

Universidad Pontificia Bolivariana
Escuela de Ingenierías
Facultad de Ingeniería en Nanotecnología



**DESARROLLO DE UN BIOMATERIAL HEMOSTÁTICO
COMPUESTO DE UN POLÍMERO SINTÉTICO Y NATURAL
PARA POSIBLES APLICACIONES EN EL CONTROL DE
HEMORRAGIAS EXTERNAS**

María Camila Oviedo Narvéez

Medellín- Colombia
Enero de 2020

Universidad Pontificia Bolivariana
Escuela de Ingenierías
Facultad de Ingeniería en Nanotecnología



**DESARROLLO DE UN BIOMATERIAL HEMOSTÁTICO COMPUESTO
DE UN POLÍMERO SINTÉTICO Y NATURAL PARA POSIBLES
APLICACIONES EN EL CONTROL DE HEMORRAGIAS EXTERNAS**

Trabajo de grado para optar el título profesional en Ingeniería en
Nanotecnología

María Camila Oviedo Narvéez

Directora

Ph.D, MSc, Ing. Yuliet Montoya Osorio

Asesor

Ph.D, MD. John Bustamante Osorno

Medellín-Colombia

Enero de 2020

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios sobre todas las cosas.

Agradezco al Grupo de Dinámica Cardiovascular por abrirme las puertas, recibirme con total apoyo y financiar dicha propuesta de investigación, en especial, a mi tutora, la Doctora Yuliet Montoya quien creyó desde el primer momento en la propuesta y en mí, quien apoyo mi postulación, quien afrontó el reto de guiarme en todo el proceso de aprendizaje, quien demostró su dedicación, su paciencia y respeto a mis sugerencias e ideas. A ella, por su dirección, su exigencia y rigor.

Por el apoyo y el esfuerzo de encaminar el proyecto a algo realizable, agradezco al Doctor John Bustamante, quien orientó el proyecto frente todas las consultas clínicas.

A Wilson Agudelo por su dedicación, su atención al momento de atender dudas, respeto por mis sugerencias y en especial, por su compañía en todas las etapas del trabajo, mostrándome su apoyo incondicional.

Mi agradecimiento a la Doctora Alejandra García, por abrirme las puertas a una oportunidad invaluable de hacer una pasantía en las instalaciones del Centro de Investigación de Materiales Avanzados - CIMAV, a sus sugerencias y respuestas en momentos de dudas, y a su cálido recibimiento profesional y personal. Agradezco a los integrantes del grupo de Dinámica Cardiovascular que en todo momento mostraron su apoyo y me incentivaron a sacar fuerzas para la culminación del proyecto.

Gracias a mis amigos por escucharme, entenderme y levantarme el ánimo cada que lo necesite, por su apoyo vital, por sus fuerzas y alientos enfocados a la lucha de una meta personal.

Gracias a mi familia, a mis padres por inculcarme valores de responsabilidad, entrega, paciencia, cooperación, así mismo, a ellos y mis hermanos por su paciencia, comprensión, confianza y vital apoyo en todo el recorrido de este trabajo.

Finalmente, a mi amigo, quien me acompañó en todo este trayecto dándome enseñanzas a nivel académico y personal, Camilo Atehortúa.

Gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	13
ABSTRACT	14
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN Y CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN	15
Planteamiento del problema.....	15
Pregunta de investigación	16
Justificación	17
Marco teórico	18
1. Hemorragia.....	18
1.1 Mecanismo de hemostasia fisiológica	18
2. Materiales biocompuestos	20
2.1 Polímeros.....	20
2.1.1 Polímeros sintéticos.....	20
2.1.1.1 Policaprolactona (PCL).....	21
2.1.1.2 Polímeros naturales.....	21
2.1.2.1 Quitosano.....	22
3. Técnicas para obtención de materiales hemostáticos.....	23
3.1 Método de liofilización	23
3.2 Método de doble emulsión	23
3.3 Electrospinning.....	24
3.3.1 Principios de la técnica	24
4. Técnicas de caracterización del material hemostático	25
4.1 Microscopía electrónica de barrido.....	25
4.2 Pruebas mecánicas.....	25
4.3 Espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR).....	26
4.4 Ensayo de permeabilidad	26
4.5 Ensayo hemolítico	26
Estado de arte	27
Hipótesis	31
Objetivos	32
Objetivo general	32
Objetivo específico	32
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	33
Materiales	33

1. Polímeros	33
2. Solventes.....	33
3. Otros reactivos.....	33
Parte experimental	33
1. Objetivo 1	33
Preparación de soluciones de trabajo	33
Diseño experimental	34
Condiciones de electrohilatura	39
Caracterización morfológica (SEM)	39
2. Objetivo 2	40
Espectroscopia por Transformada de Fourier	40
Pruebas mecánicas.....	40
Pérdida de masa	40
3. Objetivo 3	41
Recolección de fluido sanguíneo.....	41
Ensayo hemolítico.....	41
Prueba de permeabilidad	42
Concepto ético	44
CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
1. Desarrollo de membranas electrohiladas considerando el efecto del peso molecular del quitosano en la estructura de un material biocompuesto.	45
a. Microscopía electrónica de barrido SEM	45
2. Determinar las características fisicoquímicas de membranas compuestas electrohiladas	63
a. Espectroscopia por Transformada de Fourier.....	63
b. Análisis mecánico diferencial DMA.....	65
c. Ángulo de contacto.....	67
d. Pérdida de masa	69
3. Evaluar el comportamiento hemostático y funcional in vitro del biomaterial compuesto.....	74
a. Ensayo hemolítico	74
b. Ensayo de permeabilidad.....	75
CAPITULO 4: CONCLUSIONES.....	77
Producción Científica	79
Trabajo futuro.....	80
REFERENCIAS.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen diseño de experimento No.1 para las muestras de PCL/QLMW. ...	34
Tabla 2. Resumen diseño de experimento No.1 para las muestras PCL/QMMW.	35
Tabla 3. Resumen de diseño de experimento No.2 para muestras de PCL/QLMW.....	35
Tabla 4. Resumen diseño de experimentos No. 2 para muestras de PCL/QMMW.....	36
Tabla 5. Resumen diseño de experimentos No.3 para muestras de PCL/QLMW.....	36
Tabla 6. Resumen diseño de experimentos No.3 para muestras de PCL/QMMW.....	36
Tabla 7. Resumen diseño de experimentos No.4 para muestras de PCL/QLMW.....	37
Tabla 8. Resumen diseño de experimento No.4 para muestras de PCL/QMMW.....	37
Tabla 9. Resumen diseño de experimentos No.5 para muestras de PCL/QLMW.....	38
Tabla 10. Resumen de los parámetros de electrohilatura para las muestras PCL/QMMW y PCL/QLMW.....	38
Tabla 11. Resumen diseño de experimento No.1 para las muestras de PCL/QLMW.	47
Tabla 12. Resumen diseño de experimento No.1 para las muestras de PCL/QMMW.	49
Tabla 13. Resumen de diseño de experimento No.2 para muestras de PCL/QLMW..	50
Tabla 14. Resumen diseño de experimentos No. 2 para muestras de PCL/QMMW...	51
Tabla 15. Resumen diseño de experimentos No.3 para muestras de PCL/QLMW.	53
Tabla 16. Resumen diseño de experimentos No.3 para muestras de PCL/QMMW....	54
Tabla 17. Resumen diseño de experimentos No.4 para muestras de PCL/QLMW.....	56
Tabla 18. Resumen diseño de experimento No.4 para muestras de PCL/QMMW.....	58
Tabla 19. Resumen diseño de experimentos No.5 para muestras de PCL/QLMW.	60
Tabla 20. Resumen de los parámetros de electrohilatura para las membranas de PCL/QMMW y PCL/QLMW.....	61
Tabla 21. Resumen del porcentaje de área de los grupos funcionales de las membranas compuestas y sus respectivos controles.....	65
Tabla 22. Resumen de los datos de permeabilidad para las membranas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de coagulación extrínseca. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].....	19
Figura 2. Síntesis de policaprolactona por apertura de anillo [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].	21
Figura 3. Estructura química de la policaprolactona [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].	21
Figura 4. Estructura química del quitosano [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].....	22
Figura 5. Diagrama esquemático de la técnica de electrohilatura y cada una de las variables que se involucran [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].	25
Figura 6. Esquema de preparación de soluciones de PCL y quitosano de bajo y medio peso molecular para la obtención de la solución de electrohilatura. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].	34
Figura 7. Esquema ensayo de pérdida de masa. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].	41
Figura 8. Esquema para determinar el porcentaje de hemólisis de las membranas electrohiladas de PCL/QLMW y PCL/QMMW. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].....	42
Figura 9. Esquema representativo del ensayo de permeabilidad para las membranas electrohiladas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW a presiones similares a las ejercidas en heridas externas de la piel. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].	43
Figura 10. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 1. a) Distancia 10 cm; Voltaje 10 kV, b) Distancia 15 cm; Voltaje 10 kV, c) Distancia 10 cm; Voltaje 15 kV, d) Distancia 15 cm; Voltaje 15 kV y e) Distancia 20 cm; Voltaje 15 kV.....	46
Figura 11. Gráfico de interacción entre los parámetros de respuestas y variables del diseño No.1 para membranas de PCL/QLMW. Con un n=3.....	47
Figura 12. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QMMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 1. a) Distancia 10 cm; Voltaje 10 kV, b) Distancia 15 cm; Voltaje 10 kV, c) Distancia 20 cm; Voltaje 10 kV, d) Distancia 10 cm; Voltaje 15 kV, e) Distancia 15 cm; Voltaje 15 kV y f) Distancia 20 cm; Voltaje 15 kV..	48

Figura 13. Gráfico de interacción entre parámetros respuestas y variables del diseño No.1 para membranas de PCL/QMMW. Con un n=3.	49
Figura 14. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 2. a) Distancia 15 cm; Voltaje 10 kV y b) Distancia 15 cm; Voltaje 11 kV.	50
Figura 15. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QMMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 2. a) Distancia 15 cm; Voltaje 20 kV, b) Distancia 18 cm; Voltaje 20 kV, c) Distancia 20 cm; Voltaje 20 kV, d) Distancia 15 cm; Voltaje 22 kV, e) Distancia 18 cm; Voltaje 22 kV y f) Distancia 20 cm; Voltaje 22 kV..	51
Figura 16. Gráfico de interacción entre los parámetros respuestas y variables del diseño No.2 para membranas de PCL/QMMW. Con un n=3.	52
Figura 17. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 3. a) Distancia 10 cm; Voltaje 11 kV y b) Distancia 20 cm; Voltaje 11 kV.	53
Figura 18. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QMMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 3. a) Relación (PCL: QMMW) 4:6, b) Relación (PCL: QMMW) 5:5 y c) Relación (PCL: QMMW) 6:4.....	54
Figura 19. Micrografías de las membranas electrohiladas de PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 4. a) Relación (PCL: QLMW) 4:6, b) Relación (PCL: QLMW) 5:5, c) Relación (PCL: QLMW) 6:4 y d) Relación (PCL: QLMW) 7:3.	55
Figura 20. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QMMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 4. a) Distancia 18 cm; Flujo 0,3 ml/h, b) Distancia 20 cm; Flujo 0,3 ml/h, c) Distancia 25 cm; Flujo 0,3 ml/h, d) Distancia 18 cm; Flujo 0,5 ml/h, e) Distancia 20 cm; Flujo 0,5 ml/h y f) Distancia 25 cm; Flujo 0,5 ml/h.	57
Figura 21. Gráfico de interacción entre parámetros respuestas y variables del diseño No.4 PCL/QMMW. Con n=3.....	58
Figura 22. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 5. a) Distancia 18 cm; Flujo 0,3 ml/h, b) Distancia 25 cm; Flujo 0,3 ml/h, c) Distancia 18 cm; Flujo 0,5 ml/h, d) Distancia 20 cm; Flujo 0,5 ml/h y e) Distancia 25 cm; Flujo 0,5 ml/h.	59
Figura 23. Gráfico de interacción entre parámetros respuestas y variables del diseño No.5 PCL/QMMW. Con un n=3.....	60
Figura 24. Micrografías las membranas de PCL/QMMW y PCL/QLMW. a) PA/PM/PB de PCL/QLMW, b) PA/PM/PB de PCL/QMMW, c) PB/PM/PA de PCL/QLMW, d) PB/PM/PA de PCL/QLMW.	61

Figura 25. Espectros de FTIR de las membranas electrohiladas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW.	63
Figura 26. Espectros de FTIR de control de QLMW y membranas electrohiladas de PCL/QLMW.	64
Figura 27. Espectros de FTIR de las muestras de control de QMMW y membranas electrohiladas de PCL/QMMW.....	64
Figura 28. Esquema de posible interacción por puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de la PCL y el quitosano. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].....	65
Figura 29. Gráfico de Esfuerzo (%) versus Deformación (MPa) para las muestras de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW. Con n=3.....	66
Figura 30. Resumen de los ángulos de contacto para las muestras de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW en interacción con agua. Con n=3.....	68
Figura 31. Resumen de los ángulos de contacto para las muestras PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW en interacción con plasma. Con n=3.	68
Figura 32. Gráfico de interacciones tipo de membrana y ángulo de contacto. Con n=3.	69
Figura 33. Micrografías de muestras que interactuaron en medio básico por un tiempo de 4h. a) PCL, b) PCL/QLMW, c) PCL/QMMW.....	70
Figura 34. Gráfico de pérdida de masa versus tiempo para membranas electrohiladas de PCL, PCL/QMMW y PCL/QLMW en interacción con medios básicos. Con n=3.	70
Figura 35. Micrografías de muestras que interactuaron en medio neutro por un tiempo de 4h. a) PCL, b) PCL/QLMW, c) PCL/QMMW.....	71
Figura 36. Gráfico de pérdida de masa versus tiempo para membranas electrohiladas de PCL, PCL/QMMW y PCL/QLMW en interacción con medios neutros. Con n=3.	71
Figura 37. Micrografías de las muestras que interactuaron en medio ácido por un tiempo de 4h. a) PCL, b) PCL/QLMW, c) PCL/QMMW.....	72
Figura 38. Gráfico de pérdida de masa versus tiempo para para membranas electrohiladas de PCL, PCL/QMMW y PCL/QLMW en interacción con medios ácidos. Con n=3.....	73
Figura 39. Gráfico de absorbancia versus porcentaje de hemólisis para muestras de PCL/QLMW y PCL/QMMW, control positivo y control negativo. Con n=3.	74
Figura 40. Grafica de absorbancia vs porcentaje de hemólisis para muestras de PCL/QLMW y PCL/QMMW. Con n=3.	75

Figura 41. Gráfico de presión versus permeabilidad para membranas electrohiladas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW. 75

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resumen de datos PCL/QLMW No.1 para cálculo de significancia estadística.	81
Anexo 2. Resumen de datos PCL/QMMW No.1 para cálculo de significancia estadística.	81
Anexo 3 .Gráfico de medias entre diámetro de fibra- Distancia para diseño de experimento No.1 PCL/QMMW. Con n=3.	81
Anexo 4. Resumen de datos PCL/QMMW No.2 para cálculo de significancia estadística.	81
Anexo 5. Gráfico de medias entre diámetro de fibra-Voltaje para diseño de experimento No. 2 PCL/QMMW. Con n=3.....	82
Anexo 6. Resumen de datos PCL/QMMW No.3 para cálculo de significancia estadística.	82
Anexo 7. Gráfico de medias entre diámetro de fibra-Voltaje para diseño de experimento No. 3 PCL/QMMW. Con n=3.....	82
Anexo 8. Resumen de datos PCL/QLMW No.4 para cálculo de significancia estadística.	82
Anexo 9. Gráfico de medias entre diámetro de fibra- Flujo para diseño de experimento No. 4 PCL/QMMW. Con n=3.....	83
Anexo 10. Gráfico de medias entre diámetro de fibra- distancia para diseño de experimento No. 4 PCL/QMMW. Con n=3.	83
Anexo 11. Resumen de datos prueba mecánica para cálculo de significancia estadística.	83
Anexo 12. Resumen de datos ángulo de contacto para cálculo de significancia estadística.	83
Anexo 13. Resumen de datos de pérdida de masa para cálculo de significancia estadística.	84
Anexo 14. Resumen de datos permeabilidad para cálculo de significancia estadística.	84
Anexo 15. Gráfico de medias entre permeabilidad y muestra. Con n=3.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido acético

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AF: Ácido fórmico

ATR: Reflexión total atenuada

Ca²⁺: Calcio

CN: Control negativo - prueba de hemólisis

CP: Control positivo - prueba de hemólisis

DMA: Análisis dinámico mecánico

FESEM: Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

FLa: Fosfolípidos ácidos

FT: Factor tisular

FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

OH: Grupo hidroxilo

PEO: Óxido de polietileno

PCL: Policaprolactona

PLA: Ácido poliláctico

PVA: Alcohol polivinílico

QLMW: Quitosano de bajo peso molecular

QMMW: Quitosano de mediano peso molecular

SEM: Microscopía electrónica de Barrido

TNF- α : Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

Introducción: En la actualidad, el control de hemorragias sigue siendo un problema en el área de la salud, militar y deportiva, debido a las falencias y efectos secundarios que tienen algunos materiales hemostáticos a la hora de intervenir en la activación química o física de la cascada de coagulación. El siguiente trabajo, presenta el desarrollo de una membrana electrohilada hemostática compuesta de policaprolactona y quitosano de bajo y mediano peso molecular con el fin de evaluar su posible aplicación en el control de hemorragias capilares de las capas externas de la piel.

Metodología: Para el desarrollo del proyecto se plantearon tres fases que consistieron en el desarrollo de la membrana de PCL/QLMW y PCL/QMMW considerando el efecto del peso molecular del quitosano en la microarquitectura del material, la evaluación de las características fisicoquímicas y el comportamiento hemolítico del material biocompuesto. Por consiguiente, se utilizó la técnica de *electrospinning* para obtener el material compuesto, se realizaron caracterizaciones morfológicas, fisicoquímicas como microscopía electrónica de barrido (SEM), DMA, FTIR, ángulo de contacto, ensayo de degradación y permeabilidad, así mismo, se llevó a cabo ensayo de hemólisis acorde a la norma ISO 10993-4.

Resultados y discusión: Los resultados demuestran que el cambio en los parámetros de obtención de membranas electrohiladas por la técnica de *electrospinning*, el cambio en el peso molecular y la adicción de quitosano al material biocompuesto disminuyen el diámetro promedio de las fibras y alteran la microarquitectura de las membranas obtenidas así mismo, aparte de la presencia del quitosano en la muestra, estas características aumentan el módulo de Young, la humectabilidad, permeabilidad de la membrana, además de favorecer un menor porcentaje de hemólisis, el cual se encuentra por debajo del 5 %, valor permitido para la aplicación de dispositivos médicos por la norma ISO 10993-4 estipulada para la evaluación biológica de productos sanitarios.

Conclusiones: Se concluye que las condiciones de la solución como viscosidad y concentración, así como los parámetros de electrohilatura como voltaje, flujo y distancia entre la aguja-colector juegan un papel importante en la homogeneidad, defectos y diámetro de fibra de las membranas de quitosano y policaprolactona. Así mismo, los efectos que producen la adicción de quitosano, el peso y la interacción molecular que hay entre el polímero sintético y natural producen un aumento en el módulo de Young y ángulo de contacto, lo que incide en el comportamiento biodegradable, permeable y hemolítico de la membrana.

