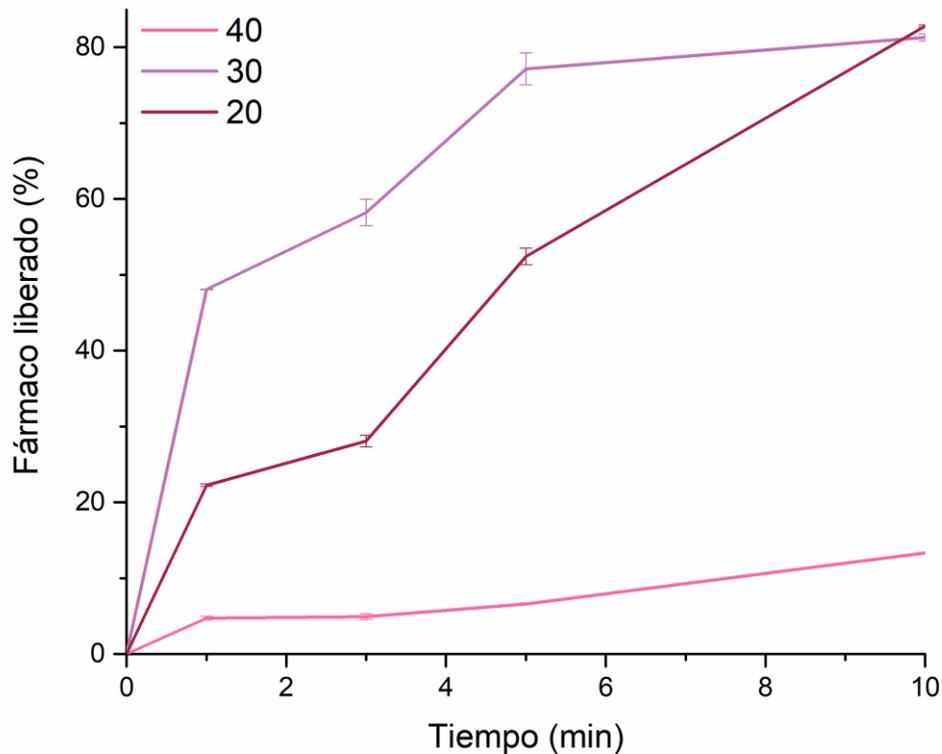
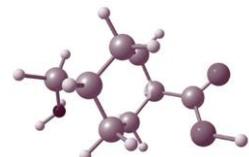
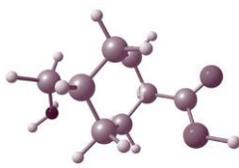


Figura 47. Perfil de liberación de TXA en los primeros 10 min.

Posteriormente se prosiguió a obtener las cinéticas de liberación de cada membrana. En la Figura 48 se muestran los ajustes del modelo cinético de Korsmeyer Peppas, el cual se eligió debido al ajuste de las tres membranas donde se observan que el proceso de liberación tiene un arreglo de tres etapas en todos los sistemas evaluados a diferencia de los otros modelos que mostraban más o menos etapas para todas las membranas. Este modelo cinético describe la liberación de fármaco de un sistema polimérico, el





cual realiza un ajuste lineal en el primer 60% del fármaco liberado mediante el cual se obtienen el exponencial indicativo del mecanismo de transporte del fármaco a través del polimérico(Okamoto et al., 1970).

Los sistemas arrojaron valores del exponencial menores a 0.5, lo que indica que el mecanismo de transporte es una difusión de Fickian con un mecanismo de liberación de difusión en una matriz hinchable, que a su vez corresponde a matrices cilíndricas(“Main Mechanisms to Control the Drug Release,” 2015). El proceso de difusión de Fickian consiste en un proceso de liberación rápida debido a una relajación de la cadena polimérica característico de un fenómeno de difusividad (Kharat A.R., 2014). Esto está relacionado con una rápida absorción en la superficie expuesta del polimérico, que se caracteriza por una alta velocidad del solvente en el interior de la matriz.

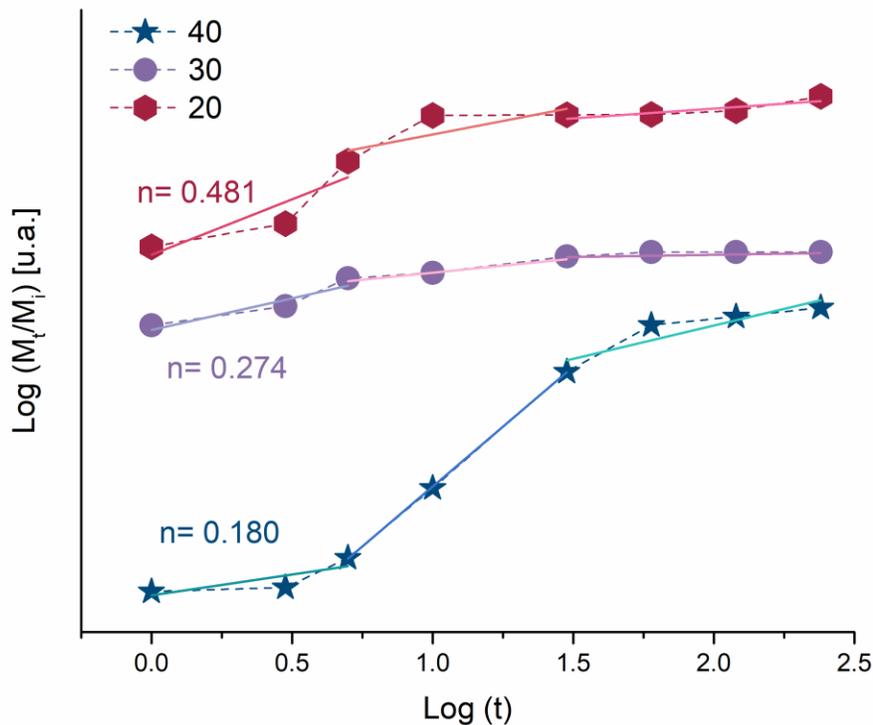
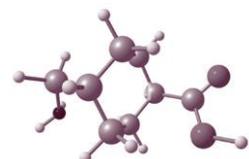
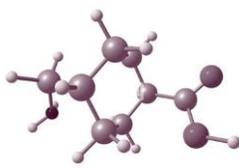


Figura 48. Modelo cinético Korsmeyer-Peppas de liberación de TXA de la membrana en flujo sanguíneo simulado.





Por otro lado, en la Figura 49 se muestran los ajustes lineales de cada membrana en menos del 60% de fármaco liberado (Kharat A.R., 2014) con los cuales se obtuvo las constantes de velocidad de liberación los cuales se muestran en la Tabla 7, donde se puede observar que la muestra de 30 mg/ml de TXA libera más rápido el fármaco el cual se puede comparar en la Figura 47 donde a los 5 min se libera alrededor del 78%.

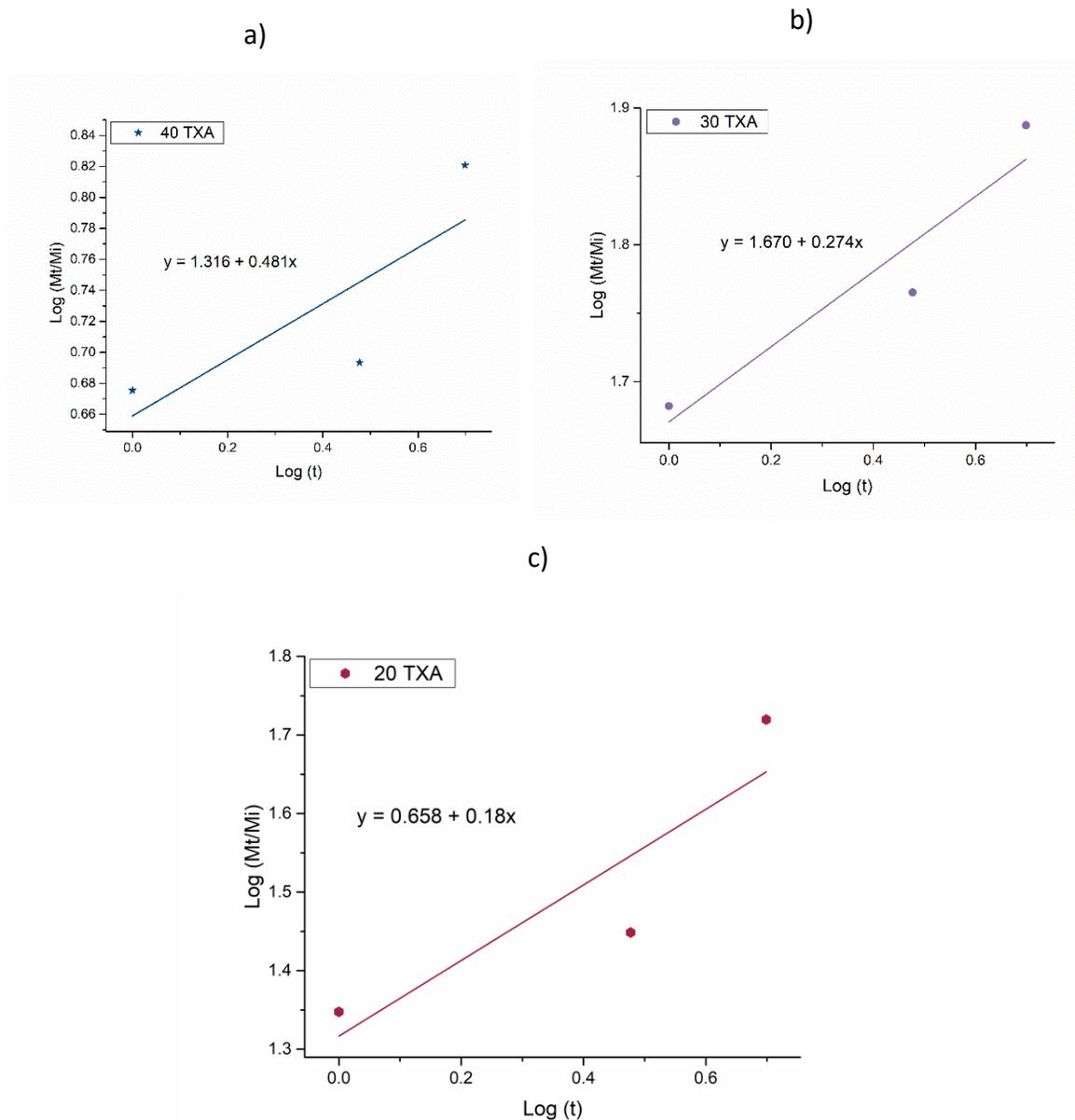
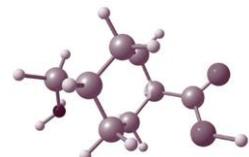


Figura 49. Ajuste cinético de exponencial del modelo Korsmeyer-Peppas de liberación de la membrana con: 40 TXA (a), 30 TXA (b) y 20 TXA (c).

Tabla 7. Valores de velocidad de desorción de TXA de la membrana.





Muestra	Velocidad de Desorción (min ^{-0.5})	Log(K)	Constante de velocidad (K)
40	0.180	0.658	4.549
30	0.274	1.670	46.773
20	0.481	1.316	20.701

Esto a su vez se puede atribuir a la distribución de los cristales del fármaco sobre la membrana y muy ligera sobre las fibras (menos del 30%). Mientras que la membrana de 20 TXA tiene partículas del fármaco sobre la membrana, pero estas se encuentran incrustadas sobre las fibras. En cambio, en la membrana 40 TXA los cristales del fármaco se encuentran distribuidos sobre la membrana explicando una liberación más lenta.

Por otro lado, con base a estos resultados y los espectros de infrarrojo se puede representar la liberación del fármaco como se muestra en la Figura 50 donde las membranas al entrar en contacto con un medio acuoso se hinchan y liberan el fármaco que se encuentra sobre la membrana, por lo cual, se obtiene una liberación rápida en los primeros minutos, posteriormente de manera más controlada se libera el resto del fármaco que se encuentra en las fibras, y finalmente posterior a 24 h se degrada la membrana (Luraghi et al., 2021; MOHAMED et al., 2022).