Palabras claves: Membrana hemostática; quitosano, policaprolactona, *electrospinning*, peso molecular.

ABSTRACT

Introduction: Currently, control of bleeding remains a problem in the area of health, military and sports, due to the failures and side effects that have some hemostatic materials when intervening in the chemical or physical activation cascade coagulation. This research investigation development of a hemostatic electrohilated membrane composed of polycaprolactone and low and medium molecular weight chitosan in order to evaluate its possible application in the control of bleeding of the outer layers of the skin.

Methodology: For the development of the project, three phases were proposed which consisted of the development of the PCL/QLMW and PCL/QMMW membrane considering the effect of the molecular weight of the chitosan on the microarchitecture of the material, the evaluation of the physicochemical characteristics and the hemolytic behavior of the biocomposite material. Therefore, the electrospinning technique was used to obtain the composite material, morphological and physicochemical characterizations such as scanning electron microscopy (SEM), DMA, FTIR, contact angle, degradation and permeability test were carried out, as well as hemolysis test according to ISO 10993-4.

Results and discussion: The results shown that change in the parameters of obtaining electrospinning membranes, in molecular weight and incorporation of chitosan to the biocomposite material reduce the average diameter of the fibers and modify the microarchitecture of the membranes obtained. Moreover, besides the presence of chitosan in the sample, these characteristics increase Young's modulus, wettability, membrane permeability, in addition to favoring a lower percentage of hemolysis, which is below 5%, the value allowed for the application of medical devices by the ISO 10993-4 standard stipulated for the biological evaluation of medical devices.

Conclusions: Solution conditions such as viscosity and concentration, as well as, electrospinning parameters such as voltage, flow rate and needle-collector distance play an important role in homogeneity, defects and fiber diameter of chitosan and polycaprolactone membranes. Likewise, the effects that produce the incorporation of chitosan, weight and molecular interaction between synthetic and natural polymer produce an increase in Young's modulus and contact angle, which affects the biodegradable, permeable and hemolytic behavior of the membrane.

Keywords: *Hemostasis membrane; chitosan, polycaprolactone, electrospinning, molecular weight*

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN Y CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el control de hemorragias sigue siendo un grave problema en áreas específicas como la industria de la salud, donde se presentan algunos tipos de hemorragias en diferentes intervenciones quirúrgicas y tratamientos, que involucran una incisión y un contacto interno con el paciente. En Colombia, las hemorragias son la causa de muerte en el 80 % de los decesos en el quirófano y un 50 % de las muertes durante las primeras 24 horas después de un trauma. Dentro de las principales causas de mortalidad temprana en el paciente traumatizado se encuentra la lesión del sistema nervioso central y el choque hemorrágico. No obstante, a diferencia del trauma grave del sistema nervioso central que ocasiona gran porcentaje de mortalidad prehospitalaria y pocas posibilidades de intervención temprana, el choque hemorrágico, aunque causa hasta un 40% de las muertes por trauma, es más susceptible de permitir maniobras para reducir la morbimortalidad [1]. Adicionalmente, si el daño en el sistema nervioso central coexiste con choque hemorrágico, como sucede hasta en el 25 % de los casos, la probabilidad de muerte aumenta de 2 a 3 veces [2]. Datos como estos demuestran la importancia del control temprano de la hemorragia en el paciente traumatizado.

En deportes extremos como alpinismo, montañismo, ciclismo de montaña, entre otros, los deportistas están expuestos a diferentes escenarios de riesgo inherentes a las actividades propias de cada deporte. Dentro de esta problemática deportiva existe la posibilidad de que se generen lesiones en las capas de la piel lo que puede desencadenar una hipotensión temprana, así como falla multiorgánica que se presentan en aproximadamente 24% de los casos, e infección en un 39 % estos factores hacen que haya un aumento de la probabilidad de muerte de las personas afectadas [3]. Por otro lado, dentro del campo militar, algunas estadísticas indican que hasta el 20 % de los fallecimientos se producen antes de que se pueda recibir asistencia sanitaria, y si bien gran porcentaje de los heridos sobreviven para ser evacuados a una formación de asistencia sanitaria con capacidad quirúrgica, la hemorragia continúa siendo la primera causa de muerte y supone hasta el 50 % de los casos [4].

Basado en lo anterior, se han planteado diferentes opciones para el control de las hemorragias externas del tipo venosa, capilares y en algunos casos arteriales, como el uso de esponjas quirúrgicas, películas, hidrogeles, tejidos y no tejidos con propiedades hemostáticas para ayudar a una rápida reducción del sangrado, lo que favorece la estabilidad en la cascada de coagulación [5]. Para ello, se han estudiado alternativas a partir de compuestos de origen natural como celulosa, almidón, quitosano, alginato y gelatina; y de origen sintético como el polietilenglicol, cianoacrilato y policaprolactona [6], [7]. Además, se ha experimentado con la combinación de materiales tales como zeolita, caolín y esmectita, y derivados biológicos, como fibrinógeno y trombina, a los cuales se le ha reportado un comportamiento favorable de biocompatibilidad y funcionalidad, características consideradas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) dentro de las pruebas de la viabilidad celular, hemocompatibilidad y degradabilidad, donde estas determinan una adecuada interacción con el tejido dentro del desarrollo de apósitos [8] [9]. De otro lado, se ha reportado la ineffectividad de algunos materiales como agentes hemostáticos, como es el caso del material comercial

QuickClot, cuyo componente principal es la zeolita, la cual genera una reacción exotérmica al momento de interactuar con la sangre [2], por lo cual surge la necesidad de plantear alternativas a las técnicas convencionales para el tratamiento de hemorragias dérmicas y así reducir la morbilidad derivada de estas lesiones.

Alrededor de este propósito, la técnica de electrohilado, cuenta con un gran campo de estudio gracias a la posibilidad de generar fibras a escala micro y nanométrica, lo cual podría favorecer procesos a diferentes áreas como bioingeniería, biomédica, ingeniería de tejidos, entre otros. A su vez, la versatilidad de esta técnica permite procesar una gran variedad de polímeros, tanto de origen natural como sintético sin embargo, durante la formación de las fibras existe una serie de variables que influyen en el comportamiento de las matrices obtenidas, sea por las propiedades inherentes de los materiales que se involucran en el proceso o por las condiciones del electrohilado [10]. Adicionalmente, estos parámetros aportan a la obtención de estructuras con gran área superficial, porosidad y aumento en propiedades mecánicas y biológicas; lo que ha favorecido el desarrollo de apósitos con propiedades antibacteriales, andamios que favorecen el proceso de regeneración epitelial o membranas para el transporte y liberación controlada de fármacos que son base para el tratamiento de enfermedades [11].

De igual forma, la capacidad de generar no tejidos por medio de *electrospinning*, ha generado interés en el desarrollo de microarquitecturas que favorezcan el proceso de coagulación, debido a que la densidad de fibra y patrones de tejidos tienen efectos sobre la eficacia hemostática [5], no obstante, a pesar que se ha realizado poca investigación en el desarrollo de microarquitecturas que intervengan en la cascada de hemostasia, una alta densidad de fibra restringe el crecimiento celular y el transporte masivo de nutrientes, así como provoca una lenta absorción de agua o sangre debido a las estructuras fibrilares, por ello la importancia de generar microarquitecturas con diámetro de fibras en escala nanométrica, porosidad y homogeneidad fibrilar [12].

Basado en lo anterior, y considerando la ineffectividad de algunos materiales como agentes hemostáticos que no logran favorecer efectivamente la activación de la cascada de coagulación, sumado a las diferencias en el peso molecular del quitosano que cambian su composición química y favorecen mayores sitios activos para la formación de interacciones bioquímicas que mejoran las propiedades hidrofílicas, mecánicas y morfológicas, la siguiente investigación, tuvo como propósito el desarrollo una membrana electrohilada hemostática compuesta de policaprolactona y quitosano de bajo y medio peso molecular como biomaterial para posible aplicación en el control de hemorragias capilares en capas externas de la piel.

Pregunta de investigación

¿Qué tipo de microarquitectura podría favorecer un comportamiento hemostático de una membrana electrohilada compuesta de policaprolactona y quitosano como apósito para aplicaciones en el control de hemorragias externas?

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el creciente interés por parte de algunos campos como el militar y de la salud, acerca de la fabricación de materiales hemostáticos, que permitan la formación y estabilización de la cascada de coagulación, para así favorecer el proceso de hemostasia, necesaria para tratar traumas de capas externas de la piel causados por agentes externos, se visualiza como un área creciente de desarrollo y terapia alternativa. De otro lado, la presencia de efectos secundarios como reacciones exotérmicas generadas por el material que compone el agente hemostático y la poca investigación sobre la influencia de la microarquitectura en la respuesta hemocompatible de un material, sugiere implementar estrategias para la modificación de microarquitecturas de membranas electrohiladas que favorezca una densidad fibrilar y porosidad adecuada para la activación y adhesión de factores de coagulación.

En el siguiente proyecto evaluó el comportamiento hemolítico y funcional *in vitro* de membranas electrohiladas de policaprolactona y quitosano, considerando el efecto del peso molecular del quitosano y los parámetros de obtención de microarquitectura fibrilares mediante la técnica de *electrospinning*. Esta información fue soportada con las caracterizaciones fisicoquímicas, morfológicas, mecánicas, hemolíticas y funcionales de la membrana, con el fin de determinar su posible aplicación en el control de hemorragias en capas externas de la piel.

Este desarrollo se podrá adaptar a las necesidades investigativas del Grupo de Dinámica Cardiovascular y al Grupo de Trabajo de Bioingeniería Cardiovascular de la Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, en el marco de diferentes proyectos enfocados en buscar alternativas para el tratamiento de traumas vasculares periféricos, posibilitando así la evaluación y validación *in vitro* de estructuras con potencial hemostático y biocompatible. Una de las ventajas de este desarrollo podría ser la estructura fibrilar a escala nanométrica de una de las capas de la membrana electrohilada, puesto que, se aumenta el área superficial de contacto y favorecerá una rápida activación de la cascada de coagulación.

MARCO TEÓRICO

1. Hemorragia

La hemorragia es un trastorno caracterizado por la salida de sangre debido a una rotura o lesión en los vasos sanguíneos [13]. Esta se puede clasificar según su naturaleza o destino final como hemorragias internas definidas así por la concentración de sangre en el interior del organismo gracias al sangrado de un vaso sanguíneo, estas hemorragias pueden ser identificadas por producir un estado de shock al paciente y no encontrar sangrados visibles; así mismo están las hemorragias externas, la cual se caracteriza por la salida de sangre al exterior del organismo por una rotura o herida de la piel, son identificadas por ser hemorragias visibles en donde el vaso sangrante se expone a la superficie [14].

Generalmente, las hemorragias que se presentan con mayor frecuencia son las hemorragias externas en zonas específicas como son las extremidades, ya que son las partes del cuerpo más expuestas a traumatismo de tipo laboral o deportivo y es el lugar donde los vasos pasan de forma más superficial, debido a esto, este tipo de hemorragia origina otro tipo de clasificación conocidas según el origen, donde se encuentran las hemorragias arteriales, las cuales se caracterizan por presentar herida o lesión en una arteria y cuyo sangrado denota un color rojo brillante, además son hemorragias abundantes debido a la fuerza contráctil del corazón y de la capa muscular de las arterias que coincide con cada pulsación sanguínea; están las hemorragias venosas que se definen como la salida de sangre producida por la afectación de una vena, es de color rojo oscuro debido a la escasa saturación de oxígeno y su flujo es continuo y sin fuerza, por último están las hemorragias capilares las cuales son las que provienen del daño de arteriolas y arterias pequeñas, caracterizada por presentar sangre de color brillante y un flujo en poca cantidad [15].

Es importante entender el mecanismo de la hemostasia de manera fisiológica, para esto es necesario recordar que en la sangre existen varios elementos de naturaleza proteica que reacciona entre sí de forma química o enzimática, esto da como resultado la formación de fibrina que constituye el coagulo sanguíneo; además de presentar respuestas de forma mecánica dentro de las estructuras celulares para detener el sangrado.

1.1 Mecanismo de hemostasia fisiológica

Dos son los mecanismos que actúan a nivel local para detener la hemorragia; uno consiste en una activación química para lograr desencadenar una cascada que ayude a la coagulación y la otra, que actúa de manera sistémica es la respuesta mecánica de algunas estructuras.

Así, para el proceso de coagulación aparecen diversas reacciones dentro del organismo de la persona afectada, en primer lugar, tenemos la protrombina que es una albúmina soluble sintetizada en órganos como el hígado, y cuyo proceso de síntesis se necesita la presencia de vitamina K⁺, esta albúmina al ser activada tiene una elevada capacidad de coagular el fibrinógeno. La sustancia encargada de activar a la protrombina es la tromboplastina y para hacerlo necesita de la presencia del ion calcio. La tromboplastina se encuentra solo en el interior de los tejidos, y de manera especial, en las plaquetas. Una vez la protrombina ha sido activada actúa sobre el fibrinógeno en forma de enzima

y lo coagula. El pH óptimo para esta reacción se encuentra en el rango de 6,8 y 8,5; el aumento de temperatura es proporcional a la velocidad de reacción y puede alcanzar una temperatura de unos 50° C. La concentración salina del medio es desfavorable, aunque los iones de Ca^{+2} la aceleran y la ayudan a formar un coágulo más resistente [16], [17].

De igual manera, ante la agresión mecánica, las capas musculares del vaso se contraen en respuesta, disminuyendo notablemente su calibre y así la salida de sangre. Así mismo las fibras elásticas de la pared del vaso, al ser seccionadas, se retraen; y al retraerse se engrosan y protruyen en la luz del vaso, reduciendo su calibre, lo que puede causar un aumento de presión en el intersticio que puede llegar a colapsar la pared del vaso y detener la hemorragia (Ver Figura 1) [18].

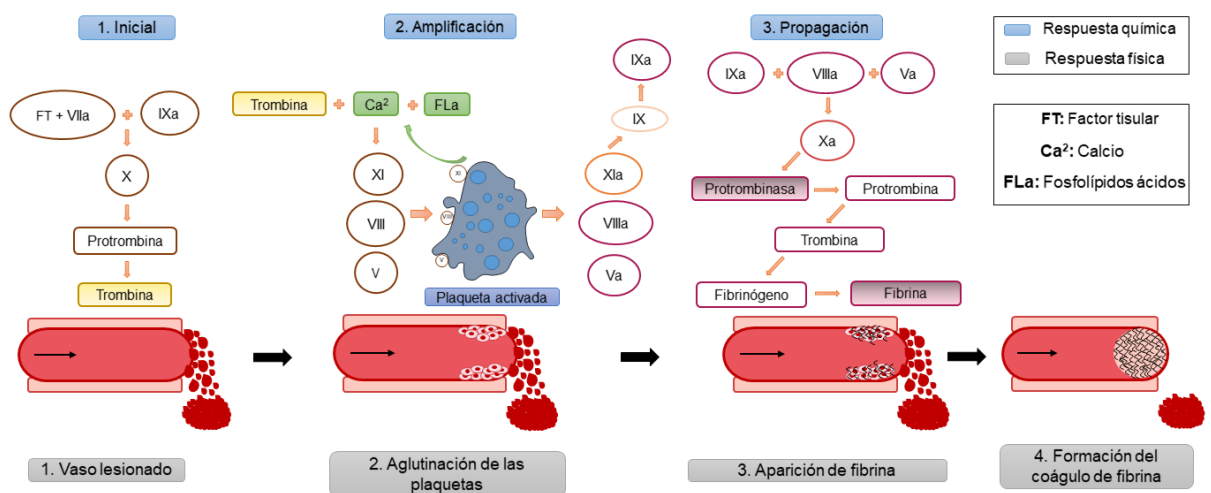


Figura 1. Vía de coagulación extrínseca. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular]

Teniendo en cuenta, la importancia de la hemocompatibilidad para materiales biomédicos que interactúen de forma directa con el cuerpo, se resalta el papel de la hemólisis dentro del proceso de coagulación, debido a que a mayores porcentajes de esta se podrían generar efectos como hipercoagulación, tromboembolismo o coagulación intravascular [19]. Derivado del proceso de hemólisis, la lisis de los glóbulos rojos produce la liberación de difosfato de adenosina, el cual aumenta el ensamblaje, la adhesión y agregación plaquetaria [20]. Así mismo, se libera la hemoglobina la cual es capaz de desencadenar tres comportamientos que consisten en: la atracción del óxido nítrico, el cual es un factor relajante que disminuye la activación plaquetaria y adhesión celular [21]; la regulación de la actividad de la hemo oxigenasa, que genera especies reactivas de oxígeno y activa células endoteliales y macrófagos; y la producción de TNF- α (Factor de necrosis tumoral) que induce la expresión del factor tisular en las células endoteliales y disminuye la expresión endotelial de la trombomodulina, factor modulador de la actividad de la trombina [22].

2. Materiales biocompuestos

Un biocompuesto es un material compuesto por dos o más materiales constituyentes distintos (uno derivado naturalmente) que se combinan para producir un nuevo material con un rendimiento mejorado sobre los materiales constituyentes individuales. Entre los componentes, se encuentra la matriz que se encarga de otorgar estructura y estabilidad al material, por lo general, son los polímeros sintéticos los más utilizados en estos casos. Por otro lado, se encuentra el refuerzo, el cual aporta las propiedades mecánicas, biocompatibles, fisicoquímicas, entre otras; los materiales más utilizados para este tipo de función son los polímeros naturales en los cuales se aprovechan las propiedades inherentes de los mismos. Cabe tener en cuenta que, ambos constituyentes permanecen unidos por interacciones físicas o químicas, pero conservan sus identidades físicas o químicas individuales [23].

2.1 Polímeros

Los polímeros son materiales hechos de largas cadenas de moléculas más pequeñas llamadas monómeros que se repiten. Estos materiales tienen propiedades únicas, según el tipo de moléculas que se unen y cómo se unen [24]. Hay dos tipos de polímeros: naturales y sintéticos. Los polímeros naturales se pueden encontrar en criaturas vivas y plantas; por ejemplo, seda, lana, ADN, celulosa y proteínas. Los polímeros sintéticos, como su nombre indica, se sintetizan en el laboratorio a través de una serie de reacciones químicas. Ejemplos de dichos polímeros son nylon, polietileno, polipropileno, caucho y poliuretano [25].

2.1.1 Polímeros sintéticos

Un polímero sintético es una macromolécula hecha por el hombre constituida de miles de unidades repetitivas. Estos polímeros pueden ser de cadena recta, es decir, una larga cadena de monómeros enlazados de extremo a extremo o de cadena recta y ramificada, esto significa que las cadenas vecinas se unirán entre sí y formarán grandes estructuras parecidas a redes. Este tipo de enlace entre cadenas se llama reticulación [26].

El proceso por el cual los polímeros se forman a partir de monómeros se llama polimerización. La polimerización ocurre por una de dos reacciones básicas: adición o condensación. Una polimerización por adición se da cuando la molécula de monómero pasa a formar parte del polímero sin pérdida de átomos, es decir, la composición química de la cadena resultante es igual a la suma de las composiciones químicas de los monómeros que la conforman. Por otro lado, una policondensación se da si la molécula de monómero pierde átomos cuando pasa a formar parte del polímero. Por lo general se pierde una molécula pequeña, como agua [27].

Las reacciones de polimerización pueden dividirse en dos categorías principales: procesos por etapas y procesos de tipo cadena. En la polimerización por crecimiento en cadena los monómeros pasan a formar parte de la cadena de uno en uno y en la polimerización por crecimiento en etapas las cadenas en crecimiento pueden reaccionar entre sí para formar cadenas aún más largas [28].

Las ventajas de los polímeros sintéticos o artificiales incluyen la estabilidad y la consistencia del material, igualmente que son livianos, tienen alta resistencia mecánica y perduran en el tiempo. Su fabricación es económica y son fácilmente moldeables en diferentes formas. Algunos de los polímeros más comunes y versátiles sobre todo para aplicaciones biomédicas en materiales biocompuestos son el ácido poliláctico (PLA),

alcohol polivinílico (PVA), policaprolactona (PCL) y óxido de polietileno (PEO), siendo los dos últimos los elegidos para el presente trabajo [29].

2.1.1.1 Policaprolactona (PCL)

La policaprolactona (PCL) es un poliéster lineal semicristalino, con bajo punto de fusión (60°C) y temperatura vítrea alrededor de los -60°C, es altamente hidrofóbico y biodegradable [30]. Su proceso de síntesis se da mediante la polimerización de apertura de anillo de ϵ -caprolactona utilizando un catalizador como el octanoato estaño, (ver Figura 2).

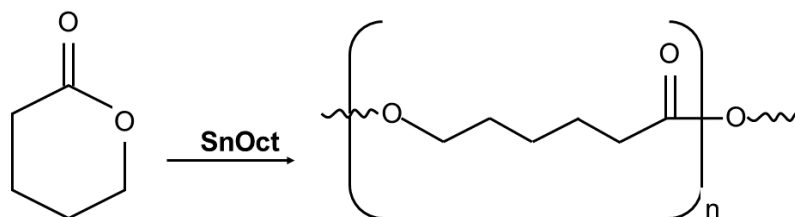


Figura 2. Síntesis de policaprolactona por apertura de anillo [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

La estructura molecular de la PCL consta de un grupo éster polar y cinco grupos metilenos con características apolares, como se evidencia en la Figura 3. Esto, le confieren a la molécula propiedades mecánicas similares a las de las olefinas. Así mismo, su biodegradabilidad en medios biológicos *in vitro* e *in vivo* es consecuencia de la susceptibilidad de los enlaces ésteres a la hidrólisis [31].

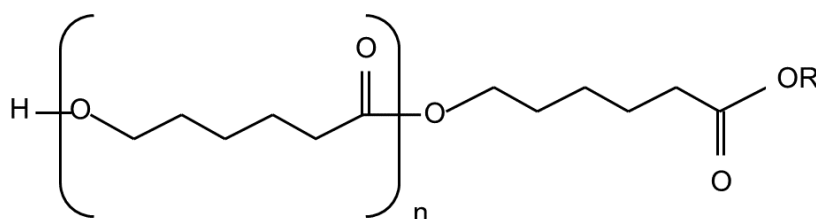


Figura 3. Estructura química de la policaprolactona [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

Según lo anterior, el proceso de degradación de este polímero ocurre por la hidrólisis de sus enlaces éster en condiciones fisiológicas, como en el cuerpo humano, aspecto que lo hace adecuado para aplicaciones como un biomaterial implantable a largo plazo. Además, debido a su baja temperatura de fusión, la PCL se procesa fácilmente mediante técnicas de fusión convencionales, permitiendo la encapsulación tanto de materiales más rígidos como partículas o fibras, para el mejoramiento de las propiedades mecánicas; o de fármacos para la liberación controlada y administración dirigida [32].

2.1.2 Polímeros naturales

Los polímeros naturales se derivan de recursos renovables como plantas, animales y microorganismos, por lo tanto, están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos materiales exhiben una gran diversidad de estructuras únicas, que al interactuar con funciones fisiológicas ofrecen una variedad de aplicaciones potenciales en el campo de

la ingeniería de tejidos debido a propiedades como el comportamiento pseudoplástico, la capacidad de gelificación, capacidad de unión al agua, y biodegradabilidad, entre otros. Además, poseen muchos grupos funcionales como grupos amino, carboxílico e hidroxilo, disponibles para procesos químicos como hidrólisis, oxidación, reducción, reacciones de reticulación, así mismo, para procesos enzimáticos y procesos de modificación con otras moléculas [33].

Los organismos vivos pueden sintetizar una gran variedad de polímeros que se pueden dividir en ocho clases principales de acuerdo con su estructura química: polisacáridos, proteínas y otras poliamidas, polioxoésteres, politioésteres, polianhídridos, poliisoprenoides, lignina y ácidos nucleicos. Una característica intrínseca de estos polímeros es su capacidad para degradarse por enzimas naturales, lo que puede indicar una mayor afinidad de estos materiales a ser metabolizados por los mecanismos fisiológicos. Por lo tanto, su uso en campos como la medicina regenerativa para el vendaje de heridas, es gracias a su biocompatibilidad y similitud con la matriz extracelular (MEC), las cuales favorecen las vías de reparación de tejidos dañados al inducir y estimular proceso como la cicatrización y hemostasia de heridas. Para este tipo de materiales se han utilizado diversos polímeros naturales como el colágeno y polisacáridos tales como alginato, almidón, celulosa y quitosano, siendo este último el elegido para el presente trabajo [34].

2.1.2.1 Quitosano

El quitosano es un polisacárido presente principalmente en las conchas de los crustáceos, como el camarón, gambas, el cangrejo y la langosta, en exoesqueletos de moluscos e insectos, así como en las paredes celulares de algunos hongos como *aspergillus* y *mucor*. Este polímero, es obtenido a través de la desacetilación termoquímica de la quitina en medio alcalino y las condiciones de obtención (temperatura, presión, concentración y tiempo) determinan su peso molecular y grado de desacetilación, cuando se tiene un porcentaje mayor o igual al 50% de desacetilación se le confiere el nombre de quitosano.

La estructura química del quitosano consta de unidades de D-glucosa enlazadas con grupos hidroxilos primarios y secundarios, y grupos amino alifáticos primarios en cada unidad de repetición, como se evidencia en la Figura 4. Estos grupos reactivos están sujetos a modificación química para alterar funciones biológicas distintas y propiedades mecánicas y fisicoquímicas. Especialmente, los grupos amino permiten que sea soluble en medios ácidos, y por su contenido de nitrógeno 5-8% hacen del material marcadamente básico y adecuado para reacciones típicas de aminas.

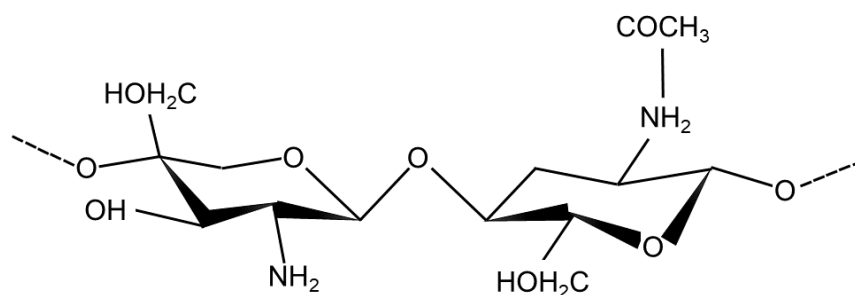


Figura 4. Estructura química del quitosano [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

Las principales ventajas del uso de quitosano radican en el hecho de que este polisacárido es abundante naturalmente y ha sido ampliamente estudiado, lo cual permite que tenga una amplia gama de usos debido a sus versátiles propiedades biológicas, químicas y físicas. La aplicación de quitosano incluye una variedad de áreas tales como aplicaciones farmacéuticas, producción de papel, tratamiento de aguas residuales, cosméticos, procesamiento de alimentos y agricultura [35]. Adicionalmente, sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y actividad antimicrobiana, hemostática, antioxidante, entre otras, hacen que este material sea de gran interés en campos como la ingeniería biomédica [36]. Por ejemplo, estudios realizados en cerdos indican que los apósitos fabricados de quitosano reducen la cantidad de sangre perdida mejorando la hemostasia. Esta propiedad del material es independiente de las cascadas de coagulación normales y se debe a su interacción con las membranas celulares de eritrocitos, lo que lo convierte en un adhesivo biológico [37] [38].

3. Técnicas para obtención de materiales hemostáticos

3.1 Método de liofilización

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar un solvente de una disolución mediante congelación y posterior sublimación a presión reducida. La liofilización es un proceso sencillo que permite el secado de productos orgánicos o inorgánicos sin alterar su composición cualitativa o cuantitativa. Este se lleva a cabo al aplicar vacío a una muestra a bajas temperaturas, evitando así la desnaturalización en el caso de las proteínas y cambios enzimáticos, biológicos y químicos [39].

La aplicación más común de la liofilización es la fabricación de parenterales, (medicamentos que se pueden suministrar vía intravenosa), que se administran después de un paso de reconstitución. Otras aplicaciones que hacen uso de las propiedades únicas del liofilizado son en el desarrollo de andamios tridimensionales altamente porosos para la ingeniería de tejidos, que si bien puede presentar buenas propiedades farmacéuticas presentan baja resistencia mecánica y estabilidad en la membrana [40].

3.2 Método de doble emulsión

El método de doble emulsión consiste en cuatro pasos consecutivos, en donde se empieza por una emulsificación primaria en la que una solución acuosa del agente activo es emulsionada dentro de una solución orgánica que contiene el polímero; una re-emulsificación, en la cual la primera emulsión es también emulsionada dentro de una segunda fase acuosa conteniendo un tensoactivo para obtener la doble emulsión; seguida de purificación de la formulación en el que el solvente orgánico es removido por evaporación o extracción induciendo la solidificación de las partículas; y por último, una separación y purificación de las macropartículas que son colectadas por centrifugación o filtración para finalmente secarlas [41].

Esta técnica ha sido enormemente utilizada para la encapsulación de agentes bioactivos hidrosolubles como moléculas iónicas, proteínas, péptidos, antígenos virales y bacterianos dentro de partículas poliméricas. Sin embargo, esta técnica no favorece la incorporación de moléculas hidrofílicas debido a que modifica las características del material compuesto [42].

3.3 Técnica de electrohilatura

El electrohilado o *electrospinning* se origina de la contracción de las palabras inglesas “*electrostatic spinning*” que significa hilado electrostático. Es un proceso electrohidrodinámico en el que la solución de polímero se hila mediante el empleo de un campo eléctrico de alto potencial para obtener fibras de tamaño micro y nanométrico. Esta técnica implica la rápida evaporación del solvente y la solidificación de gotas para formar fibras [43].

En la actualidad, esta técnica en comparación a otras que se utilizan para producir fibras y materiales con propiedades específicas se ha convertido en un método muy aplicado para la producción masiva de micro/nanofibras. Así mismo, es muy llamativo debido a que presenta varias ventajas como lo son la relación superficie-volumen, alta porosidad y buenas propiedades fisicoquímicas [44].

3.3.1 Principio de la técnica

Para generar estructuras fibrilares similar a la matriz extracelular nativa se requiere un equipo de *electrospinning*, el cual se componen de una fuente de alta tensión, una aguja metálica, una bomba de jeringa y un colector conectado a tierra (este puede ser placa fija o tambor giratorio), como se muestra en la Figura 5 [45]. Durante el proceso electrohidrodinámico, el líquido en la aguja es dispensado por una bomba de infusión de manera constante y controlable, de esta manera cuando se aplica un campo eléctrico externo, la gota que se va produciendo por el flujo del polímero se vuelve altamente electrificada, lo que hace que las cargas inducidas se distribuyan de manera uniforme en toda su superficie, ocasionado una perturbación en la gota en forma de un cono, lo cual se denomina cono de Taylor. Una vez que la fuerza de los campos supera el valor umbral logra romper la tensión superficial de la disolución del polímero, esto causa la expulsión de un chorro de líquido desde la boquilla. Este chorro electrificado posteriormente se somete a un proceso de estiramiento y batido, lo que lleva a la formación de un hilo largo y delgado [46] [47]. Para fabricar membranas fibrosas, las fibras hiladas producidas de manera continua pueden recogerse mediante un tambor giratorio o sobre una placa fija para obtener una morfología altamente alineada y homogénea.

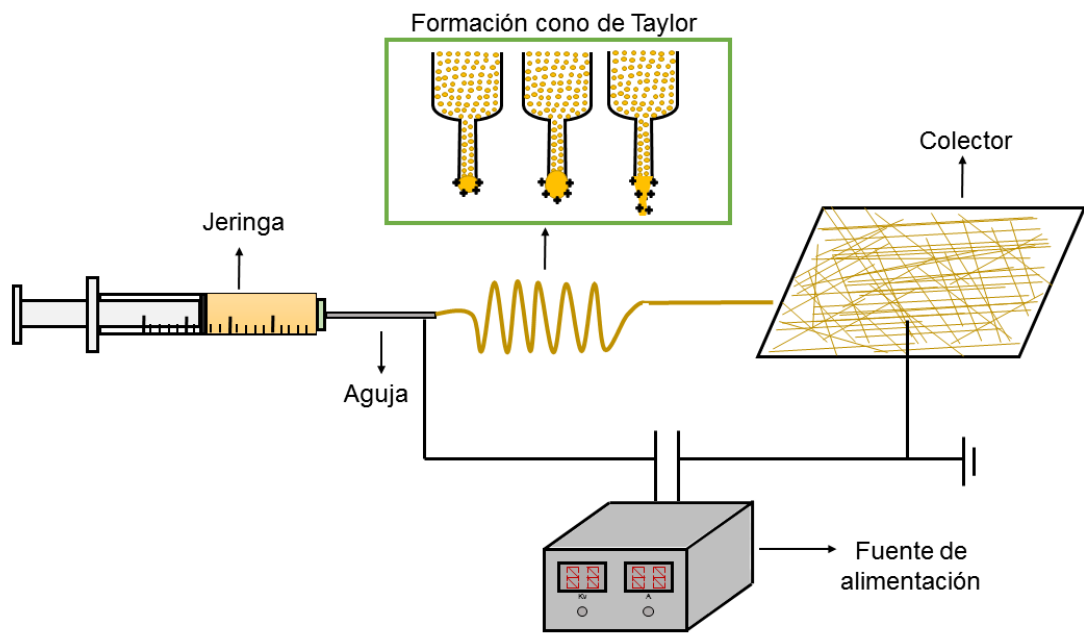


Figura 5. Diagrama esquemático de la técnica de electrohilatura y cada una de las variables que se involucran [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

Es importante resaltar que a pesar de que es una técnica sencilla depende de parámetros que influyen directamente sobre las propiedades y las dimensiones de las fibras obtenidas. Estos parámetros pueden estar clasificados en tres grupos, uno de ellos son las propiedades de la solución polimérica como concentración de la disolución, peso molecular, tensión superficial y conductividad de la solución; también se debe tener en cuenta las variables del equipo como voltaje, flujo de salida y distancia entre aguja y colector; así mismo y no menos importante los parámetros ambientales como humedad relativa y temperatura de la disolución [45].

4. Técnicas de caracterización del material hemostático

4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica de análisis morfológico, estructural y composicional, la cual se ha usado en diferentes estudios de materiales semiconductores, conductores, nanopartículas, catálisis heterogénea, películas delgadas, entre otros. Dadas sus posibilidades de resolución, magnificación y versatilidad, este tipo de microscopía permite que sea aplicada a diferentes tipos de naturaleza de muestras [48].

4.2 Pruebas mecánicas

Las pruebas mecánicas son pruebas destructivas que se realizan en una máquina universal y en las que se evalúa la relación entre esfuerzos y la resistencia del material a la deformación y fractura. Estos ensayos son utilizados para determinar características de los materiales, como lo es dureza, deformación elástica, tensión, módulo de Young y resistencia a la fatiga. Este tipo de pruebas permite estudiar una variedad de materiales como polímeros, cerámicos, materiales compuestos, productos farmacéuticos, entre otros. Así mismo, cabe destacar que las características mecánicas

de cada material dependen de la microarquitectura de este, el tipo de estructura cristalina y la composición química [49].

4.3 Espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica que permite adquirir espectros de banda ancha de infrarrojo cercano a infrarrojo lejano. A diferencia de un instrumento dispersivo, es decir, un monocromador de rejilla o un espectrógrafo, los espectrómetros FTIR recogen todas las longitudes de onda simultáneamente [50]. El FTIR se emplea comúnmente para identificar la estructura y conformación de propiedades de superficie bioconjugadas, a partir del reconocimiento de las bandas espectrales características para revelar la conjugación de biomoléculas y los estados conformacionales, empleadas en la síntesis de nanomateriales [51].

4.4 Ensayo de permeabilidad

El ensayo de permeabilidad permite adquirir información sobre la capacidad de un medio poroso a ser atravesado por un fluido. El flujo de líquidos en medios porosos es un tema ampliamente investigado debido a que este fenómeno tiene una gran aplicación en la industria y a nivel científico. Es importante mencionar que las características que se pueden medir son el grado de inmersión, el grado de resistencia a la presión hidrostática y la capacidad de permeabilidad del agua [52].

4.5 Ensayo hemolítico

El ensayo hemolítico determina la capacidad de un material compuesto de provocar hemólisis, utilizando como fluido de trabajo sangre, el cual se mide la absorbancia del material al interactuar con el fluido. Según la norma ISO 10993-4, un porcentaje de hemólisis inferior al 5% es considerado no-hemolítico, teniendo en cuenta el valor de 100% para la cantidad total de hemoglobina presente en los eritrocitos del fluido de trabajo [53]. Los ensayos de hemólisis determinan el índice de hemocompatibilidad para biomateriales, ya que esta se define como el grado de lisis de los eritrocitos y por ende la liberación de hemoglobina [54].

ESTADO DE ARTE

A lo largo de los últimos años, se han venido desarrollando diferentes investigaciones en el entorno de la terapéutica para el control de las hemorragias, esto con el fin de obtener un material hemostático capaz de controlar de manera efectiva cualquier tipo de hemorragia externa.

Van der Shueren y colaboradores en 2012, plantearon un sistema de solventes compuesto de ácido acético/ácido fórmico para evaluar el efecto que tienen diferentes concentraciones de estos en las propiedades mecánicas y morfológicas de matrices electrohiladas compuestas de PCL y quitosano. Para ello, evaluaron la viscosidad de las soluciones, la conductividad y la morfología de los andamios. De los resultados obtenidos, encontraron que las concentraciones de los disolventes no influyó en la viscosidad de las soluciones, esto debido a la similitud de las viscosidades entre el ácido acético (AA) y el ácido fórmico (AF), así mismo se observó que la conductividad se alteró dependiendo de la relación de solvente, vislumbrado una relación directa entre la conductividad y la concentración de ácido fórmico, de tal manera, que a medida que disminuyó la concentración de ácido fórmico disminuyó la conductividad. Así mismo, se obtuvo estructuras electrohiladas de PCL y quitosano. De otro lado, indicaron que la viscosidad de la solución del quitosano es un factor importante al momento de electrohilar, y que al mezclarlo con de PCL aumenta significativamente la conductividad de la solución debido a su comportamiento policatiónico. En conclusión, los investigadores afirmaron que el sistema de disolventes AA / FA, podría ser un buen candidato para la disolución de PCL y quitosano gracias a las características que proporcionan a la fibra como continuidad, poca rugosidad y diámetro pequeño, así como la capacidad de formar un entretramado con una gran cantidad de fibras [55].