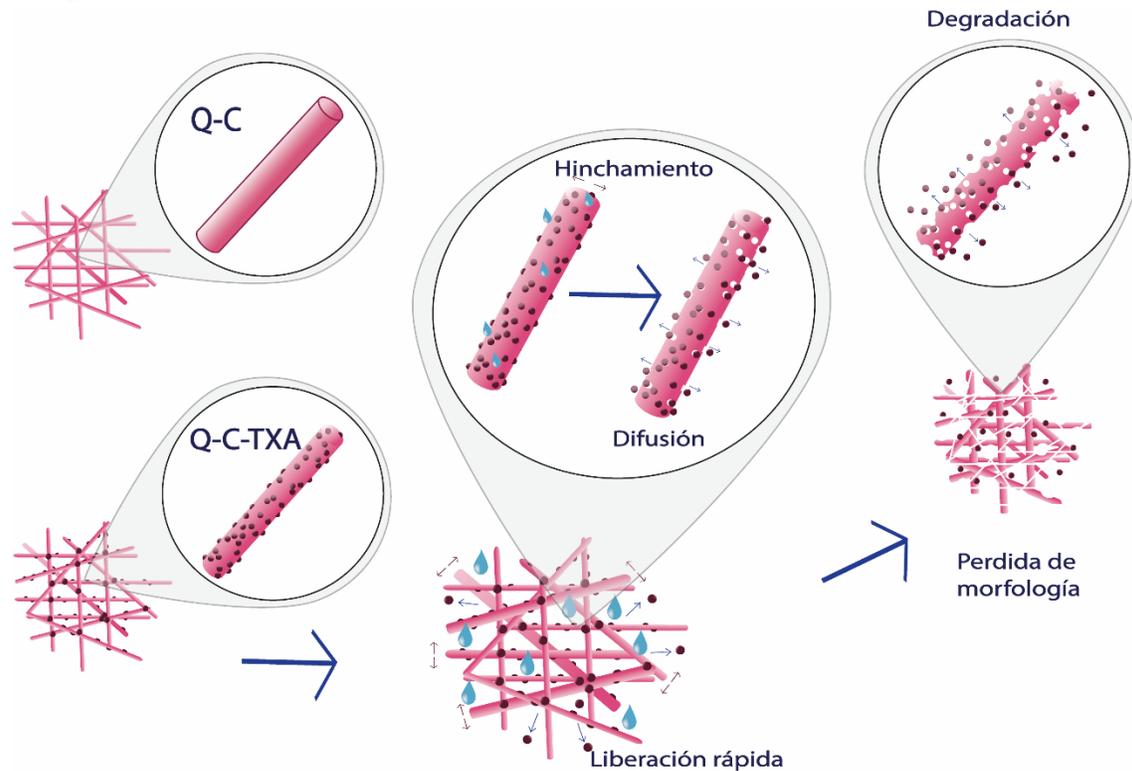


Figura 50. Diagrama ilustrativo de liberación y degradación de la membrana.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En la evaluación de la actividad antimicrobiana del composito se observó que las membranas al ser expuestas contra *S. aureus* (una bacteria Gram-positiva) es eficiente en las películas de quitosano y en las membranas de Q-C con 20mg/ml de TXA (Figura 51) en ambos casos la actividad más alta se observó a las 3 h con una actividad por encima del 70%; la actividad más baja se registró en las membranas de quitosano-colágeno pero con la adición del ácido tranexámico a las diferentes concentraciones la actividad antimicrobiana aumenta (Fatahian et al., 123 C.E.).

Así mismo se puede observar que todas las membranas con de Q-C con TXA poseen efecto antimicrobiano a las 3 h por lo cual se puede decir que en una exposición prolongada a las membranas las bacterias se verán afectadas.



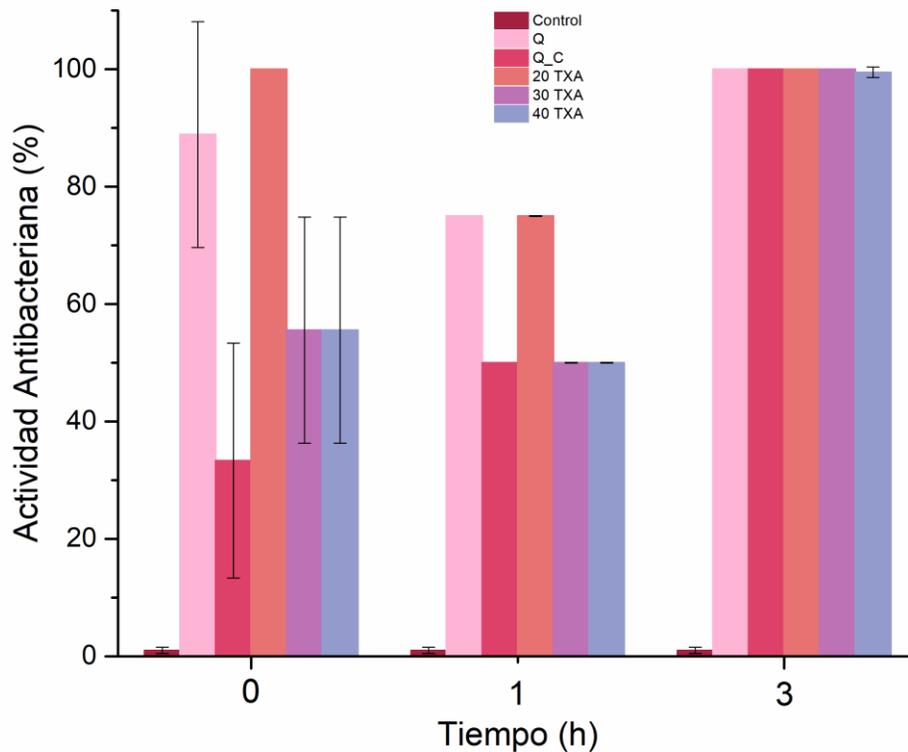
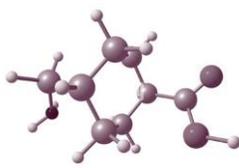
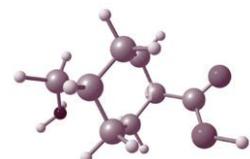
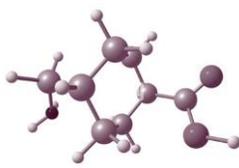


Figura 51. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las membranas Q (quitosano), Q-C (quitosano + colágeno), y membranas de quitosano + colágeno y ácido tranexámico contra *S. aureus* a diferentes tiempos (0, 1 y 3 h).

En el caso de *E. coli* que es una bacteria Gram-negativa se muestra un efecto antimicrobiano por encima del 60% en todas las muestras (Figura 52), tanto las membranas con TXA como la membrana de Q-C. En este caso las membranas que presentan mayor actividad son las de Q-C y las de 20 mg/ml de TXA, en ambas la actividad aumenta a las 3 horas. Mientras que en el caso de las membranas con 30 mg/ml de TXA se observó una actividad mayor a 1 h, en el caso de las que tienen 40 mg/ml se observó una disminución de la actividad a 1 h y después un aumento significativo a las 3 h.

Con base a los resultados se observa que las membranas si tienen un efecto negativo sobre las bacterias, tal cual lo menciona Michalska col. que las membranas hechas a base de quitosano y colágeno tiene la capacidad de inhibir el crecimiento





bacteriano tanto de bacterias Grampositivas como de Gramnegativas, además de no causar reacciones alérgicas sobre la piel (Michalska-Sionkowska, et al., 2018), por lo cual este sería una alternativa útil para el tratamiento de heridas.

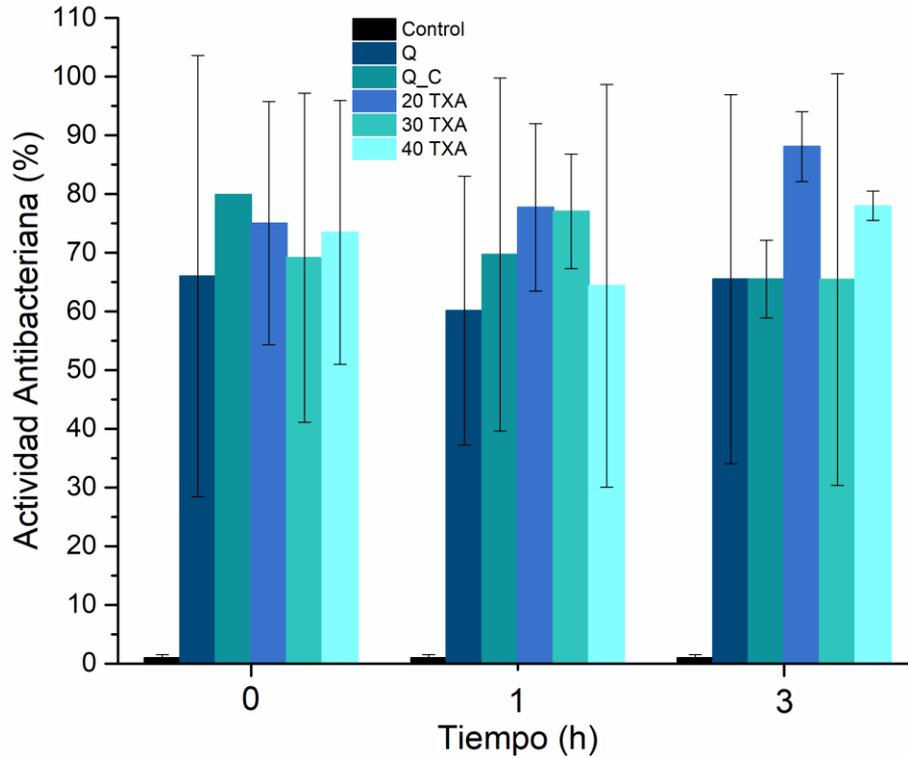


Figura 52. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las membranas Q (quitosano), Q-C (quitosano + colágeno), y membranas de quitosano + colágeno y ácido tranexámico contra *E. Coli* a diferentes tiempos (0, 1 y 3 h).





CITOTOXICIDAD Y VIABILIDAD CELULAR

La evaluación citotóxica del composito se realizó en tres experimentos, la primera corresponde a la evaluación del efecto dosis-respuesta de las membranas con diferentes concentraciones de ácido tranexámico los cuales dieron como resultados efectos mayores al 100% de viabilidad celular desde la primera hora (Figura 53) debido a la retención que ofrecen las membranas al contrario del blanco donde solo se quedan sobre el sustrato de la placa de 96 pozos. Debido a los cortos tiempos de evaluación no se pueden encontrar células adheridas, pero si dispersas sobre y entre la membrana como se muestra en la Figura 54, donde la coloración morada se puede atribuir a la presencia de células dentro de la membrana que liberaron MTT-formazan.

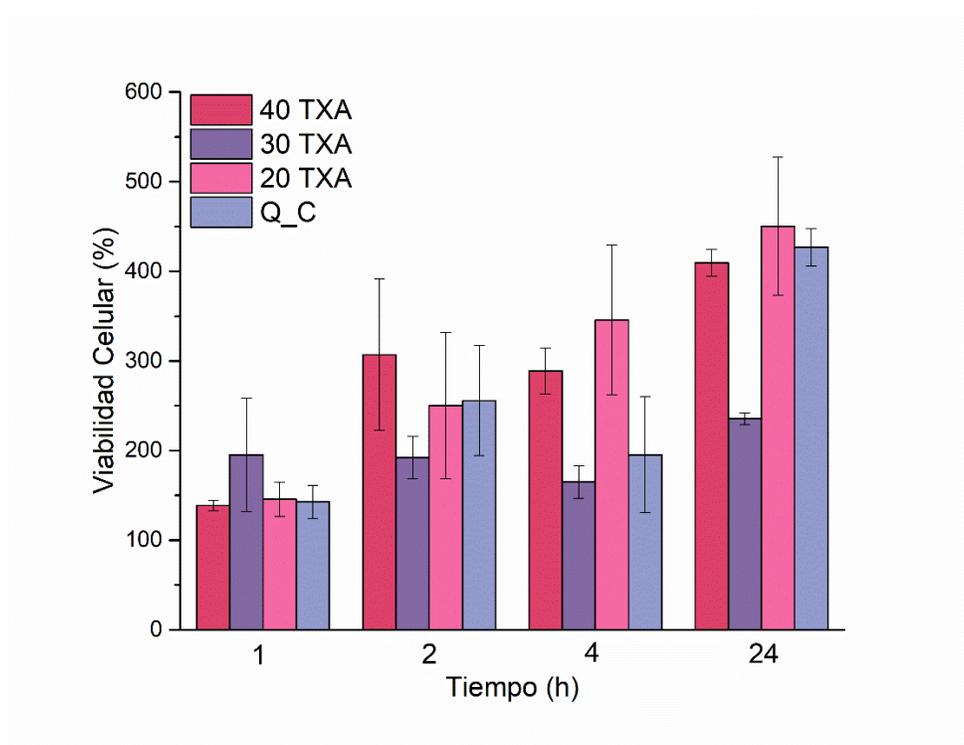
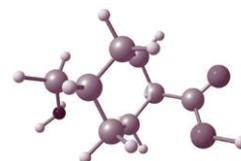
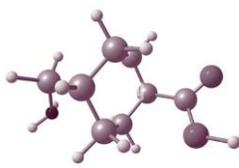


Figura 53. Gráfica de viabilidad celular dosis-respuesta de membranas con dosis de 40, 30 y 20 mg/ml contra el control de quitosano-colágeno (Q-C).