Nourmohammadi y colaboradores en 2015, prepararon andamios compuestos por nanofibras de policaprolactona, almidón oxidado y quitosano para posibles aplicaciones en regeneración ósea. Para evaluar la eficacia en esta aplicación caracterizaron la morfología de la estructura, el hinchamiento de la membrana, la capacidad de compresión del andamio y la citocompatibilidad mediante ensayo MTT evaluado en un modelo *in vitro* de células osteoblastos MG63. De los resultados obtenidos, los investigadores observaron que el porcentaje de porosidad y tamaño de poro aumentó con el aumento del contenido de almidón, esto lo atribuyeron a la formación de conjugación de imina, entre el aldehído en el almidón oxidado y los grupos amino del quitosano. En cuanto a la absorción de agua, se observó que la más baja se produjo en el andamio que contenía 3 % de almidón, pero mostró que al aumentar la cantidad de almidón aumentaba la absorción, esto gracias al aumento del tamaño de poro y a la presencia de más grupos hidroxilos. Así mismo, dentro de sus resultados se evidenció que el módulo de compresión más alto se observó para la muestra que contenía 3% de almidón y que el módulo disminuyó a medida que aumentaba el contenido de almidón, esto debido al aumento en el tamaño de los poros y el porcentaje de porosidad, lo que causa puntos de concentración de fuerzas y por lo tanto fallas al momento de aplicar fuerzas. Por otro lado, los investigadores observaron que todas las muestras tienen una viabilidad celular superior al 90 % y que la viabilidad celular aumentó a medida que aumentaba la cantidad de almidón oxidado, esto lo atribuyeron a la formación de estructuras reticuladas al aumentar las cantidades de almidón oxidado, lo que condujo

a la liberación de agentes menos tóxicos en el medio de cultivo y, en consecuencia, a una mayor viabilidad celular [56].

Chan y colaboradores en 2016, desarrollaron una gasa de quitosano impregnada con un polímero sintético formado por múltiples péptidos unidos a fibrina (PolySTAT), con el fin de generar gasas con una eficacia hemostática mejorada para aplicaciones en el control de hemorragias externas. Para evaluar el rendimiento del material, los investigadores realizaron ensayos de porosimetría de intrusión de mercurio, FESEM y ángulo de contacto para determinar la porosidad, morfología y absorción de las gasas, de igual forma, realizaron ensayos de coagulación in vitro y de hemostasia en un modelo de lesión de la arteria femoral de ratón, para posteriormente comparar el comportamiento del material con gasas de ambos polímeros por separados y con una gasa comercial de quitosano denominada Celox® Rapid. Los resultados no mostraron diferencias apreciables en el tamaño de la fibra, la morfología y el diámetro de los poros entre las gasas, sin embargo, en las pruebas de coagulación PolySTAT/Quitosano demostró una absorción de sangre más rápida en comparación con Celox® Rapid, así mismo, en el modelo de lesión de la arteria femoral, la gasa de PolySTAT/Quitosano redujo la pérdida de sangre y mejoró la tasa de supervivencia en comparación con los controles no hemostáticos y Celox® Rapid. Además, los animales tratados con PolySTAT/Quitosano necesitaron menos infusión de solución salina para restablecer y mantener la presión arterial por encima de la presión arterial deseada (60 mmHg) mientras que las demás gasas requerían más solución salina debido a la hemorragia continua de la herida. Estos resultados se deben principalmente al mecanismo hemostático de PolySTAT/Quitosano que consiste en estabilizar los agregados de eritrocitos por medio del quitosano y de las reticulaciones de fibrina [57].

De igual manera, Parque y colaboradores en 2017, desarrollaron andamios electrohilados compuesto de PCL y carbonato de calcio, recubiertos con β -quitosano mediante el método de rociado ultrasónico para posibles mejoras en características hemostáticas. Para verificar dichas características, los investigadores visualizaron la morfología de los andamios y evaluaron la coagulación de la sangre de cerdo y de ratón. A partir de los resultados, observaron que los andamios compuestos de PCL - carbonato de calcio presentan una superficie mayor que los andamios de PCL puro, esto gracias a que el carbonato de calcio posee un efecto en el aumento del área de superficial. Así mismo, los andamios de PCL- carbonato de calcio tienen un diámetro de fibra y tamaño de poro más pequeño comparado con los andamios de PCL puro, comportamiento que atribuyeron al proceso de fabricación de la fibra. De otro lado, en las micrografías identificaron que la morfología de las fibras fue continua, dispersa y abundante. Además, se encontró que el proceso de coagulación, aunque fue diferente debido a la naturaleza de la especie animal, se evidenció que los andamios compuestos por PCL recubiertos de β -quitosano y los andamios de PCL - carbonato de calcio recubiertos o no por β -quitosano exhibieron absorbancias más bajas que los andamios de PCL puro. Además, notaron que los andamios de PCL- carbonato de calcio exhibió una tasa de coagulación más alta que el andamio de PCL puro. En conclusión, los investigadores consideraron que los andamios de PCL- carbonato de calcio rociados con β -quitosano podrían emplearse para diversas aplicaciones médicas donde se requiere una rápida coagulación de la sangre [58].

En base a lo anterior, Poornima y colaboradores en 2017, desarrollaron apósitos de quitosano y policaprolactona mediante electrospinning coaxial para la administración

eficiente y simultánea de ácido ferúlico y resveratrol, esto para posible aplicación en la cicatrización de heridas. Los investigadores caracterizaron la morfología de los andamios mediante microscopía electrónica de barrido, así mismo, realizaron ensayo antioxidante a través del método de eliminación de radicales de 2,2-difenil-picrilhidrazilo, citocompatibilidad mediante ensayo MTT utilizando queratinocitos epidérmicos humanos inmortalizados y evaluación de la cicatrización de heridas mediante ensayo de herida en un modelo *in vitro* y estudios de curación de heridas en ratas Wistar albinas hembras. En cuanto a los resultados, los investigadores observaron que las morfologías de los andamios presentaban fibras continuas, sin perlas, lisas y orientadas al azar. Además, se encontró que el diámetro promedio de fibra del andamio de quitosano-policaprolactona estaba en el rango de 200 ± 50 nm, mientras que el andamio de quitosano-policaprolactona-fármacos tuvo un diámetro promedio de 240 ± 50 nm. Así mismo, evidenciaron que la herida tratada con PCL -quitosano mostró casi el mismo patrón de curación que la de los grupos tratados únicamente con solución salina, mientras, que el grupo de ratas tratado con PCL - quitosano-fármacos mostró una tasa de cierre de la herida más rápida en comparación con la de los grupos de control. En conclusión, los investigadores afirman que el andamio de liberación de molécula dual tiene un potencial prometedor para mejorar la curación de heridas agudas gracias a la capacidad de liberar resveratrol y ácido ferúlico en un patrón sostenido [59].

De la misma manera, Urbanek y colaboradores en 2017, estudiaron el efecto de la polaridad aplicada en la aguja sobre la capacidad de hilado, estructura, propiedades mecánicas y morfológicas de las membranas obtenidas de policaprolactona-quitosano. Para ello, evaluaron la morfología de las matrices mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica, la humectabilidad mediante ángulo de contacto y el módulo de Young mediante prueba de tracción estática. De los resultados, los investigadores evidenciaron que las mezclas de PCL - quitosano con 25% p/p de quitosano exhiben una morfología típica de las fibras de quitosano puras debido a los altos cationes de quitosano contenido. Las muestras de 25 % de PCL - quitosano formadas con carga positiva mostraron diámetros promedio ligeramente más pequeños en comparación de las fibras obtenidas con la carga negativa. Así mismo, las imágenes del microscopio de fuerza atómica evidenciaron que las fibras PCL - quitosano del 25 % tanto de carga positiva como negativa presentaron una morfología similar, además de no presentar separación de fase en su estructura. Por otro lado, la prueba de ángulo de contacto evidenció que las muestras de 25% de PCL - quitosano presentan diferencias significativas en la polaridad, donde la carga negativa fueron más hidrófobas en comparación con las de carga positiva. Así mismo, en cuanto al módulo de Young, evidenciaron que este aumenta directamente con el contenido de quitosano en las membranas obtenidas. En conclusión, los investigadores afirman que la polaridad de la carga puede afectar no solo al proceso de electrospinning, sino que también puede adaptar la morfología de las fibras de PCL- quitosano, así como algunas de sus propiedades, como la humectabilidad y las propiedades mecánicas [60].

Fadaie y colaboradores en 2018, desarrollaron un andamio fibroso electrohilado, basado en una matriz de PCL y nanofibrillas de quitosano, para determinar sus efectos en la morfología, propiedades físico-mecánicas y viabilidad celular. De los resultados obtenidos encontraron que al emplear concentraciones de nanofibrillas de quitosano entre el 5 y 10 % modifica la viscosidad, conductividad y mejora el proceso de electrohilado de los andamios, en comparación de aquellas soluciones preparadas con PCL puro. Adicionalmente, los investigadores hallaron que al incorporar nanofibrillas de

quitosano a la matriz de PCL mejoró notablemente las propiedades físico-mecánicas como el módulo de Young, el cual fue 5.4 veces más alto que la muestra de PCL pura, debido al efecto reforzado de las nanofibrillas de quitosano incrustadas y orientadas a lo largo del eje de la fibra y las interacciones favorables entre las nanofibrillas de quitosano y las moléculas de PCL. Por último, los andamios con un contenido de nanofibrillas de quitosano del 5 % o más mostraron una viabilidad significativamente mayor en comparación con los andamios de PCL puro, ya que en dichas muestras se presentan un diámetro de fibra menor, morfologías uniformes, ausencia de defectos y mayor porosidad. En conclusión, los investigadores afirman que, debido a la buena interacción de las nanofibrillas del quitosano con el PCL, este se convierte en un buen material para mejorar los andamios de PCL puro [61].

HIPÓTESIS

La adición de quitosano de bajo o mediano peso molecular a las soluciones de policaprolactona, la modificación de los parámetros de electrohilatura y la interacción química de quitosano con PCL, favorecen la disminución del diámetro de fibra y la microarquitectura del material compuesto en comparación con las membranas del polímero sintético puro. Además, dichos parámetros influyen en las propiedades fisicoquímicas, debido a que el quitosano aumenta la hidrofiliidad de las membranas compuesta debido a la presencia de grupos -OH en su estructura. Así mismo, se espera que las propiedades mecánicas aumenten debido a la interacción de ambos polímeros y a la formación de una red fibrilar a escala nanométrica, la cual favorece el aumento del área superficial de contacto, la interacción electrostática causada por la composición policatiónica del quitosano y la carga negativa de los componentes de la sangre, lo cual visualiza a este tipo de membranas compuestas como estructuras que podrían favorecer una rápida activación de la cascada de coagulación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una membrana electrohilada hemostática compuesta por policaprolactona y quitosano para posibles aplicaciones en el control de hemorragias en capas externas de la piel.

Objetivos específicos

1. Desarrollar membranas electrohiladas considerando el efecto del peso molecular del quitosano en la microarquitectura de un material biocompuesto.
2. Determinar las características fisicoquímicas de membranas compuestas electrohiladas.
3. Evaluar el comportamiento hemostático y funcional in vitro del biomaterial compuesto.

CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Polímeros

- Policaprolactona (PCL), suministrada por Sigma Aldrich con un peso molecular de 80000 Da.
- Quitosano de bajo peso molecular (QLMW), suministrado por Sigma Aldrich con un grado de desacetilación entre 75% - 85% y un peso molecular entre 50000 – 190000 Da.
- Quitosano de mediano peso molecular (QMMW) suministrado por sigma Aldrich con un grado de desacetilación entre 75% - 85% con un peso molecular entre 190000 – 310000 Da.

2. Solventes

- Ácido acético glacial, suministrado por Sigma Aldrich con un porcentaje de pureza del 99,5%, utilizado para el sistema de disolventes de la policaprolactona y el quitosano.
- Ácido fórmico, suministrado por Sigma Aldrich con un porcentaje de pureza del 99%, utilizado para el sistema de disolventes de la policaprolactona y el quitosano.

3. Otros reactivos o insumos

- Cloruro de sodio, suministrado por Sigma Aldrich con un porcentaje de pureza de 99%, utilizado para la preparación de la solución utilizada en el ensayo de degradación.
- Hidróxido de sodio, suministrado por Sigma Aldrich con un porcentaje de pureza de 99%, utilizado para cambio de pH de las soluciones empleadas para el ensayo de degradación.
- Tubos BD Vacutainer® con EDTA K3

PROCESO EXPERIMENTAL

1. *Desarrollo de membranas electrohiladas considerando el efecto del peso molecular del quitosano en la estructura de un material biocompuesto.*

a. *Preparación de soluciones de trabajo*

Se realizará soluciones de policaprolactona (PCL) de 12% p/v y quitosano de bajo (QLMW) y mediano peso molecular (QMMW) a 2% p/v empleando como solventes ácido fórmico y ácido acético en una relación 3:2. Para esto se preparó las soluciones de policaprolactona y quitosano de manera separada a una agitación de 130 rpm durante 24 horas; luego se mezclaron a una velocidad de agitación de 130 rpm, a temperatura ambiente durante 24 horas (ver Figura 6).

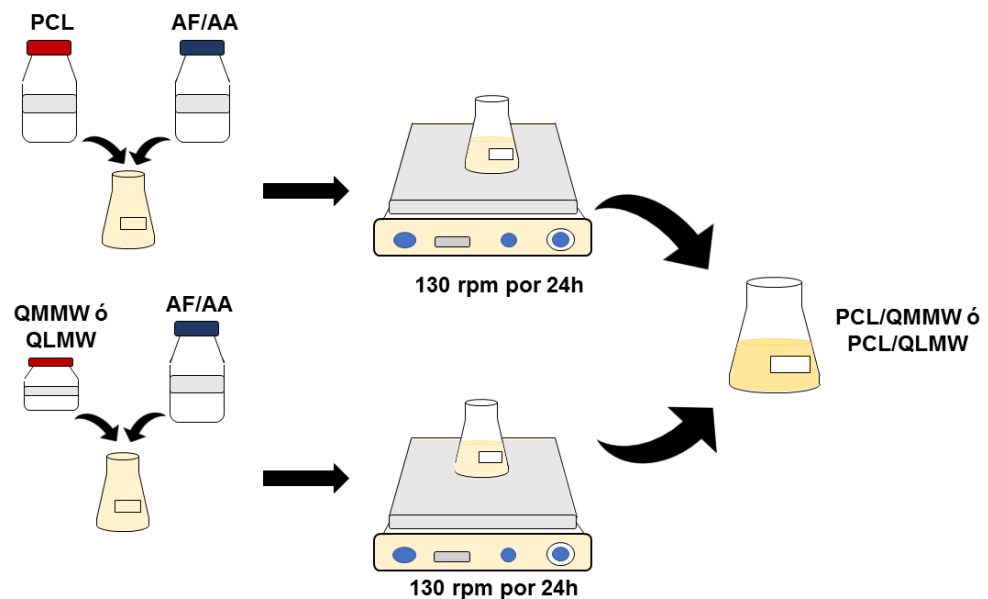


Figura 6. Esquema de preparación de soluciones de PCL y quitosano de bajo y medio peso molecular para la obtención de la solución de electrohilatura. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

b. *Diseño experimental*

Se realizó un diseño experimental factorial multinivel. Para el primer diseño experimental, se dejó fijo los parámetros de concentración de PCL/QLMW a una relación 7:2 v/v, humedad relativa al 30 % y flujo de 0.05 ml / h y se varió la distancia de la aguja al colector entre 10 y 15 cm y el voltaje entre 10, 15, 20 kV (ver Tabla 1). Así mismo, para la solución de PCL/QMMW se dejaron fijos los mismos parámetros del QLMW y se varió la distancia aguja-colector entre 10, 15, y 20 cm y el voltaje entre 10, 15, y 20 kV, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Resumen diseño de experimento No.1 para las muestras de PCL/QLMW.

Parámetros fijos		
Concentración (%)	PCL	2
	QLMW	12
Relación PCL/QLMW (v / v)	7:2	
Flujo (ml / h)	0.05	
Humedad (%)	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Diámetro de fibra (nm)
10	10	
	15	
	20	
15	10	
	15	
	20	

Tabla 2. Resumen diseño de experimento No.1 para las muestras PCL/QMMW.

Parámetros fijos		
<i>Concentración</i>	PCL	2
	QMMW	12
<i>Relación PCL/QMMW (v / v)</i>		7:2
<i>Flujo (ml / h)</i>		0.05
<i>Humedad (%)</i>		30
Parámetros variables		Parámetro respuesta
<i>Voltaje (kV)</i>	<i>Distancia (cm)</i>	<i>Diámetro de fibra</i>
10	10	
	15	
	20	
15	10	
	15	
	20	

Basado en los resultados obtenidos del primero diseño experimental, relacionados con diámetro de filamento, continuidad y homogeneidad en las fibras, poca presencia de defectos y recolección de muestra se definió un segundo diseño de experimental para las muestras PCL/QLMW y PCL/QMMW que busca mejorar la apariencia de las membranas obtenidas. Por lo cual, para el caso de la solución de PCL/QLMW se cambió el flujo a 0.10 ml / h, una la distancia aguja-colector entre 10, 15, 20 cm y un voltaje de 15 kV, mientras que, para la solución de PCL/QMMW se cambió el flujo 0.5 ml / h, una distancia aguja-colector entre 15, 18 y 20 cm y un voltaje entre 20, 22 kV (ver Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 3. Resumen de diseño de experimento No.2 para muestras de PCL/QLMW.

Parámetros fijos		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QLMW	12
<i>Relación PCL/QLMW (v / v)</i>		7:2
<i>Flujo (ml / h)</i>		0.30
<i>Humedad (%)</i>		30
Parámetros variables		Parámetro respuesta
<i>Distancia (cm)</i>	<i>Voltaje (kV)</i>	<i>Diámetro de fibra</i>
15	10	
	11	

Tabla 4. Resumen diseño de experimentos No. 2 para muestras de PCL/QMMW.

Parámetros fijos		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QMMW	12
<i>Relación PCL/QMMW (v / v)</i>	7:3	
<i>Flujo (ml / h)</i>	0.5	
<i>Humedad (%)</i>	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
<i>Voltaje (Kv)</i>	<i>Distancia (cm)</i>	<i>Diámetro de fibra</i>
20	15	
	18	
	20	
22	15	
	18	
	20	

Según los resultados obtenidos en el diseño de experimental dos, en el caso de la muestra PCL/QLMW se procedió a realizar un tercer diseño de experimental donde se varía el flujo a 0.3 ml / h, el voltaje a 11 kV y la distancia entre 10, 15 y 20 cm, lo cual permitió determinar disminución en los defectos de la muestra y aumento en la recolección del material (ver Tabla 5). Así mismo, en la Tabla 6 para las muestras PCL/QMMW se evidencia los parámetros que se dejaron fijos (voltaje, distancia y flujo) y se varió la relación PCL/QMMW, con el fin de obtener membranas sin defectos y con mayor cantidad de quitosano en la estructura final.

Tabla 5. Resumen diseño de experimentos No.3 para muestras de PCL/QLMW.