Al pasar 2 h hay un aumento en la viabilidad en todas las muestras que se puede atribuir a un acomodo de las células sobre la membrana, pero a diferencia a las 4 h debido a la porosidad de las membranas y el movimiento de las células, estas pueden seguir migrando y terminar fuera de la membrana, lo que da como resultado una disminución del porcentaje de viabilidad (Rashedi et al., 2021); salvo para la membrana de 20 mg/ml de TXA cuya membrana dio el resultado de menor porosidad lo que puede provocar mayor retención de células, además de ser la membrana con menor concentración del TXA por lo tanto su efecto es similar a la membrana sin fármaco.

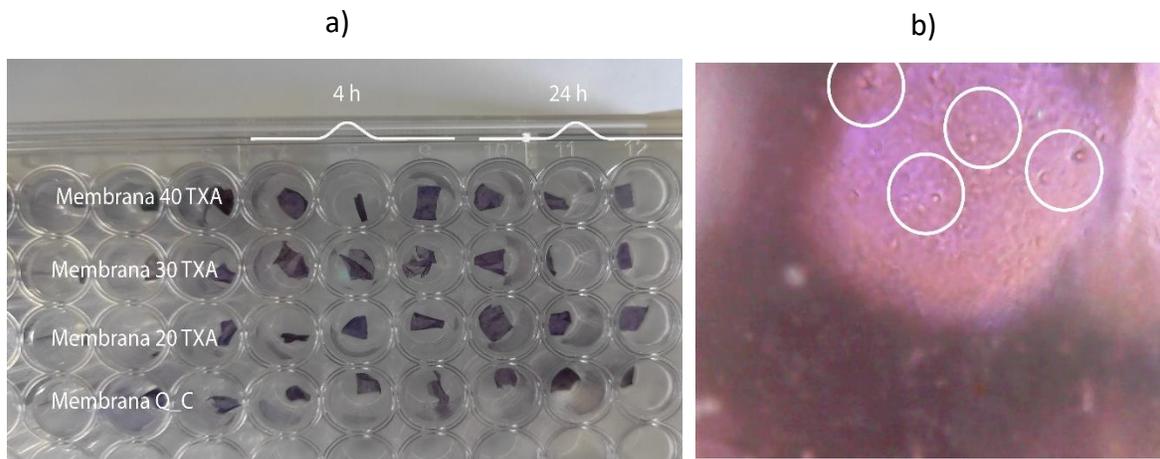
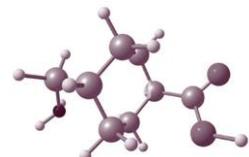


Figura 54. Fotografías de las membranas al terminar la evaluación citotóxica, a) membranas al pasar 4 y 24 h de interacción células-membranas, y b) microscopía óptica de las membranas a las 4 h de evaluación.

Por otro lado, a las 24 h se observa un aumento en la viabilidad que se puede atribuir al acercamiento con el tiempo de duplicación de las células OP9 que es de 26 h (OP9 | ATCC, n.d.), por eso el aumento significativo de alrededor de un 100% contra el blanco.

Posteriormente, la evaluación a diferentes días para completar ciclos de duplicación celular se observa en la Figura 55, donde en primera estancia es constante el efecto tóxico del control negativo (medio suplementado con heparina, un anticoagulante) debido que conforme transcurre el tiempo disminuye la cantidad de células vivas en ambas graficas (membranas evaluadas de 30 mg/ml de TXA Figura 55a y membrana con 40 mg/ml de TXA Figura 55b). Por otro lado, la membrana de quitosano-colágeno muestra

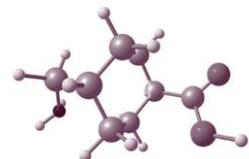


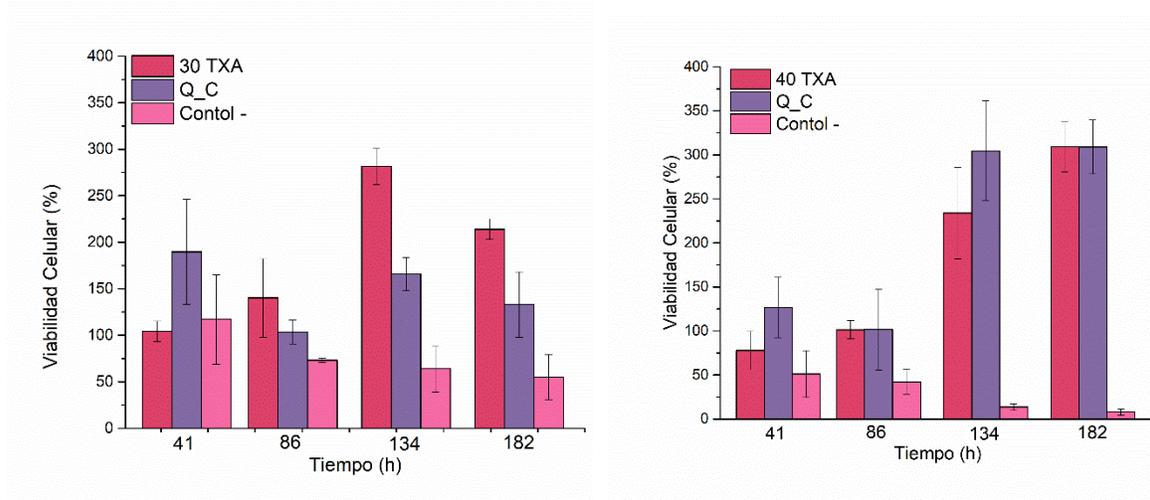
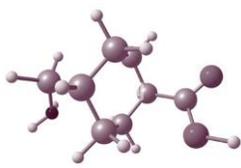


el mismo efecto de disminuir a las 86 h y aumentar a las 134 h en ambas gráficas que se puede atribuir el desplazamiento celular sobre la topografía creada por el acomodo de las fibras en la membrana y a la adherencia celular que comenzó al estabilizarse las células al medio utilizado; esto puede llevarse a cabo por la interacción de las glicoproteínas de los fibroblastos con la membrana, la presencia del colágeno permite que las células se adhieran por medio de integrinas, que son unos de los receptores extracelulares encargado de la adhesión celular, en este caso son los receptores con alta afinidad al colágeno (Panés, 1999).

Además, la morfología de fibras, su porosidad y ángulos entre las mismas provocan que las células encuentren la rugosidad para adherirse; la porosidad permite el flujo de los nutrientes del medio así como el flujo de desechos celulares; a la vez que los ángulos favorecen que los fibroblastos se adhieran y puedan moverse por la membrana, el grado entre los entramados de fibras son de $59 \pm 19^\circ$ (con un 60% para ángulos menores a 90°) y de $113 \pm 14^\circ$ (para los ángulos mayores de 90°), estos ángulos están relacionados con los ángulos de los brazos de los fibroblastos al adherirse sobre un sustrato.

Mientras que las membranas evaluadas (30 y 40 mg/ml TXA) muestran no tener un efecto citotóxico, debido a un aumento continuo de la viabilidad conforme pasan periodos de duplicación que a su vez está relacionado con la coloración morada de todas las membranas como se muestran en la Figura 55, esto nos indica que las células se pueden adherir y duplicar sobre las membranas o pueden migrar hacia ellas debido a esa afinidad de las integrinas con el colágeno. Del mismo modo, se observa un mayor porcentaje de viabilidad con una menor concentración del fármaco; sin embargo, a las 182 h hay aumento que se puede atribuir al deterioro de la membrana por la liberación del fármaco que deja un andamio con la rugosidad para que se adhieran las células.





Del mismo modo, se puede observar que a las 182 h las membranas con 40 mg/ml del fármaco tienen un porcentaje mayor a las membranas con 30 mg/ml, esto lo podemos atribuir a un mayor anclaje de las células sobre las membranas debido a la morfología, desorden, conglomeración y ángulos entre las fibras que les permiten a las células acoplarse de mejor manera. Es decir, la membrana 40 TXA arroja una mayor porosidad, área superficial e hinchamiento (valores descritos en la sección de Caracterización de la membrana) así como ángulos alrededor de $59 \pm 19^\circ$ mientras que en la membrana de 30

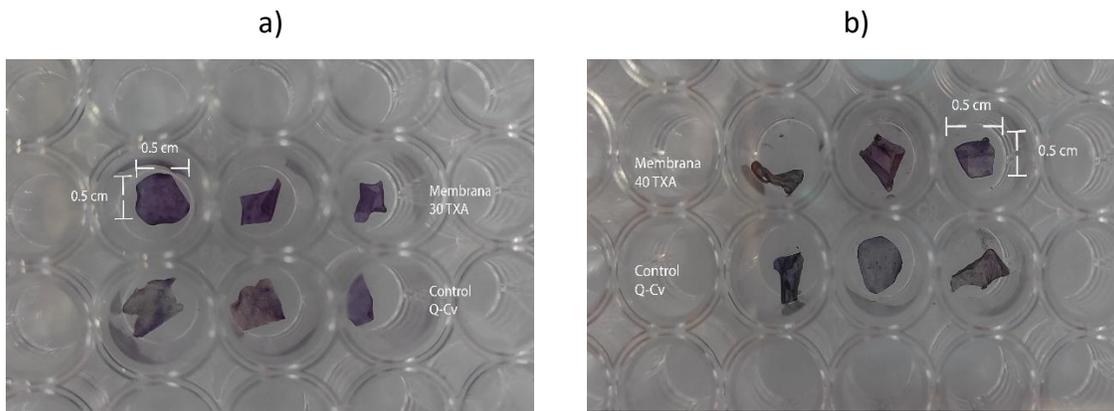
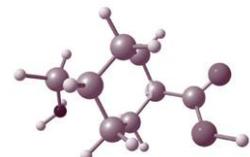


Figura 56. Fotografías de las membranas al terminar la evaluación citotóxica al pasar 86 h de interacción células-membranas, 30 mg/ml TXA (a) y 40 mg/ml TXA (b). TXA son de $^\circ$, que en comparación con el tamaño de las células utilizadas





con un diámetro alrededor de 30 a 40 μm se encuentra relacionados para la adhesión celular sobre las fibras como se muestra en la Figura 57, donde se representa a células sobre, entre y debajo de las fibras.

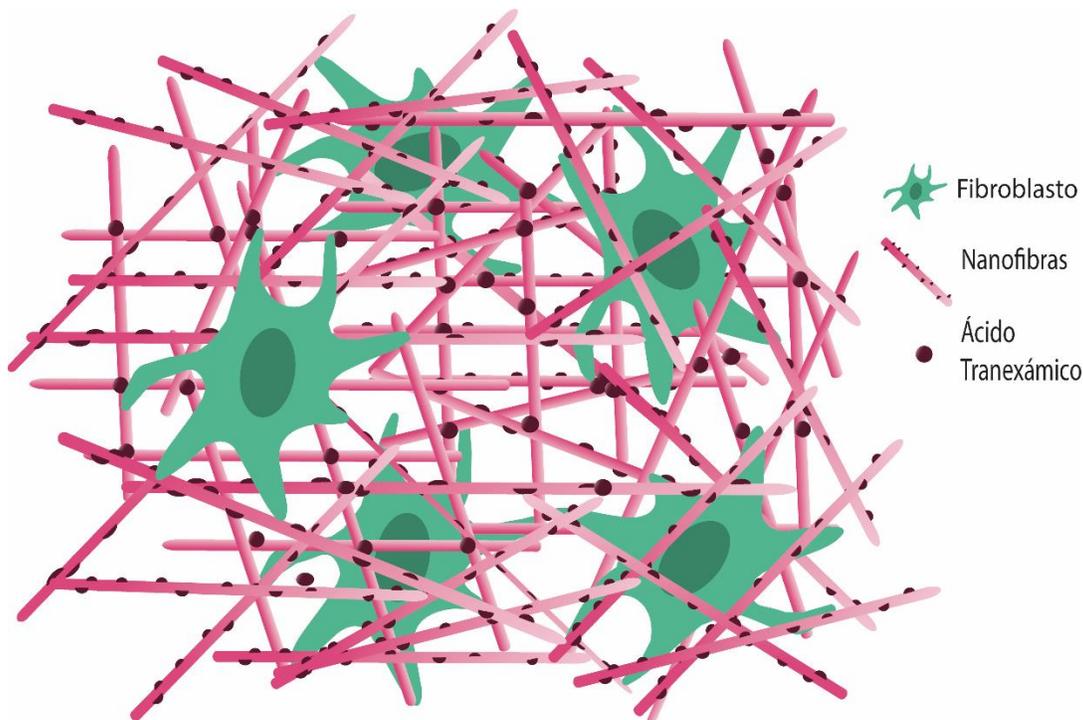
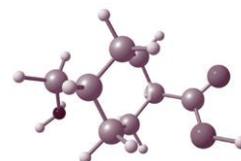
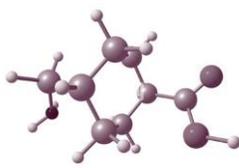


Figura 57. Diagrama ilustrativo de adherencia celular en la membrana con ácido tranexámico.

Por otro lado, durante la evaluación se observó que las membranas tienen una integración unas con otras que se refleja en una disminución de la morfología rugosa y una pérdida cualitativa de la porosidad (como se muestra en la Figura 50 donde se pierde la morfología de la membrana), esto puede indicar que las células están biodegradando el material para utilizarlo no solo como soporte extracelular sino como fuente de nutrientes.

Finalmente, el experimento de rasguño que consistió en agregar las membranas después de estabilizar la línea celular demostró que las células pueden migrar a la membrana. Así como el efecto benéfico de la porosidad de las membranas de 40 TXA y Q_C, las cuales demostraron mayor área superficial para que las células puedan estar en el ambiente adecuado para proliferar y duplicarse sobre las mismas, lo que dio como resultado el aumento de viabilidad celular a las 96 h (Figura 58).





Por otro lado, la muestra de quitosano dio un mayor porcentaje de viabilidad, resultado que ha sido reportado, sin embargo, la película de quitosano no favorece una migración de las células entre la membrana debido a que las células se encuentran debajo la película y adheridas sobre la placa.

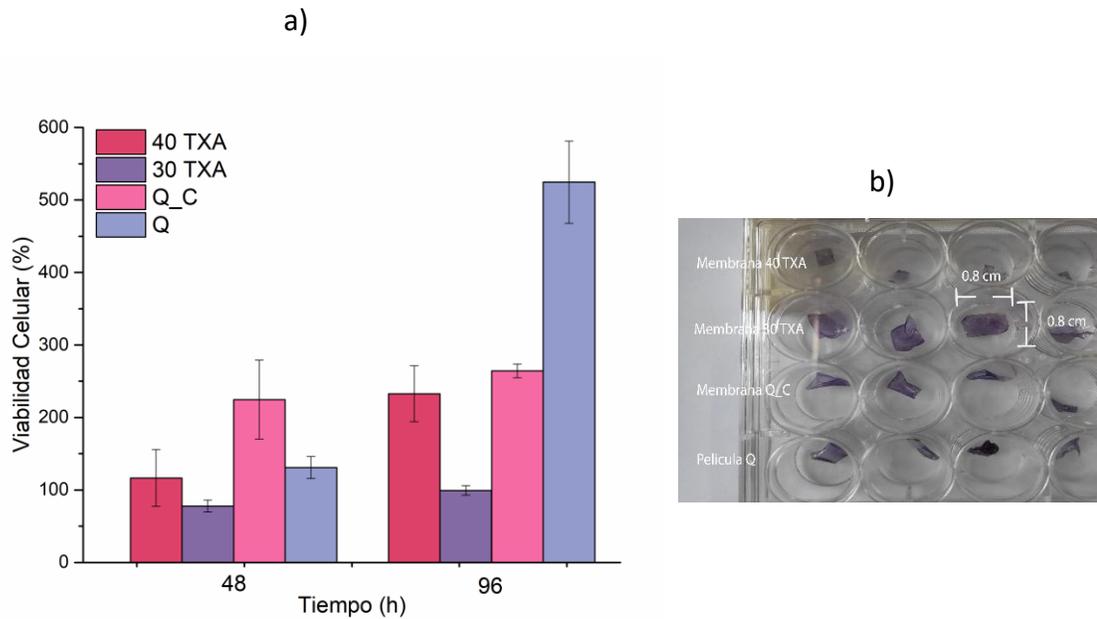
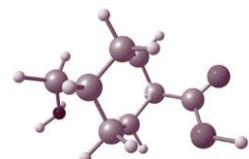
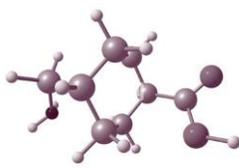


Figura 58. Gráfica de viabilidad celular de la técnica de rasguño (a) y fotografía de membranas después de ser evaluadas a las 96 h de contacto con las células (b).



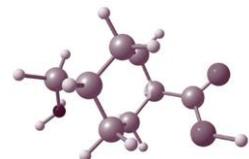


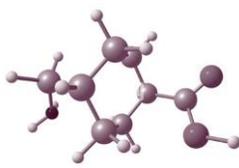
CONCLUSIONES

Es posible extraer colágeno de tendones de bovino como una forma de aprovechamiento de esta materia prima que en la mayoría de los casos se deshecha, el método de hidrólisis alcalina permite tener un rendimiento de extracción de hasta el 50 % con un promedio repetible de alrededor del 33 % para las condiciones óptimas seleccionadas en el proceso de extracción, donde el tiempo de extracción con ácido acético es el parámetro más relevante. Por medio de este experimento se puede extraer colágeno tipo I y tipo V, los polímeros más abundantes en este tipo de tejido, conservando su estructura secundaria de triple hélice, que se espera contribuya a resultados viables de biocompatibilidad.

El proceso de electrohilado de quitosano por sí solo requiere de disolventes fuertes que pueden afectar la toxicidad del material, sin embargo, con ayuda del colágeno extraído (tipo I y V) es posible obtener nanofibras del composito con un diámetro alrededor de 110-180 nm; estas nanofibras son posibles con alto y medio peso molecular de quitosano, obteniéndose fibras más homogéneas con alto peso molecular, sin embargo, aún existen impurezas en las membranas obtenidas. Es por lo que los parámetros del equipo de electrohilado juegan un papel importante en la optimización de la membrana, para este composito la intensidad del voltaje debe estar por arriba de los 20 kV y los flujos a menores de 1.0 ml/h para obtener fibras.

Modificando el disolvente por PBS:etanol se logran obtener fibras con menor cantidad de impurezas además de ser membranas repetibles, con un diámetro de fibras de alrededor de 300 nm y con diámetros que varían hasta los 500 nm en promedio al agregar ácido tranexámico en las soluciones. Conservando los mismos parámetros de electrohilado de 26 kV, 0.6 ml/h y 10 cm, es posible ver la integración de cristales de TXA sobre las fibras de manera homogénea con un tamaño de 80-100 nm al igual que los cristales se encuentran distribuidos sobre la membrana; esta integración del fármaco en las fibras se observa al aumentar la concentración de TXA. Mientras que las micrografías de SEM utilizando ácido acético como disolvente muestran que es posible obtener nanofibras



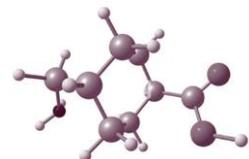


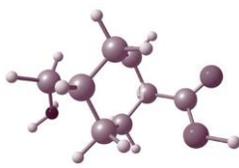
Conclusiones

homogéneas y rugosas que aún tienen impurezas que son posibles estudiar para mejorar la membrana.

Por otro lado, los espectros de IR muestran la presencia de ambos compuestos interactuando con puentes de hidrógeno y en el caso de las señales que desaparecen se sugiere una interacción iónica entre los polímeros, de forma que al cortar las cadenas de quitosano estas se enrollan en la triple hélice del colágeno que se conserva, formando un complejo policationico-polianionico debido a los grupos funcionales opuestos que contiene ambos polímeros. A su vez, las espectroscopias infrarroja de utilizando PBS:etanol muestra una menor interacción entre los polímeros como son interacciones electrostáticas que provocan disminución en la intensidad de los grupos amidas y aumento en el enlace glicoproteico. De igual manera el entrecruzamiento por luz ultravioleta a una longitud de onda de 253 nm permite una interacción de los grupos amidas entre sí por puentes de hidrógeno e interacción con el grupo C-O-C; mientras que al adicionar TXA se observa una disminución de señales OH y N-H sugiriendo una interacción electrostática con el fármaco.

Estos resultados a su vez están relacionados con las evaluaciones mecánicas donde el compuesto formado por una película de quitosano y la membrana de fibras muestra un aumento de tensión de ruptura de 506% mayor a la película de quitosano por sí sola, mientras que adicionando membranas con TXA se encuentra entre 1.996 a 0.8556 MPa, debido a que al aumentar la concentración disminuye la fuerza, esto está relacionado con la presencia de los cristales de TXA sobre las fibras, los cuales aumentan al aumentar la concentración de fármaco. Y a su vez los resultados de área superficial muestran una disminución al disminuir el fármaco, y esta porosidad y fuerza está relacionada con la interacción de las fibras unas con otras debido a la unión de fibras que forman otras fibras y el fármaco sobre la membrana y no sorbe las fibras. Del mismo modo, las isothermas obtenidas por BET, muestran una histéresis del material mesoporoso, cuyo tamaño de poro del compuesto muestra un índice de hinchamiento de 500% mayor a la película de quitosano y valores reportados del mismo. Mientras que al disminuir el fármaco disminuye el tamaño de poro y a su vez el diámetro de las fibras.





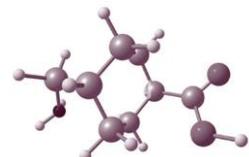
Conclusiones

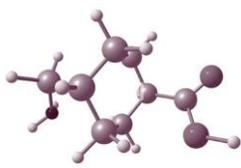
El perfil de liberación demostró que las membranas desorben del 60 al 80% de TXA en los primeros 60 min, el análisis cinético permitió un ajuste en las tres muestras con el modelo de Korsmeyer-Peppas con tres etapas en cada membrana para ajustar un valor exponencial menor a 0.5 relacionado a una liberación de matriz hinchable con forma cilíndrica mediante un fenómeno de difusión del fármaco expuesto en la superficie de la membrana; las constantes cinéticas obtenidas van de 4.54 a 46.77, los cuales aumentan relacionado a la distribución del fármaco sobre la membrana, mientras que las velocidades de desorción están relacionadas a la concentración del TXA, debido a que aumentan conforme disminuye el fármaco.

Por último, la evaluación biológica del material demostró que el composito tiene actividad antibacteriana con las bacterias más comunes donde la inhibición al tiempo cero en las membranas con TXA es mayor del 50%, mientras que a las 3 h donde para la Grampositivas es del 100% y en las Gramnegativas arriba del 80%, esta actividad contribuye a la protección de una herida.

Del mismo modo, la evaluación de viabilidad celular demostró que la membrana puede retener células entre sus poros al instante así como permitir el flujo de las mismas para posteriormente comenzar a adherirse a las fibras debido a la afinidad de las integrinas al colágeno así como el acoplamiento con los ángulos formados entre las fibras que permiten la adherencia y movilidad de los fibroblastos; a su vez la porosidad de la membrana permite el flujo de nutrientes y desechos celulares para que las células puedan proliferar sobre la membrana, esos efectos se observaron con resultados de viabilidad celular mayores al 100 al 300%. A su vez la viabilidad disminuye conforme aumenta la concentración de las fibras y a través de los días las fibras se biodegradan al interactuar con los fibroblastos.