Parámetros fijos		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QLMW	12
<i>Relación PCL/QLMW (v / v)</i>	7:2	
<i>Flujo (ml / h)</i>	0.30	
<i>Humedad (%)</i>	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
<i>Voltaje (kV)</i>	<i>Distancia (cm)</i>	<i>Diámetro de fibra</i>
11	10	
	20	

Tabla 6. Resumen diseño de experimentos No.3 para muestras de PCL/QMMW.

Parámetros fijos		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QMMW	12

<i>Voltaje (kV)</i>	22
<i>Flujo (ml / h)</i>	0.30
<i>Distancia (cm)</i>	15
<i>Humedad (%)</i>	30
Parámetros variables	Parámetro respuesta
<i>Relación PCL/QMMW (v / v)</i>	<i>Diámetro de fibra</i>
4:6	
5:5	
6:4	

Con el fin de aumentar la relación de quitosano presente en las muestras de PCL/QLMW, se planteó un cuarto diseño de experimental donde se tuvo como parámetros de inclusión aquellos que permitieron homogeneidad, continuidad y disminución de defectos en las fibras (ver Tabla 7). De igual manera, para las muestras PCL/QMMW se dejó fija la relación de ambos polímeros en 4:6, respectivamente y se varió la distancia aguja-colector y el flujo con el fin de obtener diferentes porosidades para la obtención de una membrana electrohilada compuesta de 3 capas (ver Tabla 8).

Tabla 7. Resumen diseño de experimentos No.4 para muestras de PCL/QLMW

Parámetros fijos		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QLMW	12
<i>Voltaje (kV)</i>	11	
<i>Flujo (ml / h)</i>	0.30	
<i>Humedad (%)</i>	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
<i>Distancia (cm)</i>	<i>Relación PCL/QLMW (v / v)</i>	<i>Diámetro de fibra</i>
20	4:6	
	5:5	
	6:4	
	7:3	

Tabla 8. Resumen diseño de experimento No.4 para muestras de PCL/QMMW

Parámetros fijos		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QMMW	12
<i>Voltaje (kV)</i>	22	
<i>Relación PCL/QMMW (v / v)</i>	4:6	

<i>Humedad (%)</i>		30
Parámetros variables		Parámetro respuesta
<i>Flujo (ml / h)</i>	<i>Distancia (cm)</i>	<i>Diámetro de fibra</i>
0.3	18	
	20	
	25	
0.5	18	
	20	
	25	

Finalmente, para completar el diseño de experimentos de las muestras de PCL/QLMW, se dejó fija la relación entre ambos polímeros en 4:6, respectivamente y se varió la distancia aguja-colector y el flujo (ver Tabla 9). Posteriormente, se escogió los parámetros finales de electrohilatura de cada tipo de muestra (PCL/QLMW y PCL/QMMW) teniendo en cuenta las siguientes características una morfología sin defectos y fibras a escala nanométrica, luego se precedió a electrohilar por un periodo de 10 horas (ver Tabla 10).

Tabla 9. Resumen diseño de experimentos No.5 para muestras de PCL/QLMW.

Parámetros fijos		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QLMW	12
<i>Voltaje (kV)</i>	11	
<i>Relación PCL/QMMW (v / v)</i>	4:6	
<i>Humedad (%)</i>	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
<i>Flujo (m / h)</i>	<i>Distancia (cm)</i>	<i>Diámetro de fibra</i>
0.3	18	
	25	
0.5	18	
	20	
	25	

Tabla 10. Resumen de los parámetros de electrohilatura para las muestras PCL/QMMW y PCL/QLMW.

Parámetros constantes		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QMMW o QLMW	12
<i>Relación PCL/QMMW o PCL/QLMW (v / v)</i>	4:6	
<i>Humedad (%)</i>	30	

Parámetros variables			Parámetro respuesta					
<i>Membrana</i>	<i>PCL QMMW</i>	<i>PCL QLMW</i>	<i>Porosidad (%)</i>		<i>Tamaño de poro (nm)</i>		<i>Pdl</i>	
Capa A	Porosidad Alta		<i>PCL QMMW</i>	<i>PCL QLMW</i>	<i>PCL QMMW</i>	<i>PCL QLMW</i>	<i>PCL QMMW</i>	<i>PCL QLMW</i>
<i>Voltaje (kV)</i>	22	11						
<i>Distancia (cm)</i>	25	25						
<i>Flujo (m / h)</i>	0.3	0.3						
Capa B	Porosidad Baja		<i>PCL QMMW</i>	<i>PCL QLMW</i>	<i>PCL QMMW</i>	<i>PCL QLMW</i>	<i>PCL QMMW</i>	<i>PCL QLMW</i>
<i>Voltaje (kV)</i>	22	11						
<i>Distancia (cm)</i>	20	20						
<i>Flujo (m / h)</i>	0.3	0.5						

Donde el *Pdl* es el índice de polidispersidad el cual se define como la desviación estándar (σ) de la distribución del diámetro de partícula dividida por el diámetro medio de partícula (α) (Ver Ecuación 1).

$$Pdl = \left(\frac{\sigma}{\alpha}\right)^2 \quad \text{Ecuación 1}$$

Pdl se usa para estimar la uniformidad promedio de las fibras en la membrana, y los valores de *Pdl* cercanos a 1 corresponden a una mayor distribución de tamaño y muestras heterogéneas. De esta forma un valor de *Pdl* inferior a 0.1 es considerado como una muestra monodispersa [62].

c. Condiciones de electrohilatura

Las mezclas de PCL/Quitosano se depositaron en una jeringa de vidrio de 5 ml con capilar un de acero inoxidable de 21G, y posteriormente, fueron llevadas a electrohilar. Las condiciones de electrohilatura dependieron de cada de los diseños experimentales mostrados en el apartado b.

d. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica en cada uno de los diseños experimentales se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido Jeol NeoScope JCM-600 plus, las muestras fueron preparadas tomando una pequeña porción y fueron dispuestas en un portamuestra para ser recubierto con oro por medio de pulverización catiónica. Las muestras fueron observadas a 10000x, 5000x y 2000x aumentos. Además, las

membranas obtenidas bajo los parámetros presentados en la Tabla 10 fueron caracterizados en un microscopio Nova NanoSEM 200 y observadas a 100000x, 50000x, 20000x, 10000x, 5000x y 2000x aumentos. Las micrografías obtenidas fueron analizadas mediante el software ImageJ® para determinar el diámetro de fibra y la porosidad aparente.

2. Determinación de las características fisicoquímicas de las membranas compuestas electrohiladas desarrolladas.

a. Espectroscopia por Transformada de Fourier

El análisis químico se realizó por medio de espectrofotometría por transformada de Fourier con un módulo de reflexión total atenuada (FTIR-ATR) empleando un espectrofotómetro Nicolet iS50- FTIR marca Thermo Scientific y los espectros fueron obtenidos por la acumulación de 32 escaneos en un rango longitud de onda entre 400 - 4000cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹. Las muestras caracterizadas correspondieron a las membranas de PCL, PCL/QLMW, PCL/QMMW y las muestras resultantes del ensayo de pérdida de masa en un tiempo de interacción de 4 h.

b. Pruebas mecánicas

Se realizó pruebas de tensión mecánica estática uniaxial en un plano a las membranas de PCL/QLMW y PCL/QMMW utilizando un analizador mecánico dinámico (DMA Q800, TA Instruments, New Castle, DE). Dichas pruebas se realizaron por triplicado a membranas con dimensiones de 5,3 mm de ancho, 10 mm de largo y 0.03 mm de espesor. El ancho de la muestra se midió empleando un calibrador electrónico estándar (Fowler High Precision, Inc., Newton, MA), la longitud entre las pinzas fue determinada por el DMA y el grosor se obtuvo utilizando un micrómetro digital estándar (Mitutoyo Co, Japón). Todas las pruebas de tensión se llevaron a cabo a 28°C en modo de fuerza controlada con una precarga de 0.05N y una fuerza cargada en rampas de 0.2N/min para las membranas de PCL (control) y para las muestras PCL/QLMW y PCL/QMMW se empleó una precarga de 0.001N y una fuerza cargada en rampas de 0.1N/min.

c. Ángulo de contacto

Se empleó un goniómetro modelo Oca 15plus con una línea de voltaje de 12 V ajustado con un sistema óptico. Para determinar el ángulo de contacto de las membranas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW se depositó una gota de agua y de plasma sanguíneo de manera individual y se tomaron por triplicado imágenes durante 2 min, de los cuales se eligieron 3 tiempos para medir los ángulos.

d. Pérdida de masa

Este ensayo se realizó con tres tipos diferentes de soluciones: solución salina a pH 5, agua desionizada y solución salina a un pH 10 (medio ácido, neutro y básico). Las mediciones fueron realizadas a periodos de incubación de 4, 6 y 24 horas por duplicado. El ensayo se realizó a partir de muestras cortadas en cuadrados de 1,5 cm x 1,5 cm de las membranas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW, luego se midió el espesor y se pesaron; posteriormente, se les agregó 1 ml de la solución correspondiente al ensayo (medio ácido, neutro y básico). Después del tiempo de interacción, se pesó las membranas en húmedo y secas (ver Figura 7).

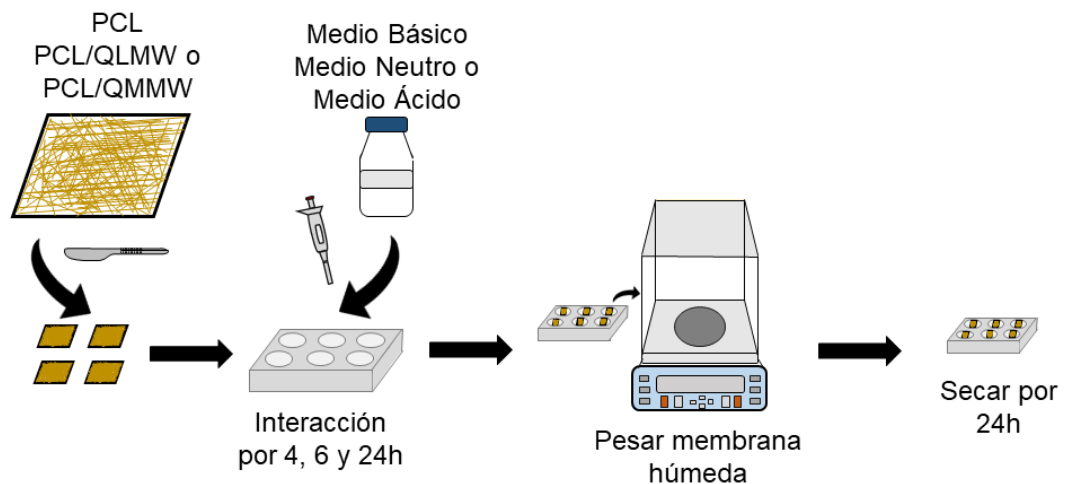


Figura 7. Esquema ensayo de pérdida de masa. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

Para determinar el porcentaje de pérdida de masa se empleó la Ecuación 2. Donde $Peso_{seco\ 1}$ corresponde al peso seco inicial de las muestras PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW, respectivamente, y $Peso_{seco\ 2}$ es el peso final húmedo de las muestras PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW.

$$\%PerMasa = \frac{Peso_{seco\ 1} - Peso_{seco\ 2}}{Peso_{seco\ 1}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 2}$$

3. Evaluación del comportamiento hemostático y funcional in vitro del biomaterial compuesto.

a. Recolección de fluido sanguíneo y preparación de soluciones

Para esta prueba se obtuvo sangre bovina obtenida de la Central Ganadera S.A, la cual se dispuso en tubos de ensayo con anticoagulante para su conservación. Posterior a su recolección, se preparó la solución madre para el ensayo de hemólisis en una relación de sangre y solución salina (NaCl) a 4:5, el control positivo (CP) en una relación sangre y H₂O a 4:5 y el control negativo (CN) en una relación sangre y solución salina a 1:8, Para las lecturas de absorbancia del control positivo y negativo se incubó por 60 min a 37 °C y se pasó a centrifugar a 2500 rpm por 5min.

b. Ensayo hemolítico

Para realizar este ensayo, las muestras de PCL/QLMW y PCL/QMMW se esterilizaron en inmersión de etanol, luego se lavaron con H₂O y se irradiaron con UV durante 30 min. Posterior a esto, se realizó un preacondicionamiento de las membranas por triplicado, las cuales tenían unas dimensiones de 1,5 x 1,5 cm y se depositaron en tubos con solución salina por 30 min a 37 °C. Luego se adicionó la solución madre y se incubó por 60 min a 37 °C. Después del tiempo de incubación se retiró la membrana y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Por último, la lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Lambda Bio 10 a una longitud de onda de 540 y 545 nm (ver Figura 8). Para determinar el porcentaje de hemólisis se empleó la Ecuación 3.

$$\%Hemólisis = \frac{A_s - A_N}{A_p - A_N} \times 100\%$$

Ecuación 3

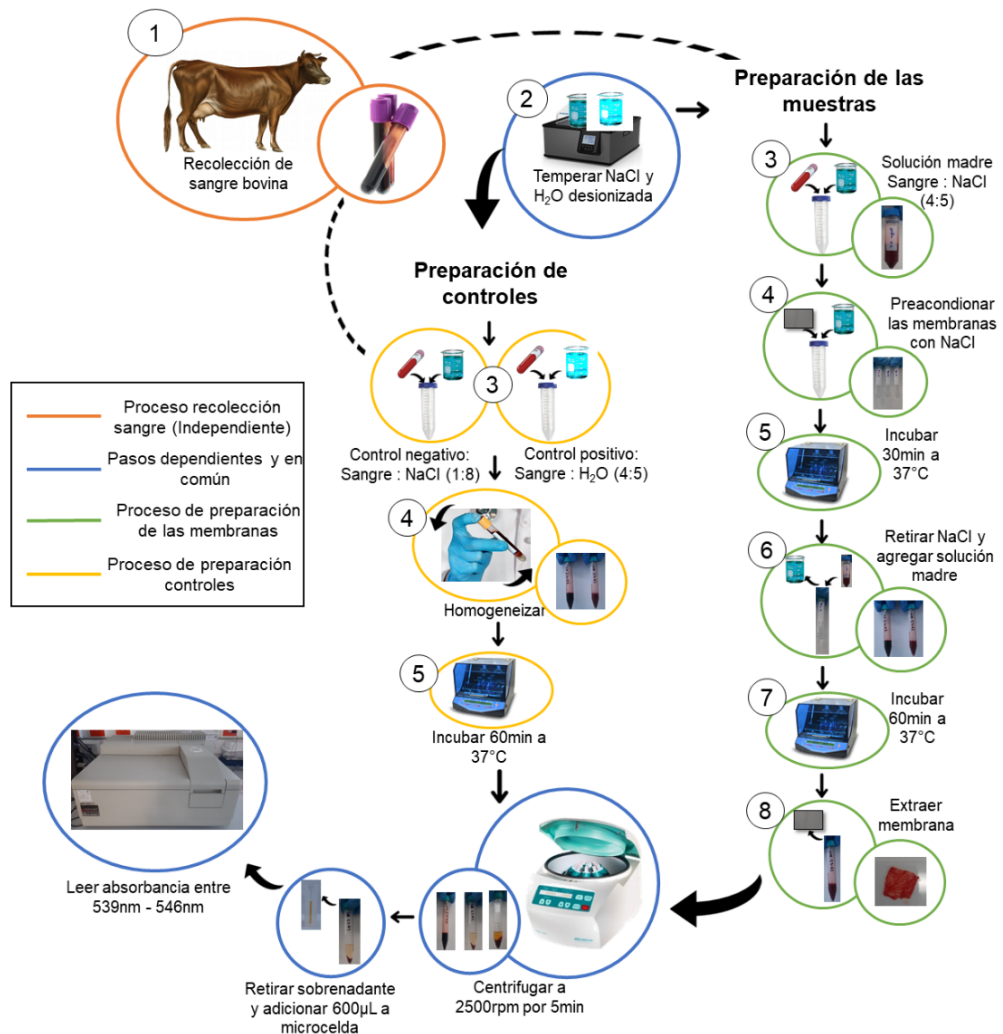


Figura 8. Esquema para determinar el porcentaje de hemólisis de las membranas electrohiladas de PCL/QLMW y PCL/QMMW. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

c. Prueba de permeabilidad estática

Para determinar experimentalmente los coeficientes de conductividad hidráulica se empleó una columna de permeabilidad siguiendo la norma ISO-7198. La prueba consistió en tomar una columna de presión hidrostática, con una altura de fluido equivalente a tres presiones 3, 5 y 10 mmHg, las cuales emulan la presión a la que se ven expuestos los vasos de pequeño diámetro como los capilares. Posterior a esto, se ubicó un portamuestra en el extremo de la columna de presión, en este se colocó muestras de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW previamente cortadas con una longitud de 2 cm x 2 cm, con el fin de medir la masa del fluido (agua destilada) que atraviesa la membrana durante 1 minuto (ver Figura 9). Con los resultados obtenidos se reportó la conductividad hidráulica de la membrana empleando la Ecuación 4.

$$K_{ISO7198} = \frac{m}{\rho_{\text{fluido}} * \text{área} * t}$$

Ecuación 4

Dónde $K_{ISO7198}$ es la conductividad hidráulica [$\text{ml}/\text{min} * \text{cm}^2$]; m es la masa del fluido de trabajo [g]; ρ_{fluido} es la densidad del fluido de trabajo [g/ml]; área es el área del portamuestra [cm^2] y t es el tiempo de recolección [min].

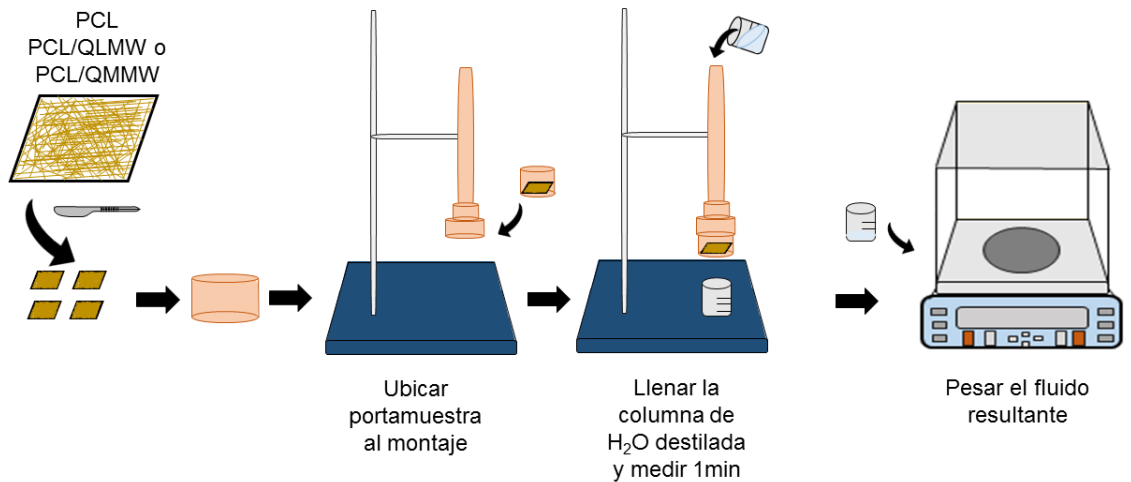


Figura 9. Esquema representativo del ensayo de permeabilidad para las membranas electrohiladas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW a presiones similares a las ejercidas en heridas externas de la piel. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

d. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ensayos de ANOVA multifactorial, donde se determinó la influencia estadística por medio de la premisa de valor $p > \alpha$, esta fue corroborada mediante la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk y prueba de homocedasticidad Bartlett bajo la hipótesis de valor $p > \alpha$. Además, los valores obtenidos en las técnicas de caracterización son expresados como un valor promedio \pm su desviación estándar. Así mismo, se consideró para cada técnica un $n=3$ y un nivel de significación estadística con $p = 0.05$.