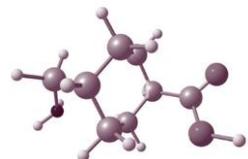
Finalmente, se puede decir que las membranas obtenidas por electrohilado con colágeno, quitosano y ácido tranexámico son capaces de interactuar entre ellos para generar una red que tiene la manipulación y tensión necesaria para proteger una herida además de tener una actividad antibacteriana y promover la adherencia, movimiento y proliferación celular así como el flujo de nutrientes y desechos celulares, poder liberar el





Conclusiones

fármaco en flujos sanguíneos en tiempos cortos necesarios para la rápida interacción con una herida con hemorragia. Todo lo anterior permite confirmar la hipótesis planteada en este proyecto hasta el momento considerando la interacción con un flujo sanguíneo simulado.

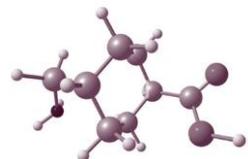




PERSPECTIVAS FUTURAS

Disminuir las impurezas de las membranas parametrizando el proceso de electrohilado al igual que las concentraciones de los polímeros.

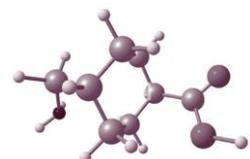
Realizar pruebas con flujos sanguíneos para evaluar la interacción con un sistema sanguíneo.





PRODUCTOS OBTENIDOS

- Asistente al Coloquio de Ingeniería, tanto en el 2019 como parte de Staff y en 2020 como asistente en las conferencias.
- En el IX Congreso Anual de la Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Membranas (2020) se participó como exponente de Poster titulado “Síntesis de una membrana nanoestructurada de alginato de calcio y polivinilo alcohol mediante electrohilado con posible aplicación en ingeniería de tejidos” se cuenta con publicación en Memoria del Congreso con ISSN: 2395-8650
- En el X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste (2021) se participó como expositor de Poster con el trabajo titulado “Membranas de fibras de colágeno y quitosano por electrohilado”
- Expositor invitado en una clase de licenciatura en microbiología, hablando sobre la evaluación de nanomateriales en pruebas microbiológicas.
- Participación como expositor oral en el XX Congreso Anual de la Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Membranas (2021) con el trabajo titulado “Development and evaluation of a nanofibers scaffold of chitosan/collagen for tranexamic acid delivery”, se cuenta con publicación en Memorias del Congreso con ISSN: 2395-8650.





ANEXOS

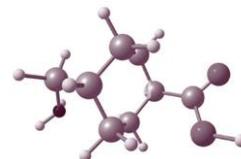
ANEXO I: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

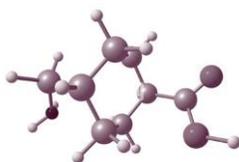
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en Ingles) es una técnica de caracterización fisicoquímica que permite obtener una imagen de la superficie de un material. Los electrones interactúan con diferentes átomos presentes en la muestra, produciéndose diferentes señales que relevan información de la morfología superficial de la muestra(Pinto et al., 2018).

El equipo se compone de dos partes principales, una consola electrónica que permite ajustar los interruptores y aperturas para modificar la intensidad de la imagen obtenida, enfocar de mejor manera y obtener la fotografía. La columna de electrones es un componente muy importante debido a que es donde se encuentra el haz de electrones, dentro de la columna se lleva a cabo la crea y enfoca a una pequeña zona de la muestra para posteriormente escanearla por completo. El haz de electrones se encuentra en la cima de la columna y es emitida por una placa de tungsteno o hexaboruro de lantano y posteriormente acelerados hacia abajo por la columna que se encuentra en vacío. La imagen se forma por el escaneo del haz por la muestra en sincronía con un haz de escaneo dentro de un tubo de rayos catódicos. La muestra se encuentra en una cámara debajo de los lentes objetivos, la cual contienen los detectores de electrones, detectores de rayos X y una bomba que genera vacío(Lyman et al., 1990).

Un punto importante por considerar para poder analizar por SEM es la conductividad de la muestra, debido a que durante la producción de la imagen la muestra es bombardeada por electrones los cuales eventualmente provocaran que se cargue negativamente en las aéreas





bajo el haz; esto puede provocar que se desvíen o emitan electrones que arruinen la imagen, sin embargo, si la muestra es conductora puede actuar como tierra para evitar la sobre carga

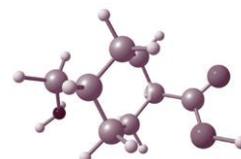
ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Espectroscopia de infrarrojo (IR) es una técnica analítica usada para analizar componentes orgánicos y algunos inorgánicos de manera cualitativa y cuantitativa. Esta técnica se basa en la absorción de energía infrarroja de los enlaces químicos a frecuencias específicas, es por eso por lo que se puede determinar la estructura básica de un compuesto por la ubicación de sus señales de absorción IR en el espectro(Pinto et al., 2018).

Espectroscopia IR da como resultado las vibraciones moleculares, los grupos funcionales pueden asociarse a bandas características de absorción de IR. Para una molécula no lineal con N átomos, hay $3N-6$ movimientos vibracionales de los átomos de la molécula, o $3N-6$ vibraciones fundamentales o modos normales. Un modo normal de vibración es activo en infrarrojo (es decir, absorbe la luz infrarroja incidente) si hay un cambio en el momento dipolar de la molécula durante el curso de la vibración. Por lo tanto, las vibraciones simétricas generalmente no se detectan en infrarrojos(Berthomieu & Hienerwadel, 2009).

Las señales fuertes se observan para grupos con momentos dipolares permanentes (enlaces polares), un ejemplo es el grupo carbonilo. En la región del infrarrojo medio ($4000-1000\text{ cm}^{-1}$), se observan dos tipos de vibraciones dominantes: vibraciones a lo largo de enlaces químicos, llamadas vibraciones de estiramiento, que implican cambios en la longitud del enlace; y vibraciones que implican cambios en los ángulos de enlace y, en particular, vibraciones de flexión (dentro o fuera del plano)(Ae & Hienerwadel, n.d.).

ESPECTROSCOPIA UV-VIS





Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis) se basa en la absorción de luz como una función de la longitud de onda que provoca transiciones electrónicas en el material. La cantidad de luz que es transmitida se describe por la Ley de Lambert-Beer, la cual explica que la fracción de luz medida después de interactuar con la muestra (I) contra la intensidad incidente (I_0) depende del ancho de la trayectoria de la luz a través de la muestra. La ecuación que describe el fenómeno es:

$$A = \varepsilon cl = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\log(T)$$

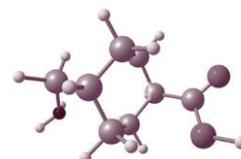
Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absorción del material, c la concentración de la sustancia y l es el ancho de la luz que atraviesa la muestra (Z. Chen et al., 2013).

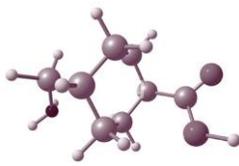
Las mediciones en la región UV-Vis se realizan generalmente en los modos de transmitancia, reflectancia y fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia). Las mediciones de transmitancia y reflectancia deben registrarse contra un material de referencia, mientras que las adquisiciones de fotoluminiscencia pueden considerarse mediciones absolutas (Picollo et al., 2019).

MEDICIÓN DE POROSIDAD POR LA TÉCNICA DE BRUNAUER, EMMETT AND TELLER (BET)

La teoría de Bruner, Emmett, and Teller es comúnmente utilizada para medir el área superficial específica de un material, la idea básica se obtiene de la teoría de absorción en monocapa de Langmuir, para posteriormente transferirla a un modelo de adsorción en multicapa usando la teoría de BET.

Cada especie adsorbida en una capa actúa como un sitio para la adsorción de la siguiente capa además una nueva capa puede formarse antes de completar las siguientes capas. Sin embargo, se asume que la energía de adsorción de la primera capa se debe a la interacción





adsorbato-adsorbente y tiene un valor específico, mientras el resto de las capas tienen la misma energía.

Las especies adsorbidas no se pueden transferir de una capa a otras capas, por lo tanto, la adsorción y desorción ocurre solamente entre gas y capas adsorbidas. En el punto de equilibrio la velocidad de adsorción para cada capa es igual a la velocidad de desorción (Pourhakkak et al., 2021).

El método BET es aplicado para calcular el área superficial basado en la medición de la isoterma de adsorción de nitrógeno a -77 K, utilizando un rango de presión relativa de 0.05 a 0.3. Se determina por el volumen de gas N₂ adsorbido en el material, asumiendo que tienen acceso a toda la superficie del material.

Bajo todas estas condiciones la teoría de Langmuir se puede aplicar para derivar el área superficial con BET (S_{BET})

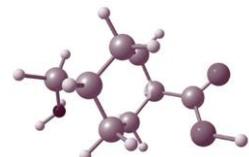
$$S_{BET} = \frac{V_0 N_a s}{M_v}$$

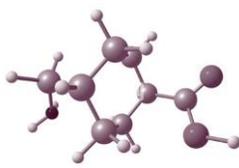
Donde, V_0 es el volumen de una monocapa de gas adsorbida, N_a es el número de Avogadro, M_v es el volumen molar del gas adsorbido y s es el área superficial de una sola molécula de gas adsorbida en el sólido (Holbrook et al., 2015). Y el área superficial (SA) de una masa conocida (M) de un material seco se calcula como:

$$SA = S_{BET}/M$$

La medición se basa en la adsorción física de un gas en la superficie de una muestra, la cantidad de gas que se puede determinar utilizando la isoterma de Langmuir, la cual asume una monocapa de gas adsorbida de manera homogénea sobre la superficie.

$$a = \frac{qKp}{(1 + Kp)}$$





Donde a es la cantidad de gas adsorbido en un 1 g de la muestra (mol/g), q es la cantidad de sitios activos en un 1 g, p es la presión relativa del gas y K es el coeficiente de adsorción. (Jakubširc et al., 2012)

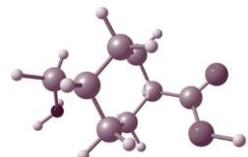
Por otro lado, existen muestras que adsorben en varias capas, lo que provoca la formación de una isoterma, a la cual se aplica la siguiente formula:

$$\frac{p}{P_o} = \frac{1}{amC} + \frac{Po(C - 1)}{amC}$$

Donde P_o es la tensión de saturación del vapor, am es la cantidad de gas adsorbido y C es la constante de adsorción y desorción. A partir de la isoterma se puede determinar el área superficial específica:

$$A_{sp} = Na * am * \sigma$$

La cual utiliza el número de Avogadro y σ es el área de la muestra cubierta con una molécula del gas adsorbido.





LÍNEA CELULAR OP-9

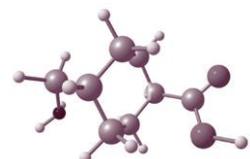
Es una línea celular es extraída de embrión de ratón y puede utilizarse como células madre para inducir diferenciación de células embrionarias a células sanguíneas de eritrocitos y células B. Esta línea celular también se designa como (C57BL/6 x C3H)F2-op y tiene una morfología similar a los fibroblastos, debido a la diferenciación celular se utilizan en inmunología e investigación con células madre (OP9 | ATCC, n.d.).

Las células no producen factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) debido a una mutación osteopetrótica en el gen que codifica M-CSF. La presencia de M-CSF tuvo efectos inhibidores sobre la diferenciación de células madre embrionarias (ES) en células sanguíneas distintas de los macrófagos.

El medio base para el cultivo de esta línea celular es el ATCC-formulado Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM), para suplementar el medio de cultivo se agrega 20% v/v de suero fetal bovino; y se conserva a 37°C con 95% de aire y 5% de CO₂.

CULTIVO DE CÉLULAS

Se extrajeron los tubos criogénicos del supercongelador (-70°C) para transferir las células a un tubo Falcón y centrifugar la solución a 1000 rpm por 5 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante para recuperar el pellet, al cual se agregaron 1 ml de medio suplementado con suero bovino; después de resuspender la solución para separar las cadenas de células formadas (grumos) finalmente se agregaron dentro de una caja Petri de 100 y se dejaron incubar a 37 °C en oscuro.





CAMBIO DE CULTIVO

Pasadas las 24 horas de incubación se procedió a retirar el medio de cultivo por precipitación de la caja de 100, para después agregar 3 ml de nuevo medio suplementado.