CONCEPTO ÉTICO

El presente trabajo apunta a una investigación con riesgo mínimo debido a su naturaleza experimental, en la cual el objeto de estudio se dirige a membranas electrohiladas de quitosano y policaprolactona. Se declara que durante la ejecución de este proyecto no se realizarán pruebas en humanos ni en animales y en ninguna etapa del proyecto se contempló la interacción con pacientes. Las muestras derivadas del estudio fueron micrografías, espectros, curvas de porcentaje de degradación, comportamiento mecánico y hemólisis de las membranas electrohiladas no se aplicaron a un sujeto humano de estudio o paciente.

Insumos biológicos, radiaciones u otros factores de riesgo:

Los investigadores no fueron sometidos a riesgo alguno, ya que no manejaron elementos biológicos peligrosos y no se sometieron a radiaciones ionizantes u otras emisiones nocivas. El personal de investigación asociado guardó estricto cumplimiento de las normas de bioseguridad para la manipulación de material biológico y químico. Así mismo, se dispuso de los residuos de riesgo según las normas Nacionales e Internacionales establecidas para tal fin. Todo el equipo de investigación tiene capacitación para la manipulación de este material y del uso de equipos de alta tensión, pero bajo amperaje.

Teniendo en cuenta los objetivos del proyecto, se realizó experimentación del comportamiento hemolítico en sangre bovina, la cual fue donada por la Central de Faenado municipal de Medellín para la obtención de especímenes de estudio, por lo tanto, la sangre fue tomada de animales sanos que fueron utilizados en la industria alimenticia y no se sacrificaron específicamente para el estudio de esta investigación. Así mismo, se dispuso de los residuos biológicos, de acuerdo con las normas establecidas por la Universidad Pontificia Bolivariana, de forma que se minimizaron los efectos secundarios a su descarte.

CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DESARROLLO DE MEMBRANAS ELECTROHILADAS CONSIDERANDO EL EFECTO DEL PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO EN LA ESTRUCTURA DE UN MATERIAL BIOCMPUESTO.

a. Microscopía electrónica de barrido SEM

En la sección 1 del apartado del proceso experimental se planteó una metodología para determinar las condiciones óptimas de electrohilado para las membranas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW, que permitiera obtener membranas con fibras continuas, homogéneas, con poca presencia de defectos y con diámetros de fibras cercanos a la escala nanométrica. Cabe resaltar que los parámetros para la construcción del diseño experimental inicial de las membranas compuestas se basaron en una búsqueda bibliográfica, en donde se emplearon aquellos parámetros que evidenciaban la formación de fibras y recolección de material bajo el sistema de solventes que se seleccionó. En la Figura 10 y 12 se muestran las micrografías de las membranas obtenidas bajo los parámetros del diseño de experimentos No. 1 para PCL/QLMW y PCL/QMMW, así mismo en la Tabla 11 y Tabla 12 se puede apreciar el diámetro promedio de cada membrana.

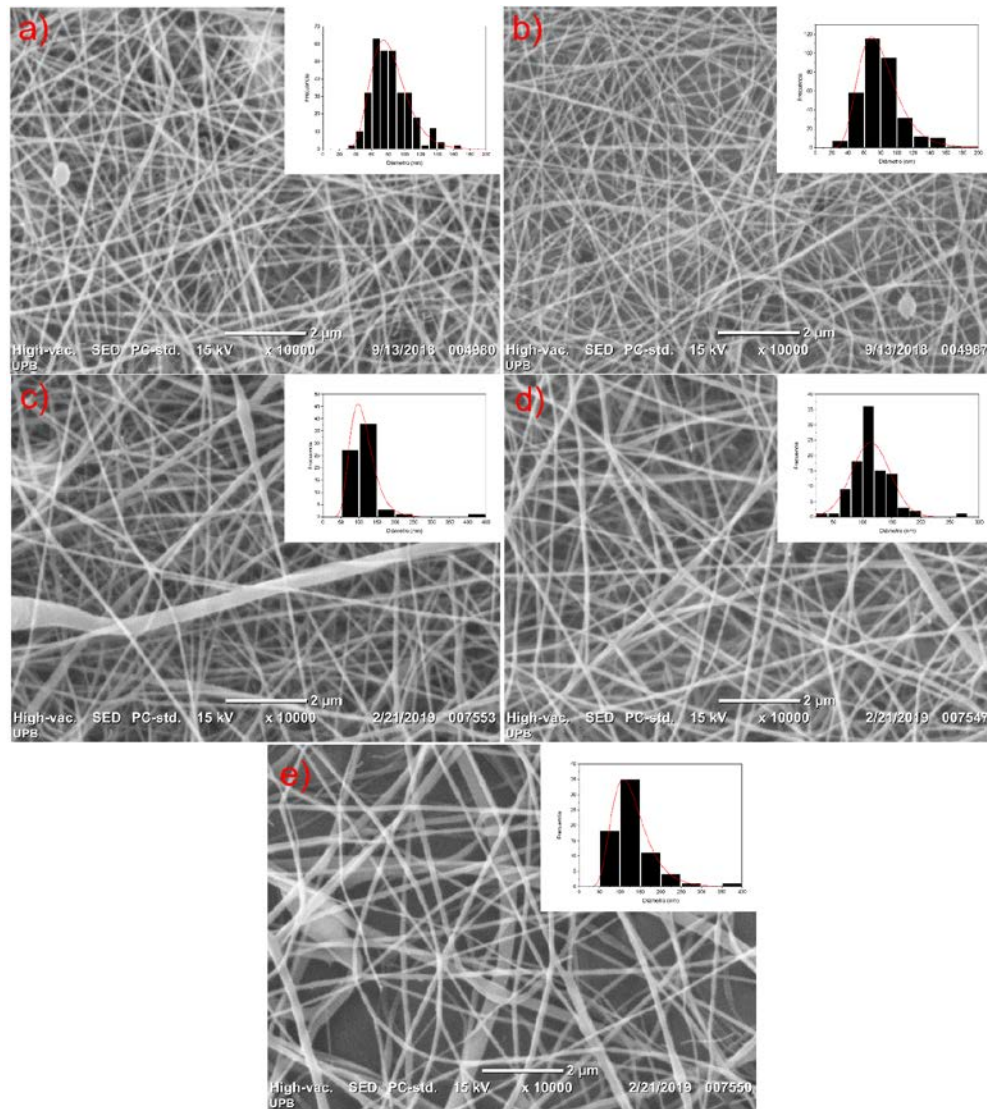


Figura 10. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 1. a) Distancia 10 cm; Voltaje 10 kV, b) Distancia 15 cm; Voltaje 10 kV, c) Distancia 10 cm; Voltaje 15 kV, d) Distancia 15 cm; Voltaje 15 kV y e) Distancia 20 cm; Voltaje 15 kV.

Las nanofibras de las membranas electrohiladas obtenidas a partir del diseño experimental No.1 de PCL/QLMW se orientaron aleatoriamente con valores de tamaño de fibra entre 70 a 120 nm, además, se exhibe una distribución heterogénea y en algunas combinaciones ensanchamiento de las fibras. Basado en lo anterior, se pudo observar que los tamaños de fibras para el voltaje de 10 kV presentaron una disminución a medida que aumentó la distancia entre la aguja y el colector. Se resalta que en la distancia de 20 cm no se logró la formación de fibras, lo cual podría atribuirse al bajo flujo de salida de la solución al momento de electrohilar unido, a la poca estabilidad en el cono de Taylor y a la alta distancia entre el colector y la aguja [63]. Así mismo, en el caso del voltaje de 15 kV se pudo observar un aumento en el diámetro de la fibra a medida que incrementó la distancia.

Además, para determinar la influencia de los parámetros variables se realizó un análisis Anova simple para así establecer si hay una significancia estadística entre los diámetros

de fibra obtenidos en relación a la distancia y/o voltaje. En este se encontró que hay un valor de $p= 0,000$ para la relación entre diámetro de fibra y distancia y un valor de $p= 0,002$ para la relación de diámetro de fibra y voltaje, lo que cumple la premisa de $p < \alpha$, no obstante, al momento de corroborar la significancia por la hipótesis de normalidad, se obtiene un valor de $p= 0,000$ lo que es contrario a la premisa de $p > \alpha$, por lo tanto no existe diferencia estadística entre los diámetros obtenidos y los parámetros variables (ver Anexo 1) .

Tabla 11. Resumen diseño de experimento No.1 para las muestras de PCL/QLMW.

Parámetros fijos		
Concentración (%)	PCL	2
	QLMW	12
Relación PCL/QLMW (v / v)	7:2	
Flujo (ml / h)	0.05	
Humedad (%)	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Diámetro de fibra (nm)
10	10	79,76 ± 1,30
	15	76,09 ± 1,36
	20	---*
15	10	106,32 ± 1,34
	15	109,57 ± 1,33
	20	122,27 ± 1,41

*Parámetros no óptimos para la generación de fibras.

Para complementar el análisis se realizó un gráfico de interacción, el cual involucra el parámetro de respuesta con los parámetros variables (ver Figura 11). En este se observó que el voltaje de 10 kV presentó bajo las 3 distancias una disminución en los diámetros de fibras en comparación a 15 kV y que, en efecto este comportamiento fue de forma descendente en relación al comportamiento ascendente que presentó el voltaje.

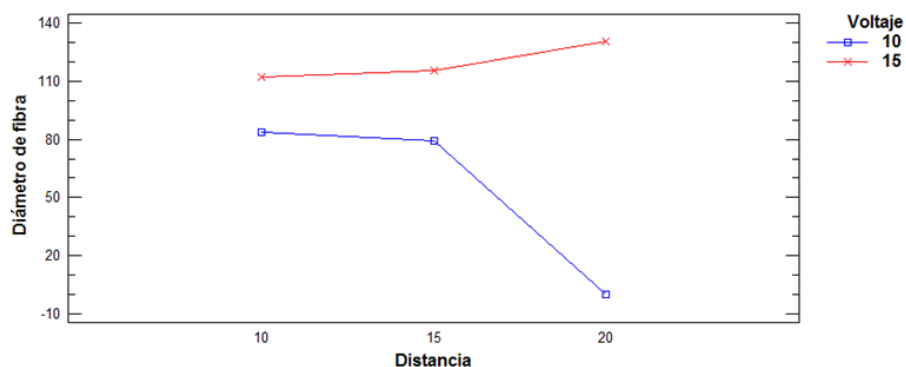


Figura 11. Gráfico de interacción entre los parámetros de respuestas y variables del diseño No.1 para membranas de PCL/QLMW. Con un $n=3$.

Para el caso del diseño experimental No.1 de PCL/QMMW, a diferencia de las muestras de PCL/QLMW se obtuvieron fibras en todos los parámetros planteados y con un diámetro mayor. Las membranas presentaron fibras continuas, heterogéneas, con poca presencia de defectos y con la aparición de fibras más finas que se desprenden de la fibra original (ver Figura 12), dicho fenómeno podría atribuirse a la presencia de

quitosano en la muestra, el cual debido a su peso molecular y a la concentración en la solución aumenta la densidad de carga debido a su naturaleza policatiónica, lo que conduce a una división secundaria adicional de la solución que influye en la formación de fibrillas superpuestas en las fibras de mayor diámetro [64].

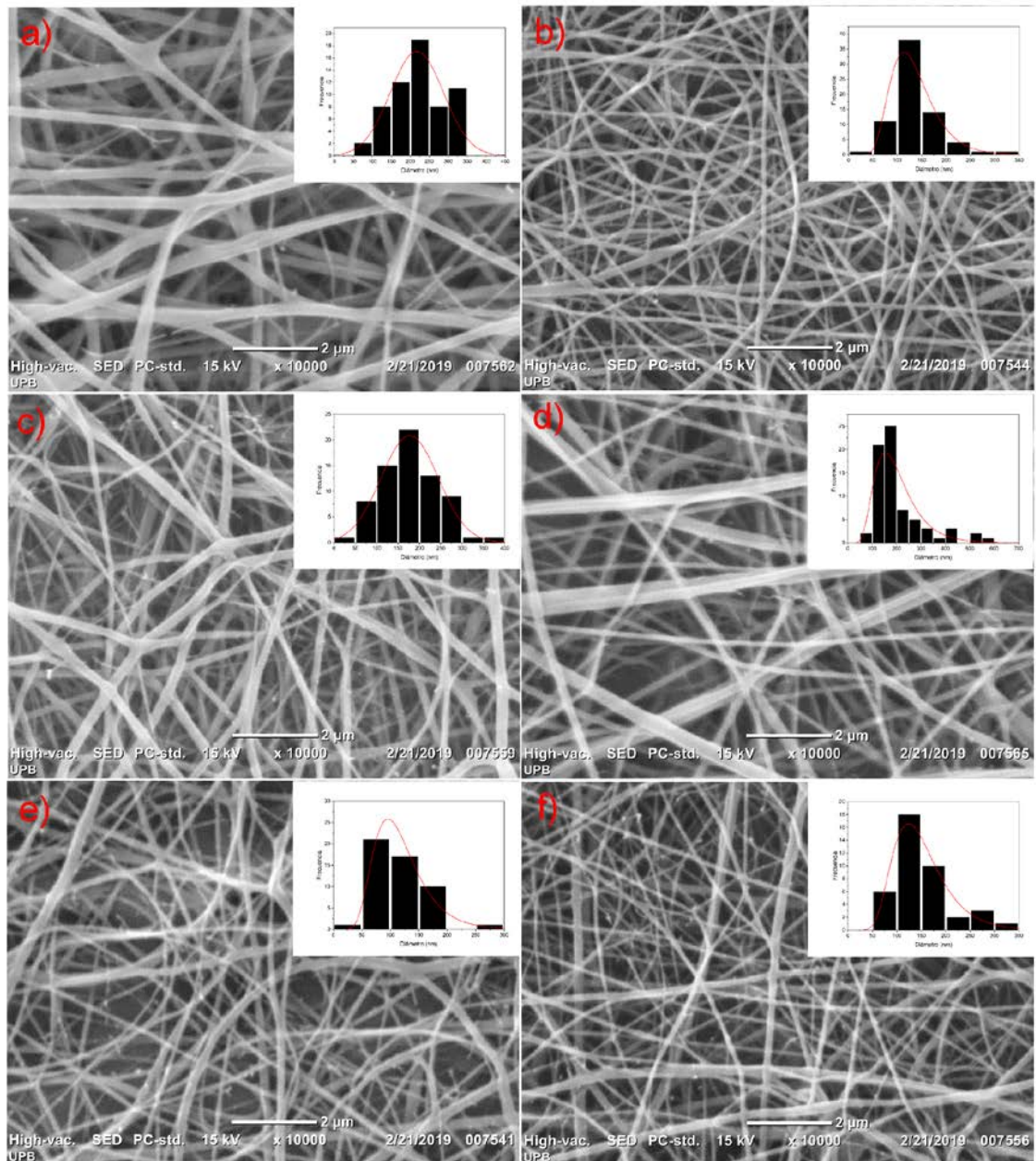


Figura 12. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QMMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 1. a) Distancia 10 cm; Voltaje 10 kV, b) Distancia 15 cm; Voltaje 10 kV, c) Distancia 20 cm; Voltaje 10 kV, d) Distancia 10 cm; Voltaje 15 kV, e) Distancia 15 cm; Voltaje 15 kV y f) Distancia 20 cm; Voltaje 15 kV.

Como se puede observar en la Tabla 12, a un voltaje de 15 kV se presenta una disminución del diámetro de fibra comparado con las obtenidas a 10 kV, lo cual se debe a un aumento en el diferencial de potencial originado entre la punta de la aguja y el colector que hace que haya una rápida ruptura de la tensión superficial de una menor

cantidad de solución y a su vez mayor elongación debido a la diferencia de cargas. Con el fin de determinar si los datos tienen significancia estadística, se encontró el valor p a partir de un análisis Anova simple (ver Anexo 2) donde se evidenció que no existe una diferencia estadística entre los resultados de diámetro de fibra y los parámetros variables, distancia y voltaje, debido a que el valor $p = 0,000$ es menor a $\alpha = 0,05$, lo cual contradice a la premisa de $p > \alpha$, hipótesis inicial declarada en la prueba de Homocedasticidad.

Tabla 12. Resumen diseño de experimento No.1 para las muestras de PCL/QMMW.

Parámetros fijos		
Concentración	PCL	2
	QMMW	12
Relación PCL/QMMW (v / v)		7:2
Flujo (ml / h)		0.05
Humedad (%)		30
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Diámetro de fibra (nm)
10	10	217,33 ± 70,0
	15	127,80 ± 1,40
	20	177,14 ± 67,0
15	10	185,26 ± 1,53
	15	110,62 ± 1,45
	20	141,30 ± 1,43

Para complementar el análisis se realizó un gráfico de medias entre el diámetro de fibra y la distancia (ver Anexo 3), donde se pudo observar que la distancia de 15 cm presenta menor diámetro en comparación a la de 10 y 20 cm, dicha disminución y aumento entre 15 y 20 cm podría atribuirse a la estabilidad del cono de Taylor al momento de electrohilar, como a la modificación en la distancia del colector asociado a la viscosidad de la solución [65]. Además, se obtuvo un gráfico de interacción que involucró el parámetro de respuesta con los parámetros variables (ver Figura 13), y se muestra que ambos voltajes presentaron un mismo comportamiento con respecto al diámetro de fibra, sin embargo el voltaje de 15 kV presenta menores diámetros de fibras en un rango de 220 a 110 nm.

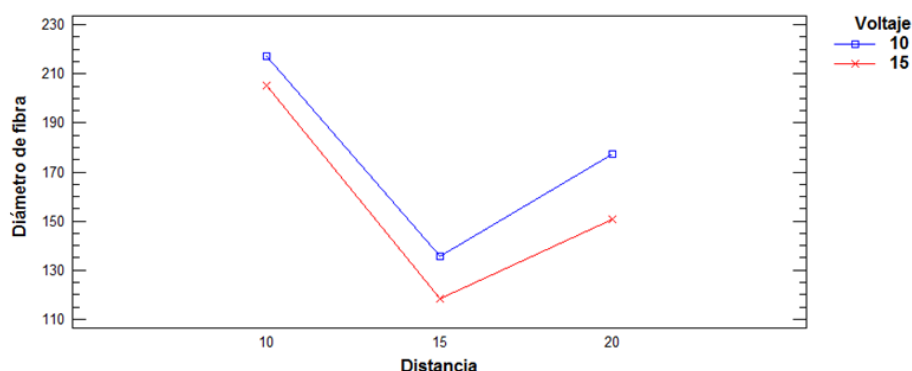


Figura 13. Gráfico de interacción entre parámetros respuestas y variables del diseño No.1 para membranas de PCL/QMMW. Con un $n=3$.