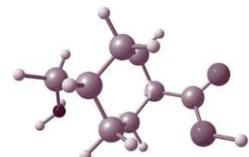
SUBCULTIVO DE CÉLULAS

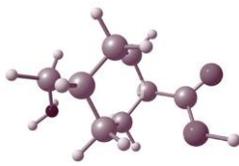
Cuando se observa confluencia del 80-90% de células en la caja, se retiró el medio de cultivo con ayuda del extractor. Después se agregó 500 μ L de Tripsina y se dejaron a incubar por 5 min a 37 °C o hasta que se vea como se desprenden las células de la caja. Pasado el tiempo se agregaron 500 μ L de medio suplementado para inactivar a la enzima (se resuspendio la solución para asegurar la inactivación), en seguida se centrifugo a 1500 rpm por 5 minutos. Se retiro el sobrenadante para obtener el pellet y después agregar 1 ml de medio suplementado, se resuspendio la solución y finalmente se agregaron alícuotas de 300 μ L en cajas nuevas con 3 ml de medio para dejarlos incubar a 37 °C.

CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS

Las células que fueron cultivadas en cajas de 100, se tripsinizaron para obtener el pellet y después poder resuspender en una solución de DMSO (10 % v/v, previamente esterilizado por filtrado) y suero bovino. De la solución que se obtuvo se colocó 1000 μ l en 3 tubos criógenos para tener en cada uno alrededor de 1 millón de células.

El proceso de congelación puede ser directo al supercongelador o escalar, es decir, estar 24 horas en el refrigerador de 4 °C, después 24 horas en el refrigerador de -20 °C y finalmente pasar al refrigerador de -60 °C.





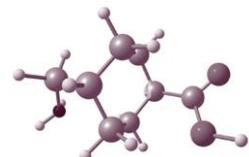
CONTEO DE CÉLULAS POR HEMOCITÓMETRO (CÁMARA DE NEUBAUER)

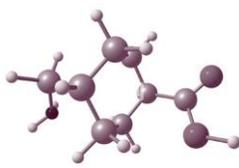
Se preparo una solución de una suspensión celular en medio completo y azul de tripano, la cual contiene 16 μL de azul de tripano y 4 μL de la suspensión celular (el pellet obtenido del pase suspendido en 1 ml de medio); para obtener un mejor conteo se prepararon dos alícuotas. Posteriormente con cuidado se colocaron 10 μl en cada extremo de la cámara de Neubauer y se procedió a realizar el conteo en los 4 cuadrantes de la cámara para finalmente compararlos en promedio con el cuadrante del centro.

$$\frac{\sum \text{cuadrantes}}{4} * 5(\text{factor de dilusión}) * 10\ 000(\text{volumen celular}) = \text{células/ml}$$

ANEXO III: EXTRACCIÓN DE COLÁGENO POR MÉTODO ENZIMÁTICO

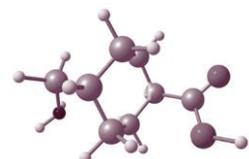
Como método alternativo a extracción de colágeno se siguió el método enzimático el cual consiste en sumergir los tendones en acetona por 24 horas con el fin de remover ácidos grasos de la muestra primaria (A-b, 2011), posteriormente se cortó en

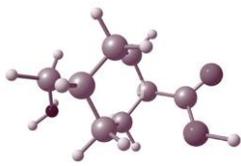




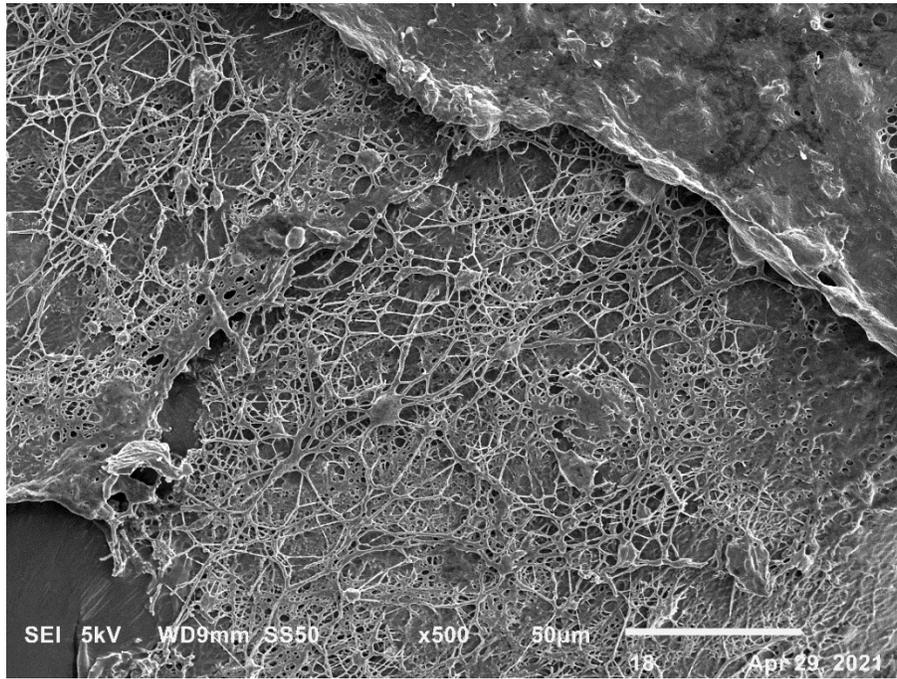
pequeños pedazos para someterse a molienda mecánica agregando ácido acético durante el proceso, la masa viscosa sin trozos de tendón se puede refrigerar para su procesamiento.

A 40 g de la masa viscosa se agregó un volumen de 80 ml de 0.4 M de AcA para mantener un pH alrededor de 2.8 (Akram & Zhang, 2020) y se agregó pepsina 1:10 en relación con la muestra mucosa, esta disolución se dejó en agitación magnética por 24 h con el fin de desprender los aminoácidos terminales para eliminar una posible respuesta inmonológica (A-b, 2011). Posteriormente se centrifugó la solución a 9000 rpm por 30 min para remover residuos de tendón y pepsina disuelta, el precipitado se desechó mientras que al sobrenadante se agregó cristales de cloruro de sodio (NaCl) con el fin de realizar purificación del colágeno tipo I por salting out (Trelstad et al., 1976). El NaCl se agregó dependiendo del volumen obtenido anteriormente hasta tener una concentración de 2 a 2.5 M (GAO et al., 2018; Miller & Kent Rhodes, 1982) y se dejó en agitación por 4 horas. Pasado ese tiempo se centrifugó a 10000 rpm por 30 min y el precipitado se sometió a lavados con agua y etanol a las mismas condiciones de centrifugado. Finalmente, la muestra blanca obtenida se dejó secar a 50 °C por 24 h para conservarla en a 4°C.

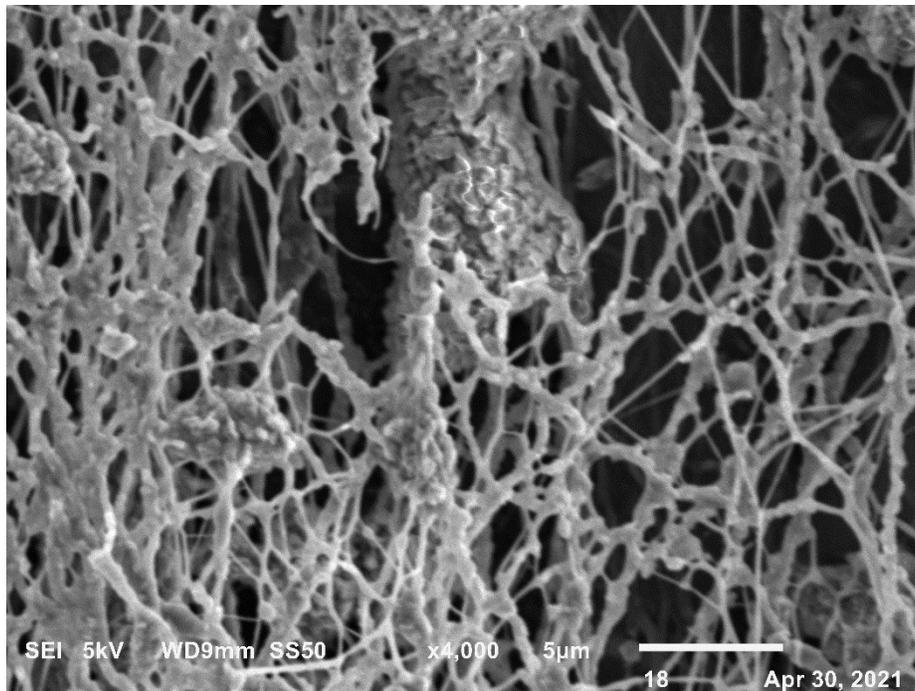




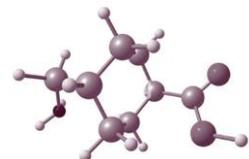
ANEXO III: MICROGRAFÍAS DE SEM

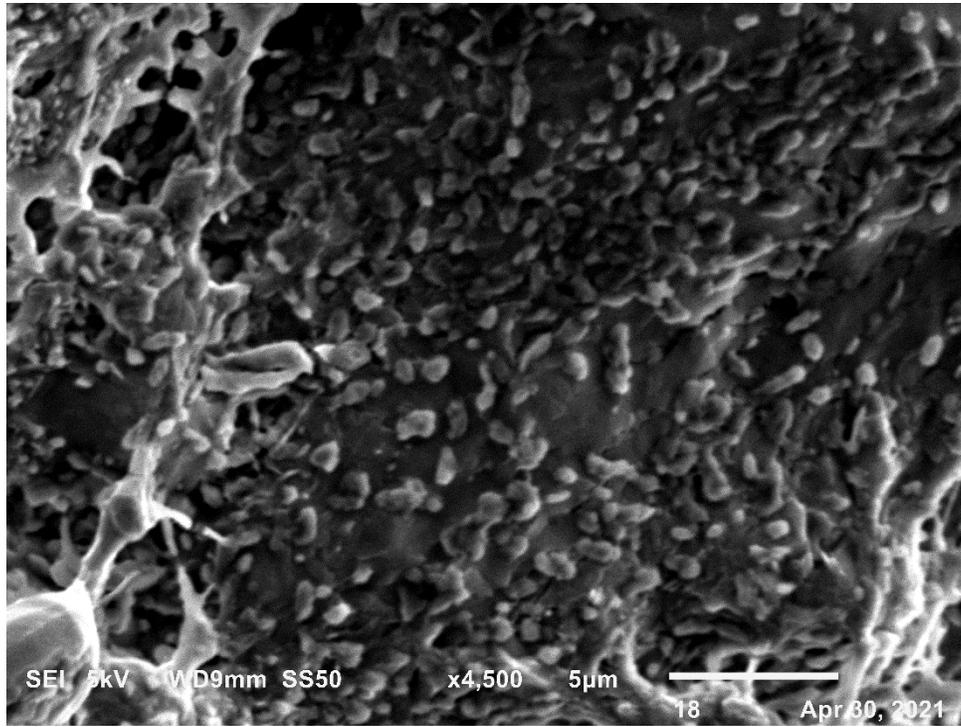


Impurezas de la membrana a 24 kV, 0.7 ml/h y 10 cm de 2 p/v % Q, 50 p/v% C

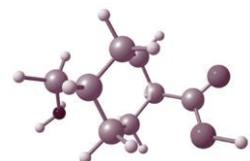


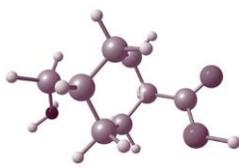
Nanofibras de quitosano/colágeno a 26 kV, 0.7 ml/h y 10 cm de 1 p/v % Q, 50 p/v% C





Acercamiento de cristales posibles de TXA en las muestras.