En base al diseño de experimentos No.1 de PCL/QLMW se complementó en busca de mejorar la apariencia de las membranas con un nuevo diseño donde se varió el voltaje a 10 y 11 kV a una distancia de 15 cm. En la Figura 14a se puede observar poca recolección del material a un voltaje de 10 kV, así mismo, se obtuvieron fibras continuas y heterogéneas, por otro lado en la Figura 14b, se evidenció presencia de perlas que pueden ser atribuidas al bajo peso molecular, baja concentración y viscosidad, alta tensión superficial o baja densidad de carga. En este caso, una baja concentración y alta fuerza eléctrica aplicada, hace que la solución solidifique el polímero de manera rápida y este se acumule y favorezca el aumento del diámetro de las fibras [66].

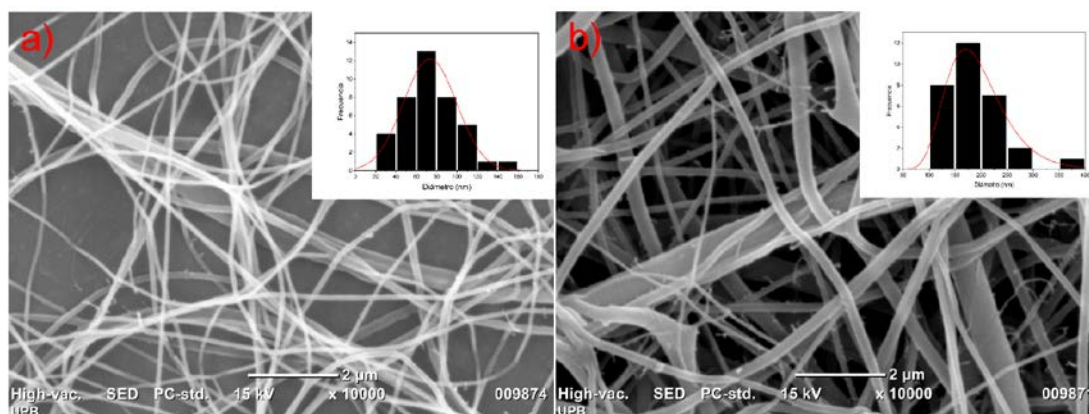


Figura 14. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 2. a) Distancia 15 cm; Voltaje 10 kV y b) Distancia 15 cm; Voltaje 11 kV.

Como se puede observar en la Tabla 13, para el diseño de experimentos No.2 de las muestras de PCL/QLMW el diámetro de fibra y la recolección del material aumentó con el voltaje, lo que puede atribuirse al aumento del diferencial de potencial y a una viscosidad insuficiente de la solución [63]. Para corroborar si los resultados presentan una diferencia estadística significativa entre el cambio de diámetro de fibra y el voltaje aplicado, se halló el valor p , el cual indica que no hay una significancia entre estos dos parámetros porque el valor de $p=0,08$ contradice a la premisa $p>\alpha$.

Tabla 13. Resumen de diseño de experimento No.2 para muestras de PCL/QLMW.

Parámetros fijos		
Concentración (%)	PCL	2
	QLMW	12
Relación PCL/QLMW (v / v)		7:2
Flujo (ml / h)		0.30
Humedad (%)		30
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Distancia (cm)	Voltaje (kV)	Diámetro de fibra (nm)
15	10	68,77 ± 1,44
	11	185,51 ± 1,34

Con el objetivo de mejorar la apariencia de las membranas de PCL/QMMW, se planteó el diseño de experimento No.2, en este se aumentó la concentración de quitosano, lo que llevó al aumento de la viscosidad de la solución y, por lo tanto, un aumento en el voltaje aplicado.

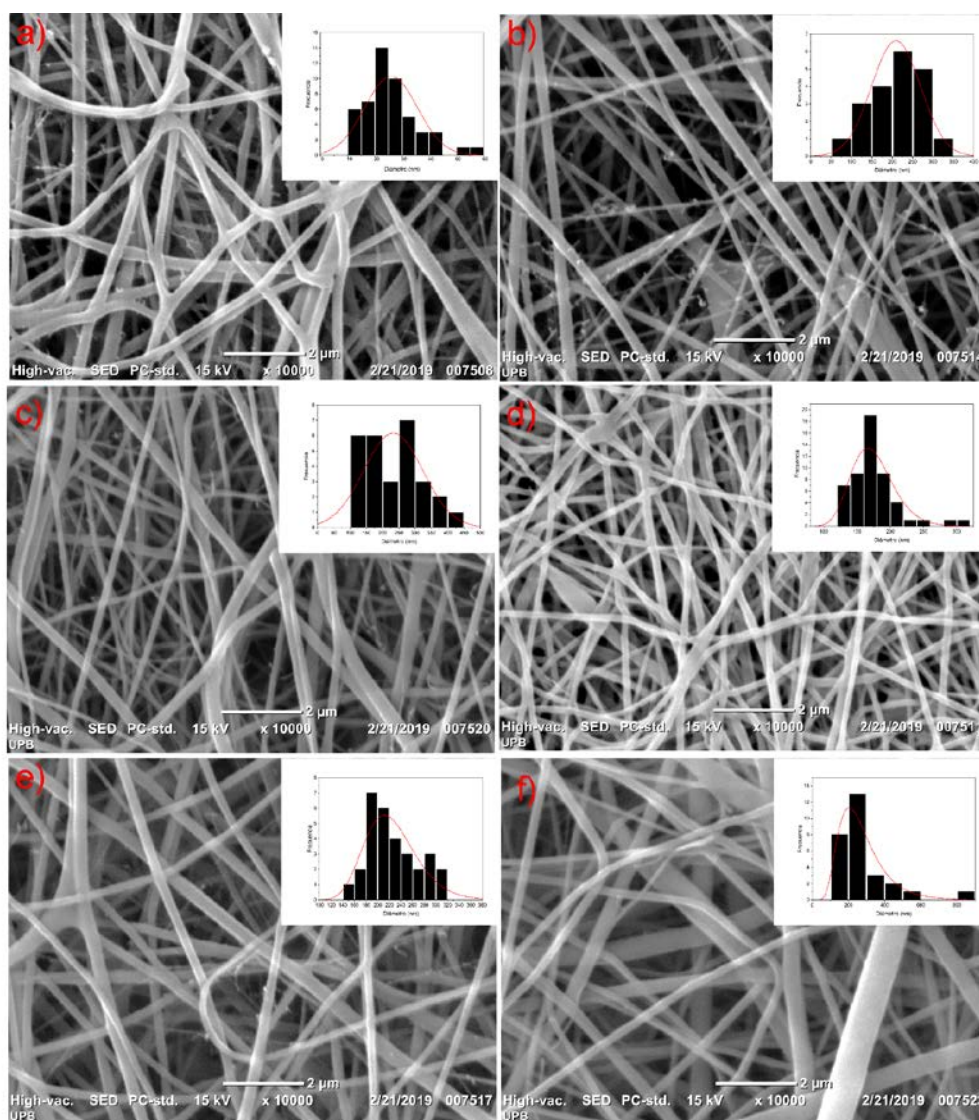


Figura 15. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QMMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 2. a) Distancia 15 cm; Voltaje 20 kV, b) Distancia 18 cm; Voltaje 20 kV, c) Distancia 20 cm; Voltaje 20 kV, d) Distancia 15 cm; Voltaje 22 kV, e) Distancia 18 cm; Voltaje 22 kV y f) Distancia 20 cm; Voltaje 22 kV.

En la Figura 15, se observaron fibras continuas, uniformes, con presencia de formación de fibras más finas debido al aumento del quitosano. De igual forma, se determinó que, al aumentar la concentración de la mezcla polimérica, se logró obtener fibras fusionadas con mayor homogeneidad, también, se identificó que el aumento de la distancia aguja-colector permite un mayor secado y solidificación de las nanofibras, gracias a que hubo ausencia de acumulación polimérica sobre la muestra.

Tabla 14. Resumen diseño de experimentos No. 2 para muestras de PCL/QMMW.

Parámetros fijos		
Concentración (%)	PCL	2
	QMMW	12
Relación PCL/QMMW (v / v)	7:3	
Flujo (ml / h)	0.5	
Humedad (%)	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Voltaje (Kv)	Distancia (cm)	Diámetro de fibra (nm)
20	15	27,91 ± 29,2
	18	203,05 ± 60,2
	20	232,60 ± 90,6
22	15	171,64 ± 1,20
	18	220,16 ± 1,22
	20	277,68 ± 1,55

De otro lado, se observó un aumento en el diámetro de fibra a medida que aumentó la distancia en cada voltaje, presentando fibras entre los 20 y 280 nm. De manera similar, el voltaje de 22 kV presentó mayor diámetro en comparación con el de 20 kV lo que podría atribuirse a una mayor cantidad del polímero expulsado debido a la viscosidad de la solución y al aumento en el voltaje (ver Figura 15 y Anexo 5) [67]. No obstante, entre el parámetro de respuesta y los parámetros variables expresados no hubo significancia estadística debido a que si bien se cumplió la premisa de $p < \alpha$ con un valor de 0,000, al momento de corroborar la hipótesis mediante la prueba de homocedasticidad y normalidad se descartó ya que el valor no cumplió la relación de $p > \alpha$ (ver Anexo 4).

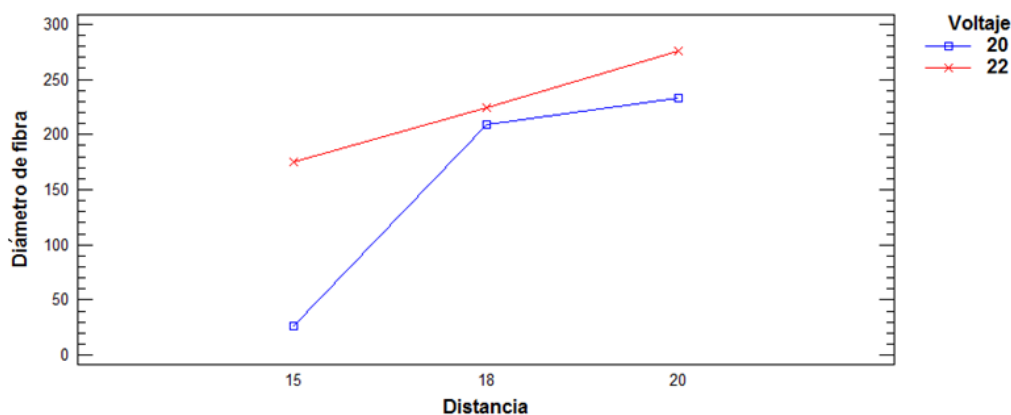


Figura 16. Gráfico de interacción entre los parámetros respuestas y variables del diseño No.2 para membranas de PCL/QMMW. Con un $n=3$.

Según los resultados obtenidos en el diseño de experimental No.2, en el caso de la muestra PCL/QLMW se procedió a realizar un tercer diseño experimental donde se varió el flujo a 0.3 ml / h, el voltaje a 11 kV y la distancia entre 10, 15 y 20 cm, lo cual permitió determinar disminución en los defectos de la muestra y aumento en la recolección del material.

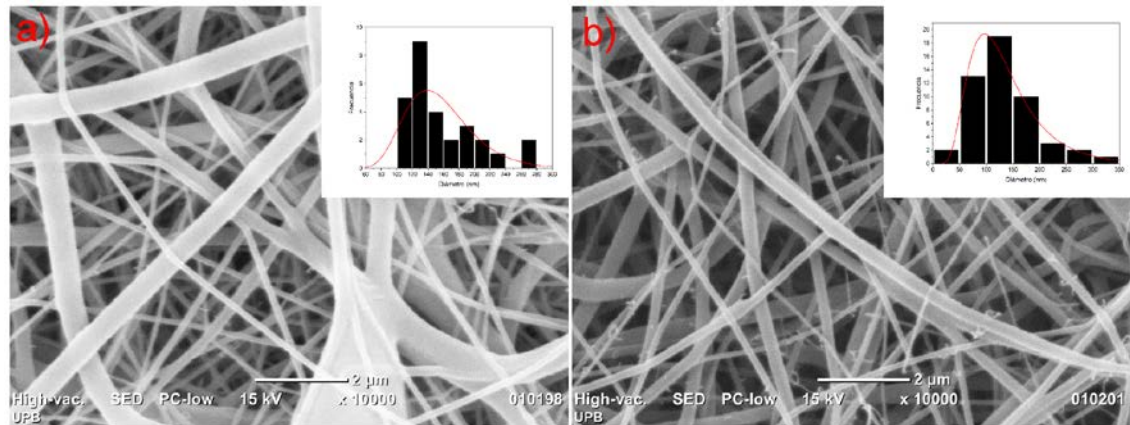


Figura 17. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 3. a) Distancia 10 cm; Voltaje 11 kV y b) Distancia 20 cm; Voltaje 11 kV.

Como se puede observar en la Figura 17, hay presencia de fibras continuas, heterogéneas con generación de fibras ultrafinas y engrosamiento a lo largo de su longitud, así mismo, se observó que el diámetro de fibra aumentó a medida que incrementó la distancia, sin embargo, no hay significancia estadística entre ambos parámetros (distancia y diámetro) debido a que el valor de p es de 0,8834. Este comportamiento de generación de fibras ultrafinas puede ser atribuido a la carga catiónica presente en la estructura del quitosano que unido a un valor de voltaje mayor (11 kV) en comparación a otros experimentos generan mayor conductividad y por ende formación de fibras más finas. De igual forma, el engrosamiento de la fibra y el aumento del diámetro en relación a la distancia podría atribuirse a la viscosidad de la situación que unido al voltaje y la distancia hacen presentar inestabilidades en la formación del cono de Taylor [68].

Tabla 15. Resumen diseño de experimentos No.3 para muestras de PCL/QLMW.

Parámetros fijos		
Concentración (%)	PCL	2
	QLMW	12
Relación PCL/QLMW (v / v)	7:2	
Flujo (ml / h)	0.30	
Humedad (%)	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Diámetro de fibra (nm)
11	10	131,88 ± 1,43
	20	137,28 ± 1,38

Así mismo, buscando obtener membranas sin defectos y con mayor cantidad de quitosano en la estructura final se dejaron fijos los parámetros como voltaje, distancia y flujo, y se varió la relación de PCL/QMMW.

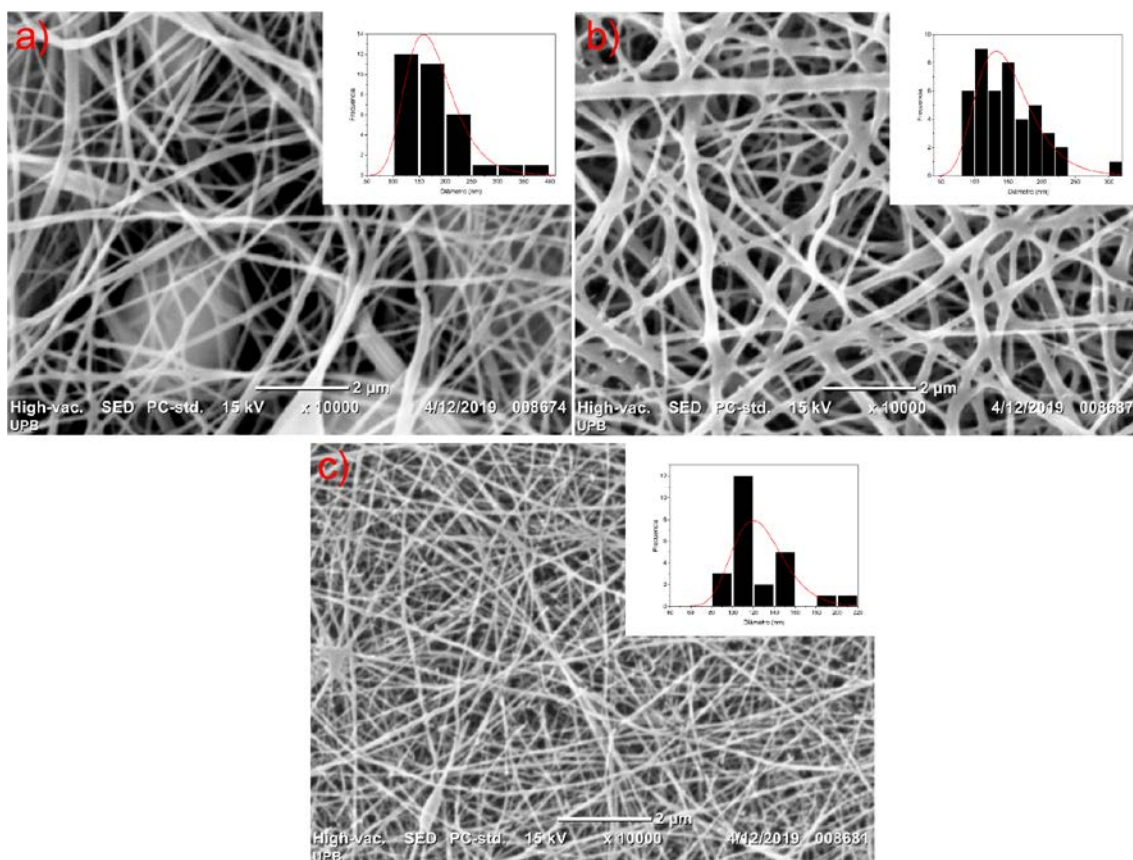


Figura 18. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QMMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 3. a) Relación (PCL: QMMW) 4:6, b) Relación (PCL: QMMW) 5:5 y c) Relación (PCL: QMMW) 6:4.

En este caso, se pudo observar cambios en la morfología de las fibras a medida que se agregó mayor cantidad de quitosano, esto puede atribuirse al cambio en la viscosidad y la conductividad de las soluciones electrohiladas [69]. Así mismo, la inestabilidad del cono de Taylor, influyen en la formación de nanofibras con irregularidades en los bordes de las fibras, así como, engrosamiento de las mismas (ver Figura 18).

Tabla 16. Resumen diseño de experimentos No.3 para muestras de PCL/QMMW.

Parámetros fijos		
Concentración (%)	PCL	2
	QMMW	12
Voltaje (kV)	22	
Flujo (ml / h)	0.30	
Distancia (cm)	15	
Humedad (%)	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Relación PCL/QMMW (v / v)		Diámetro de fibra (nm)
4:6		156,21 ± 66,2
5:5		139,46 ± 53,0
6:4		99,62 ± 1,39

Como se puede evidenciar en los datos del diámetro de fibra hay una disminución a medida que aumenta la cantidad de quitosano en la solución (ver Anexo 7), esta disminución en el diámetro de fibra se debe en parte a la naturaleza policatiónica del quitosano que influye en el aumento de la conductividad y, por lo tanto, una mayor densidad de carga en la solución. Debido a la mayor cantidad de cargas transportadas en el fluido de salida, se imponen fuerzas de alargamiento más altas que causan fibras más delgadas. Además, la adición de quitosano permite electrohilar soluciones de polímeros sintéticos que se presentan en menor concentración en la solución a electrohilar, lo que ocasiona aumento de la viscosidad y generación de fibras continuas [70]. De igual forma, con el fin de obtener membranas sin defectos y con mayor cantidad de quitosano en la estructura final se dejaron fijos los parámetros de voltaje, distancia y flujo, y se varió la relación de PCL/QLMW.