REFERENCIAS

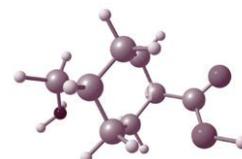
- A-b, C. D. E. F. G. H. I. J. (2011). *Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino*. 24(4), 137–140.
- Adabi, M., Naghibzadeh, M., Adabi, M., Zarrinfard, M. A., Esnaashari, S. S., Seifalian, A. M., Faridi-Majidi, R., Tanimowo Aiyelabegan, H., & Ghanbari, H. (2017). Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(4), 833–842. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1178134>
- Adamiak, K., & Sionkowska, A. (2020). Current methods of collagen cross-linking: Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 550–560. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2020.06.075>
- Adriana Denise Zepeda-Mendoza, D., & Carrillo-Esper, R. (2014a). *Manejo de hemorragia crítica en cirugía de trauma* (Vol. 37). <http://www.medigraphic.com/rma>
- Adriana Denise Zepeda-Mendoza, D., & Carrillo-Esper, R. (2014b). Manejo de hemorragia crítica en cirugía de trauma. In *Revista Mexicana de Anestesiología* (Vol. 37, Issue S2). Medigraphic. <http://www.medigraphic.com/rma>
- Ae, C. B., & Hienerwadel, R. (n.d.). *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>
- Akram, A. N., & Zhang, C. (2020). Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105053. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105053>
- Alberdi, F., García, I., Atutxa, L., & Zabarte, M. (2014). Epidemiología del trauma grave. *Medicina Intensiva*, 38(9), 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2014.06.012>
- Andonegi, M., Heras, K. las, Santos-Vizcaíno, E., Igartua, M., Hernandez, R. M., de la Caba, K., & Guerrero, P. (2020). Structure-properties relationship of chitosan/collagen films with potential for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 237(March), 116159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116159>
- Arayne, M. S., Sultana, N., Siddiqui, F. A., Mirza, A. Z., & Zuberi, M. H. (2008). Spectrophotometric techniques to determine tranexamic acid: Kinetic studies using

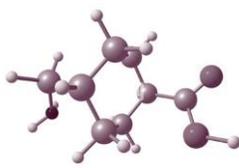




Referencias

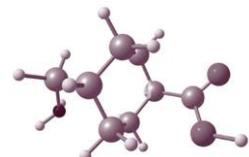
- ninhydrin and direct measuring using ferric chloride. *Journal of Molecular Structure*, 891(1–3), 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.04.026>
- Ausen, K., Fossmark, R., Spigset, O., Pleyrn, H., & Ausen, D. K. (2015). *Randomized clinical trial of topical tranexamic acid after reduction mammoplasty*. <https://doi.org/10.1002/bjs.9878>
- Bachmann, L., Gomes, A. S. L., & Zezell, D. M. (2005). Collagen absorption bands in heated and rehydrated dentine. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 62(4–5), 1045–1049. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.03.025>
- Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., & Petibois, C. (2009). Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(3), 829–837.
- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. In *Photosynthesis Research* (Vol. 101, Issues 2–3, pp. 157–170). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>
- Bevan, D. H., & Sørensen, B. (2011). Hemostasis. Principles of investigation. *Blood and Bone Marrow Pathology*, 473–490. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3147-2.00031-6>
- Cai, Z.-X., Mo, X.-M., Zhang, K.-H., Fan, L.-P., Yin, A.-L., He, C.-L., & Wang, H.-S. (2010). Fabrication of Chitosan/Silk Fibroin Composite Nanofibers for Wound-dressing Applications. *Int. J. Mol. Sci*, 11, 3529–3539. <https://doi.org/10.3390/ijms11093529>
- Campbell, S. (2020). Hemostasis. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, 445–467. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00026-0>
- Cao, H., & Xu, S. Y. (2008). Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage. *Food Chemistry*, 108(2), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.022>
- Cárdenas, G., & Miranda, S. P. (2004). FTIR and TGA studies of chitosan composite films. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49(4), 291–295. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072004000400005>
- Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf*. (n.d.). Retrieved May 25, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader>
- Chen, J. P., Chang, G. Y., & Chen, J. K. (2008). Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*

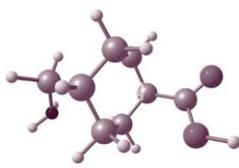




Referencias

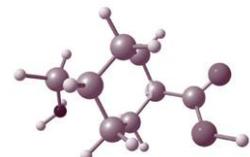
- Engineering Aspects*, 313–314, 183–188.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2007.04.129>
- Chen, Z., Deutsch, T. G., Dinh, H. N., Domen, K., Emery, K., Forman, A. J., Gaillard, N., Garland, R., Heske, C., Jaramillo, T. F., Kleiman-Shwarsstein, A., Miller, E., Takane, K., & Turner, J. (2013). *UV-Vis Spectroscopy* (pp. 49–62). Springer, New York, NY.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8298-7_5
- Chen, Z., Mo, X., & Qing, F. (2007). Electrospinning of collagen-chitosan complex. *Materials Letters*, 61(16), 3490–3494. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.11.104>
- Dahlin, R. L., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2011). Polymeric nanofibers in tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(5), 349–364.
- de Campos Vidal, B., & Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.010>
- Dong, Z., Wu, Y., & Clark, R. L. (2011). Thermodynamic modeling and investigation of the formation of electrospun collagen fibers. *Langmuir*, 27(20), 12417–12422. <https://doi.org/10.1021/la201859c>
- Emilia, M., Luca, S., Francesca, B., Luca, B., Paolo, S., Giuseppe, F., Gianbattista, B., Carmela, M., Luigi, M., & Mauro, L. (2011). Topical hemostatic agents in surgical practice. *Transfusion and Apheresis Science*, 45(3), 305–311.
- En, E., Gonzalez, M. E. C. N., En, P. E., Notberto, M. I. H., Toledo, M., De, R., En, D. R., Hardy, C. A., Cardona, C. G. V., En, I. M., Duarte, I. C. J., En, M. E., Marco, M. E. C., Silva, A., Toluca, M., & de México, E. (n.d.). *Universidad Autónoma del Estado de México “Delta de CO₂ y su asociación con el choque hipovolémico hemorrágico grado III.”*
- Evaniew, N., & Bhandari, M. (1999). Cochrane in CORR 1 : Topical Application of Tranexamic Acid for the Reduction of Bleeding (Review). *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 475. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010562.pub2>
- Fatahian, R., Mirjalili, M., Khajavi, R., Karim Rahimi, M., & Nasirizadeh, N. (123 C.E.). *Fabrication of antibacterial and hemostatic electrospun PVA nanofibers for wound healing*. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3084-6>
- Gandhimathi, C., Venugopal, J. R., Bhaathary, V., Ramakrishna, S., & Kumar, S. D. (2014). Biocomposite nanofibrous strategies for the controlled release of biomolecules for skin tissue regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 4709–4722. <https://doi.org/10.2147/IJN.S65335>





Referencias

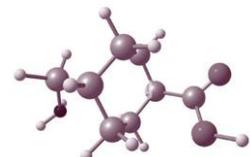
- GAO, L. ling, WANG, Z. yu, LI, Z., ZHANG, C. xia, & ZHANG, D. quan. (2018). The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuin sheep). *Journal of Integrative Agriculture*, 17(3), 704–711. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61751-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61751-9)
- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531–1546.
- Giersig, M., & Khomutov, G. B. (2008). *Nanomaterials for application in medicine and biology*. Springer.
- Gorain, B., Pandey, M., Leng, N. H., Yan, C. W., Nie, K. W., Kaur, S. J., Marshall, V., Sisinthy, S. P., Panneerselvam, J., Molugulu, N., Kesharwani, P., & Choudhury, H. (2022). Advanced drug delivery systems containing herbal components for wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*, 617, 121617. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.121617>
- Haider, S., Al-Zeghayer, Y., Ahmed Ali, F. A., Haider, A., Mahmood, A., Al-Masry, W. A., Imran, M., & Aijaz, M. O. (2013). Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. *Journal of Polymer Research*, 20(4). <https://doi.org/10.1007/s10965-013-0105-9>
- Híjar-Medina, M. C. (2014). Los accidentes como problema de salud pública en México. *Mexico City: Intersistemas*.
- Holbrook, R. D., Galyean, A. A., Gorham, J. M., Herzing, A., & Pettibone, J. (2015). Overview of Nanomaterial Characterization and Metrology. *Frontiers of Nanoscience*, 8, 47–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099948-7.00002-6>
- Hosseinkhani, H. (2019). *Nanomaterials in advanced medicine*. John Wiley & Sons.
- Huang, L., Nagapudi, K., Apkarian, P. R., & Chaikof, E. L. (2001). Engineered collagen - PEO nanofibers and fabrics. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12(9), 979–993. <https://doi.org/10.1163/156856201753252516>
- Huo, P., Han, X., Zhang, W., Zhang, J., Kumar, P., & Liu, B. (2021). Electrospun nanofibers of polycaprolactone/collagen as a sustained-release drug delivery system for artemisinin. *Pharmaceutics*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081228>
- Ifuku, S. (2014). Chitin and chitosan nanofibers: Preparation and chemical modifications. *Molecules*, 19(11), 18367–18380. <https://doi.org/10.3390/molecules191118367>





Referencias

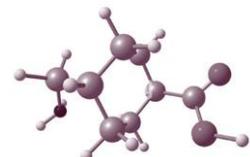
- Islam, M. M., Shahruzzaman, M., Biswas, S., Nurus Sakib, M., & Rashid, T. U. (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*, 5(1), 164–183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
- Jakubširc, J. J., Hobzová, R., Kostina, N., Munzarová, M., Juklíčková, M., Lhotka, M., Kubinová, S., Zajícová, A., & Michálek, J. (2012). Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 14. <https://doi.org/10.1155/2012/327369>
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. v., & Tamura, H. (2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 28(1), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.001>
- Kajdič, S., Planinšek, O., Gašperlin, M., & Kocbek, P. (2019). Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 672–681. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.03.038>
- Kannan, R., Wei, G., & Ma, P. X. (2022). Synthetic polymeric biomaterials for tissue engineering. *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, 41–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820508-2.00023-4>
- Kharat A.R. (2014). Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Scholars Academic Journal of PharmacyOnline) Sch. Acad. J. Pharm*, 3(5), 2320–4206. www.saspublisher.com
- Kheirabadi, B. (2011). Evaluation of topical hemostatic agents for combat wound treatment. *US Army Med Dep J*, 37.
- Kingsley, J. D., Ranjan, S., Dasgupta, N., & Saha, P. (2013). Nanotechnology for tissue engineering: need, techniques and applications. *Journal of Pharmacy Research*, 7(2), 200–204.
- Krishnan, L. K., Mohanty, M., Umashankar, P. R., & Vijayan Lal, A. (2004). Comparative evaluation of absorbable hemostats: Advantages of fibrin-based sheets. *Biomaterials*, 25(24), 5557–5563. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.013>
- Kweon, D.-K., Song, S.-B., & Park, Y.-Y. (2003). Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, 24(9), 1595–1601.
- León-López, A., Fuentes-Jiménez, L., Hernández-Fuentes, A. D., Campos-Montiel, R. G., & Aguirre-álvarez, G. (2019). Hydrolysed Collagen from Sheepskins as





Referencias

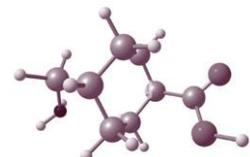
- a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163931>
- Li, Q., Wang, X., Lou, X., Yuan, H., Tu, H., Li, B., & Zhang, Y. (2015). Genipin-crosslinked electrospun chitosan nanofibers: Determination of crosslinking conditions and evaluation of cytocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, 130, 166–174. <https://doi.org/10.1016/J.CARPOL.2015.05.039>
- Lih, E., Lee, J. S., Park, K. M., & Park, K. D. (2012). Rapidly curable chitosan–PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing. *Acta Biomaterialia*, 8(9), 3261–3269.
- Lin, H. Y., Kuo, Y. J., Chang, S. H., & Ni, T. S. (2013). Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes. *Biomedical Materials*, 8(2), 025009. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/2/025009>
- Liu, R., Dai, L., Si, C., & Zeng, Z. (2018). Antibacterial and hemostatic hydrogel via nanocomposite from cellulose nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 195, 63–70.
- Liu, T., Teng, W. K., Chan, B. P., & Chew, S. Y. (2010). Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: synthesis, characterization and neural stem cell interactions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(1), 276–282.
- Lopez, R. (2004). Adsorción en Sólidos Mesoporosos. *Universidad Nacional de San Luis. Argentina, Capítulo 3*, 19–51.
- Love, B. (2017). Polymeric Biomaterials. *Biomaterials*, 205–238. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809478-5.00009-2>
- Luraghi, A., Peri, F., & Moroni, L. (2021). Electrospinning for drug delivery applications: A review. *Journal of Controlled Release*, 334, 463–484. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.03.033>
- Lyman, C. E., Goldstein, J. I., Romig, A. D., Echlin, P., Joy, D. C., Newbury, D. E., Williams, D. B., Armstrong, J. T., Fiori, C. E., Lifshin, E., & Peters, K.-R. (1990). Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy. In *Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0635-1>
- Main mechanisms to control the drug release. (2015). *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, 37–62. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00004-7>

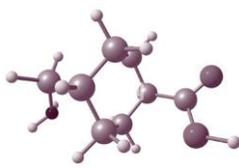




Referencias

- Mamani Huamán, C. A. (2018). *Obtención de colágeno por el método de hidrólisis alcalina a partir de (Tarsos) de pollo provenientes de la Industria Avícola en la Región Arequipa*.
- Manuel, D., Alberto, B., Felipe, C., & Jesús, B. (2016). *Trauma—Un Problema de Salud en México. Academia Nacional de Medicina de México (ANMM) 2016. Editorial: Intersistemas SA [Internet]. México—México DF, 2016*.
- Mari, D., Coppola, R., & Provenzano, R. (2008). Hemostasis factors and aging. *Experimental Gerontology*, 43(2), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.06.014>
- Martínez Martín, J. M. (1990). Adsorción física de gases y vapores por carbones. *Adsorción Física de Gases y Vapores Por Carbones*, 312–400. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/4291>
- McMichael, M. (2012). New Models of Hemostasis. *Topics in Companion Animal Medicine*, 27(2), 40–45. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2012.07.005>
- Mejia-Mantilla, J. H., Puentes-Manosalva, F. E., Ciro, J. D., & Morales, C. (2009). Hemorragia y trauma, avances del estudio CRASH2 en Colombia. *Revista Colombiana de Cirugía*, 24, 175–183. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-75822009000300006&nrm=iso
- Miller, E. J., & Kent Rhodes, R. (1982). [2] Preparation and Characterization of the Different Types of Collagen. In *Methods in Enzymology* (Vol. 82, Issue C). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)82059-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)82059-4)
- MOHAMED, S. S. Y., Gambino, A., Banchemo, M., Ronchetti, S., Manna, L., Cavalli, R., & Onida, B. (2022). Tranexamic Acid-Loaded Mesoporous Silica Microspheres as a Hemostatic Material. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/SSRN.4089520>
- Monroe, D. M. (2010). Basic Principles Underlying Coagulation. *Practical Hemostasis and Thrombosis: Second Edition*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/9781444306286.ch1>
- Montroy, J., Hutton, B., Moodley, P., Fergusson, N. A., Cheng, W., Tinmouth, A., Lavallée, L. T., Fergusson, D. A., & Breau, R. H. (2018). The efficacy and safety of topical tranexamic acid: a systematic review and meta-analysis. *Transfusion Medicine Reviews*, 32(3), 165–178.
- Muthu, S., & Prabhakaran, A. (2014). Vibrational spectroscopic study and NBO analysis on tranexamic acid using DFT method. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129(2), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.050>

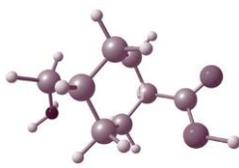




Referencias

- Nakielski, P., & Pierini, F. (2019). Blood interactions with nano- and microfibers: Recent advances, challenges and applications in nano- and microfibrinous hemostatic agents. *Acta Biomaterialia*, 84, 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.029>
- nanomedicine | Definition, Research, & Applications | Britannica*. (n.d.). Retrieved July 4, 2022, from <https://www.britannica.com/science/nanomedicine>
- Ockerman, A., Vanassche, T., Garip, M., Vandenbrielle, C., Engelen, M. M., Martens, J., Politis, C., Jacobs, R., & Verhamme, P. (2021). Tranexamic acid for the prevention and treatment of bleeding in surgery, trauma and bleeding disorders: a narrative review. *Thrombosis Journal* 2021 19:1, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12959-021-00303-9>
- Okamoto et al. (1970). NII-Electronic Library Service. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 43, 2091.
- OP9 | ATCC*. (n.d.). Retrieved May 10, 2022, from <https://www.atcc.org/products/crl-2749#detailed-product-information>
- OPS/OMS | Ácido traxenámico en pacientes de trauma*. (n.d.). Retrieved January 19, 2021, from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8875:2013-case-study-on-tranexamic-acid-trauma-patients&Itemid=40275&lang=es
- Pabinger, I., Fries, D., Schöch, H., Streif, W., & Toller, W. (2017). Tranexamic acid for treatment and prophylaxis of bleeding and hyperfibrinolysis. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 129(9–10), 303–316. <https://doi.org/10.1007/s00508-017-1194-y>
- Panés, J. (1999). Gastroenterología y hepatología. In *Gastroenterología y Hepatología* (Vol. 22, Issue 10). Ediciones Doyma. <http://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-moleculas-adhesion-su-papel-fisiopatologia-8166>
- Pawlak, A., & Mucha, M. (2003). Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, 396(1–2), 153–166. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00523-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00523-3)
- Peden, M. M. (2004). *Informe mundial sobre prevención de los traumatismos causados por el tránsito* (Issue 599). Pan American Health Org.
- Piccolo, M., Aceto, M., & Vitorino, T. (2019). UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, 4(4). <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0008>





Referencias

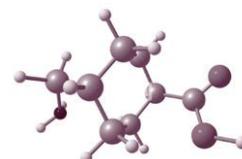
- Pinto, A. M. F. R., Oliveira, V. B., & Falcão, D. S. (2018). Experimental methods of characterization. In *Direct Alcohol Fuel Cells for Portable Applications* (pp. 113–155). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811849-8.00004-8>
- Pita-López, M. L., Fletes-Vargas, G., Espinosa-Andrews, H., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2021). Physically cross-linked chitosan-based hydrogels for tissue engineering applications: A state-of-the-art review. *European Polymer Journal*, *145*, 110176. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110176>
- Pourhakkak, P., Taghizadeh, A., Taghizadeh, M., Ghaedi, M., & Haghdoost, S. (2021). Fundamentals of adsorption technology. *Interface Science and Technology*, *33*, 1–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818805-7.00001-1>
- Qasim, S. B., Zafar, M. S., Najeeb, S., Khurshid, Z., Shah, A. H., Husain, S., & Rehman, I. U. (2018). Electrospinning of chitosan-based solutions for tissue engineering and regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020407>
- Qu, B., & Luo, Y. (2020). Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *152*, 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.240>
- Radhakrishnan, S., Nagarajan, S., Bechelany, M., & Kalkura, S. N. (2020). Collagen based biomaterials for tissue engineering applications: A review. *Lecture Notes in Earth System Sciences*, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21614-6_1/COVER/
- Rashedi, S. M., Khajavi, R., Rashidi, A., Rahimi, M. K., & Bahador, A. (2021). (No Title). *Iran. J. Biotechnol*, *19*(3), 2737. <https://doi.org/10.30498/ijb.2021.220458.2737>
- Rezvani Ghomi, E., Nourbakhsh, N., Akbari Kenari, M., Zare, M., & Ramakrishna, S. (2021). Collagen-based biomaterials for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *109*(12), 1986–1999. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.34881>
- Roberts, I., Perel, P., Prieto-Merino, D., Shakur, H., Coats, T., Hunt, B. J., Lecky, F., Brohi, K., & Willett, K. (2012). Effect of tranexamic acid on mortality in patients with traumatic bleeding: prespecified analysis of data from randomised controlled trial. *BMJ*, *345*(sep11 1), e5839–e5839. <https://doi.org/10.1136/bmj.e5839>

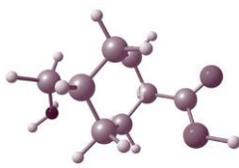




Referencias

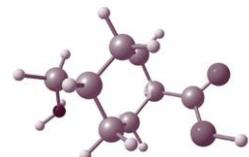
- Rohani Shirvan, A., Nouri, A., & Wen, C. (2021). Structural polymer biomaterials. *Structural Biomaterials*, 395–439. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818831-6.00010-0>
- Sasmal, P., & Datta, P. (2019). Tranexamic acid-loaded chitosan electrospun nanofibers as drug delivery system for hemorrhage control applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 559–567.
- Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006.
- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C. J., & Wess, T. J. (2004). Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, 25(5), 795–801. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00595-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00595-7)
- Soares, S., Sousa, J., Pais, A., & Vitorino, C. (2018). Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues. *Frontiers in Chemistry*, 6(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360>
- Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions*. (n.d.). Retrieved May 24, 2022, from <https://www.astm.org/standards/e2149>
- Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*. (n.d.). Retrieved May 24, 2022, from <https://www.astm.org/d0882-12.html>
- Stani, C., Vaccari, L., Mitri, E., & Birarda, G. (2020). FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 229, 118006. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.118006>
- Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1819–1846. <https://doi.org/10.3390/md13041819>
- Tang, X., Thankappan, S. K., Lee, P., Fard, S. E., Harmon, M. D., Tran, K., & Yu, X. (2014). Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, 351–371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00022-3>
- Taravel, M. N., & Domard, A. (1995). Collagen and its interaction with chitosan. II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials*, 16(11), 865–871. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)94149-F](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)94149-F)

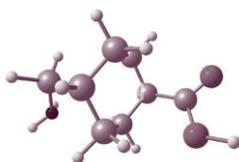




Referencias

- Teoh, W. Y., Tan, T. G., Ng, K. T., Ong, K. X., Chan, X. L., Hung Tsan, S. E., & Wang, C. Y. (2021). Prophylactic Topical Tranexamic Acid Versus Placebo in Surgical Patients: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Annals of Surgery*, 273(4), 676–683. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003896>
- Torres-Martínez, E. J., Bravo, J. M. C., Medina, A. S., González, G. L. P., & Gómez, L. J. V. (2018). A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices. *Current Drug Delivery*, 15(10), 1360. <https://doi.org/10.2174/1567201815666180723114326>
- Trelstad, R. L., Catanese, V. M., & Rubin, D. F. (1976). Collagen fractionation: Separation of native types I, II and III by differential precipitation. *Analytical Biochemistry*, 71(1), 114–118. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90016-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90016-6)
- US5836970A - Hemostatic wound dressing - Google Patents. (n.d.). Retrieved January 19, 2021, from <https://patents.google.com/patent/US5836970A/en>
- Vasco, S. R., Isaza, C. A. V., Suaza, M. L. M., Giraldo, J. Z., & Acevedo, M. E. M. (2016). *Ingeniería de tejidos y aplicaciones*. Instituto Tecnológico Metropolitano.
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New Fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*, 93(1), 327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>
- Wang, C., Wang, J., Zeng, L., Qiao, Z., Liu, X., Liu, H., Zhang, J., & Ding, J. (2019). Fabrication of electrospun polymer nanofibers with diverse morphologies. *Molecules*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050834>
- Wang, H., Li, M., Hu, J., Wang, C., Xu, S., & Han, C. C. (2013). Multiple targeted drugs carrying biodegradable membrane barrier: anti-adhesion, hemostasis, and anti-infection. *Biomacromolecules*, 14(4), 954–961.
- Wang, X. H., Cui, F. Z., Feng, Q. L., Li, J. C., & Zhang, Y. H. (2003). Preparation and Characterization of Collagen/Chitosan Matrices As Potential Biomaterials. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 18(6), 453–467. <https://doi.org/10.1177/0883911503040434>
- Wang, X., Sang, L., Luo, D., & Li, X. (2011). From collagen–chitosan blends to three-dimensional scaffolds: The influences of chitosan on collagen nanofibrillar structure and mechanical property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 233–240. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2010.08.047>





Referencias

- Webster, T. J. (2006). Nanomedicine: what's in a definition? *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), 115. <https://doi.org/10.2147/NANO.2006.1.2.115>
- Weng, L., & Xie, J. (2015). Smart Electrospun Nanofibers for Controlled Drug Release: Recent Advances and New Perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, 21(15), 1944–1959. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150302151959>
- Zareh, M. M., Wassel, A. A., & Abd Alkarem, Y. M. (2016). Electrochemical sensors for determination of tranexamic acid in pure form and pharmaceutical preparations. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 1, 5–12.
- Zhong, Q.-K., Wu, Z.-Y., Qin, Y.-Q., Hu, Z., Li, S.-D., Yang, Z.-M., & Li, P.-W. (2019). Preparation and properties of carboxymethyl chitosan/alginate/tranexamic acid composite films. *Membranes*, 9(1), 11.