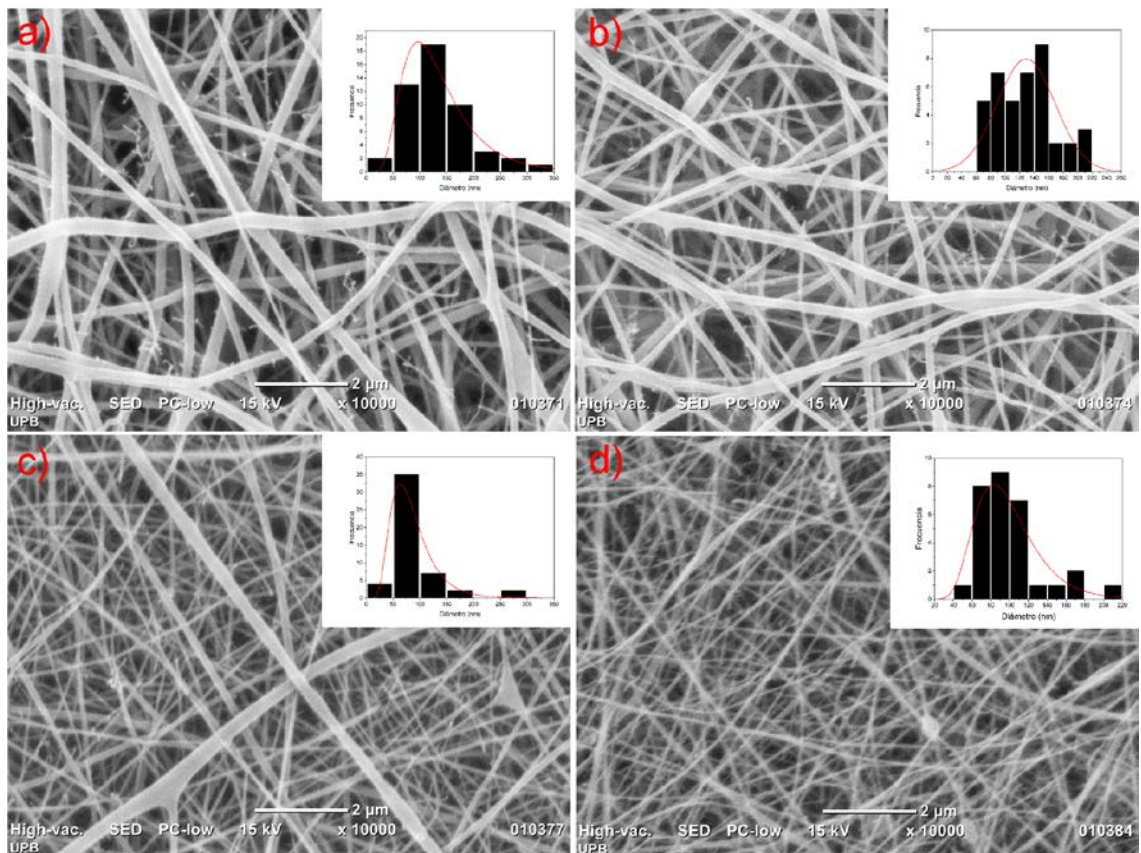


Figura 19. Micrografías de las membranas electrohiladas de PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 4. a) Relación (PCL: QLMW) 4:6, b) Relación (PCL: QLMW) 5:5, c) Relación (PCL: QLMW) 6:4 y d) Relación (PCL: QLMW) 7:3.

Como se observa en la Figura 19, se obtuvieron fibras continuas, cuyos diámetros fueron entre 70 y 130 nm (ver Tabla 17) con una distribución homogénea para cada muestra, así mismo, se presentó disminución del tamaño de las fibras a medida que se agregó mayor cantidad de quitosano a la solución de electrohilado, esta disminución sustancial en el diámetro de la fibra se debe en parte a la composición electrónica del quitosano, que al presentar cargas positivas alrededor de su estructura da como resultado una conductividad aumentada, las cuales unidas al voltaje aplicado favorecen el estiramiento de la fibra en formación [71]. Al momento de realizar el análisis estadístico no se encontró diferencia estadísticamente significativa debido a que el valor

de p en la prueba de normalidad y homocedasticidad fue de 0,000 y 0,003, respectivamente, dicho valor fue menor a $\alpha=0.05$, es decir no se cumple con la premisa $p > \alpha$ (ver Anexo 8).

Tabla 17. Resumen diseño de experimentos No.4 para muestras de PCL/QLMW

Parámetros fijos		
<i>Concentración (%)</i>	PCL	2
	QLMW	12
<i>Voltaje (kV)</i>	11	
<i>Flujo (ml / h)</i>	0.30	
<i>Humedad (%)</i>	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
<i>Distancia (cm)</i>	<i>Relación PCL/QLMW (v / v)</i>	<i>Diámetro de fibra (nm)</i>
20	4:6	121,43 ± 1.60
	5:5	128,82 ± 40,0
	6:4	77,24 ± 1,55
	7:3	72,90 ± 1,39

Finalmente, para las muestras de PCL/QMMW se dejó fija la relación de ambos polímeros en 4:6, respectivamente; y se varió la distancia aguja-colector y el flujo con el fin de obtener diferentes porosidades para la obtención de una membrana electrohilada compuesta de 3 capas, esto pensando en la capacidad de la membrana para ser un filtro selectivo, es decir, interactuar con el fluido, hacer la captación y generar una barrera de protección.

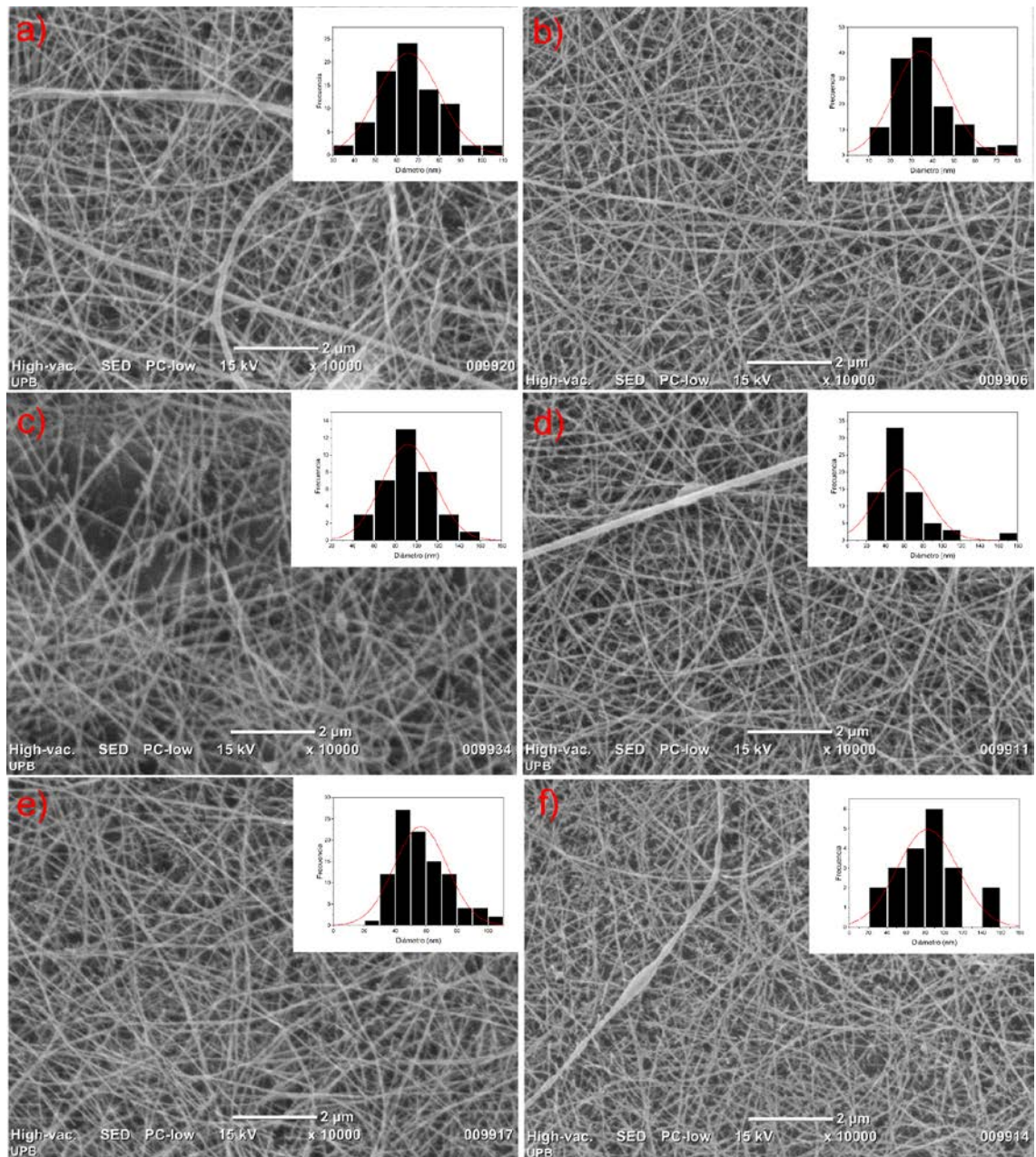


Figura 20. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QMMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 4. a) Distancia 18 cm; Flujo 0,3 ml/h, b) Distancia 20 cm; Flujo 0,3 ml/h, c) Distancia 25 cm; Flujo 0,3 ml/h, d) Distancia 18 cm; Flujo 0,5 ml/h, e) Distancia 20 cm; Flujo 0,5 ml/h y f) Distancia 25 cm; Flujo 0,5 ml/h.

En general, se obtuvieron fibras desde 33 nm hasta 87 nm (ver Tabla 18) donde todos los valores fueron por debajo de la escala nanométrica (diámetro de fibra < 100 nm), así mismos, las muestras presentaron fibras con bordes definidos, continuos y heterogéneos (ver Figura 20). Además, como se puede observar en la Figura 21, el menor diámetro de fibra se presentó a un flujo de 0.3 ml/h y una distancia de 20 cm. A partir del gráfico de medias se encontró que a un flujo de 0.3 ml/h se generaron los menores tamaños de diámetro de fibra en comparación con el flujo de 0.5 ml/h (ver Anexo 9).

Tabla 18. Resumen diseño de experimento No.4 para muestras de PCL/QMMW.

Parámetros fijos		
Concentración (%)	PCL	2
	QMMW	12
Voltaje (kV)		22
Relación PCL/QMMW (v / v)		4:6
Humedad (%)		30
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Flujo (ml / h)	Distancia (cm)	Diámetro de fibra (nm)
0.3	18	66,56 ± 1,35
	20	33,60 ± 1,50
	25	86,08 ± 1,27
0.5	18	56,93 ± 1,52
	20	55,78 ± 1,40
	25	83,21 ± 1,52

A partir de los resultados de la Tabla 18, se puede observar menores diámetros de fibra para un flujo de 0.5 ml/h, esto podría deberse al aumento en el flujo de salida de la solución de electrohilatura, la cual presenta un incremento en la conductividad ocasionado por la cantidad de cargas del quitosano que aumenta según lo hace el fluido de eyección. Como se mencionó anteriormente, la conductividad y la viscosidad tienen efectos sobre la estabilidad del cono de Taylor, lo que unido a la distancia entre aguja-colector es determinante sobre el diámetro de fibra. En este caso específico, se hace evidente un aumento en el diámetro de fibra para la distancia de 25 cm, lo cual, comparado con el comportamiento de los diseños de experimentos anteriores, puede deberse a inestabilidades en el cono de Taylor debido a que hay una mayor distancia y esto incide sobre las fuerzas de atracción en el sistema. Para validar si hay una diferencia estadística, se realizó un Anova multifactorial donde se relacionó el diámetro de fibra en respuesta al flujo y la distancia de colección, se encontró que ambos parámetros no ocasionaron cambios estadísticamente significativos respecto al diámetro de la fibra debido a que el valor de p fue mayor con respecto a $\alpha=0.05$.

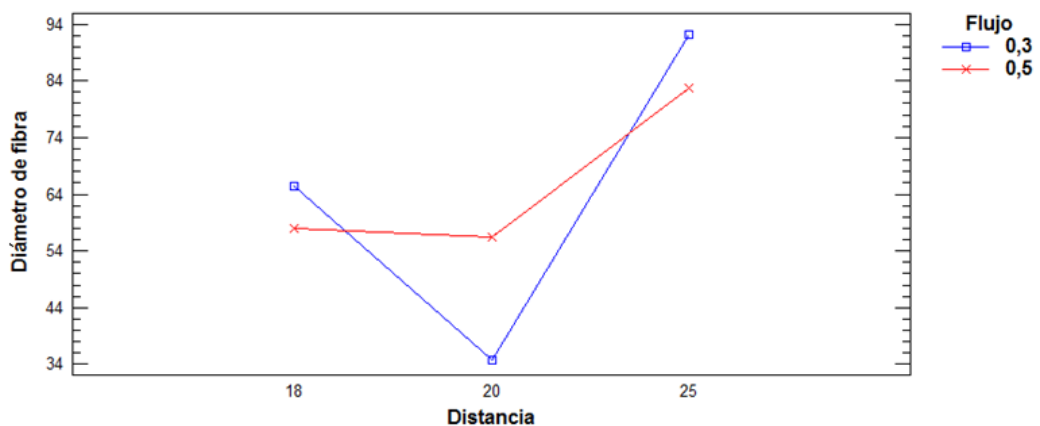


Figura 21. Gráfico de interacción entre parámetros respuestas y variables del diseño No.4 PCL/QMMW. Con n=3.

Finalmente, para completar el diseño de experimentos de las muestras de PCL/QLMW, se dejó fija la relación entre ambos polímeros en 4:6, respectivamente y se varió la distancia entre la aguja-colector y el flujo de inyección.

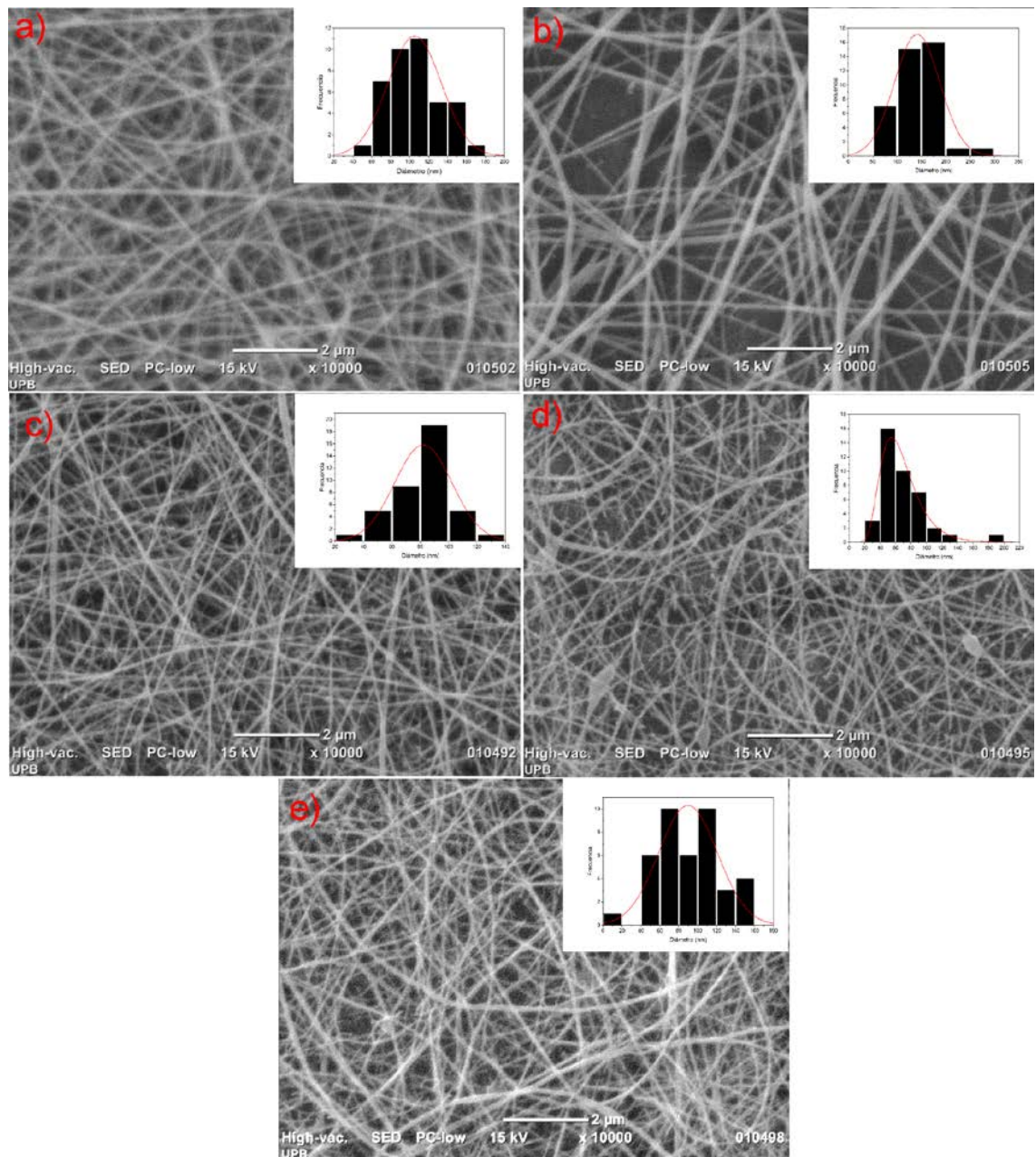


Figura 22. Micrografías de las membranas electrohiladas PCL/QLMW bajo los parámetros del diseño experimental No. 5. a) Distancia 18 cm; Flujo 0,3 ml/h, b) Distancia 25 cm; Flujo 0,3 ml/h, c) Distancia 18 cm; Flujo 0,5 ml/h, d) Distancia 20 cm; Flujo 0,5 ml/h y e) Distancia 25 cm; Flujo 0,5 ml/h.

Las nanofibras electrohiladas en el diseño experimental No.5 de PCL/QLMW se orientaron aleatoriamente con valores de tamaño de fibra entre 60 a 140 nm, de manera

heterogénea y con presencia de defectos a una distancia de 20 cm y un flujo de 0.5 ml/h (ver Figura 22), lo cual pudo ser debido a que el solvente no se evaporó en el trayecto y se depositaron las fibras húmedas en el colector [72]. Así mismo, se observó que los mayores diámetros de fibras fueron ocasionados por un flujo de 0,3 ml/h, y de otro lado, los menores diámetros de fibra se obtuvieron en un flujo de 0.5 ml/h a una distancia de 20 cm, lo que puede atribuirse a un mayor estiramiento de las fibras generado por la cantidad de polímero expulsado y el voltaje aplicado al sistema (ver Anexo 10 y Figura 23).

Tabla 19. Resumen diseño de experimentos No.5 para muestras de PCL/QLMW.

Parámetros fijos		
Concentración (%)	PCL	2
	QLMW	12
Voltaje (kV)	11	
Relación PCL/QMMW (v / v)	4:6	
Humedad (%)	30	
Parámetros variables		Parámetro respuesta
Flujo (m / h)	Distancia (cm)	Diámetro de fibra (nm)
0.3	18	101,47 ± 1,32
	25	141,22 ± 46,53
0.5	18	82,17 ± 20,18
	20	62.93 ± 1,44
	25	89,75 ± 30,99

De igual manera, al realizar el análisis estadístico para determinar si los parámetros variables tienen significancia estadística respecto al parámetro de respuesta, se encontró un p de 0,000, pero al realizar la prueba de Normalidad se descartó dicha hipótesis debido a que no cumplió con el criterio de $p > \alpha$ ($p = 0,002$).

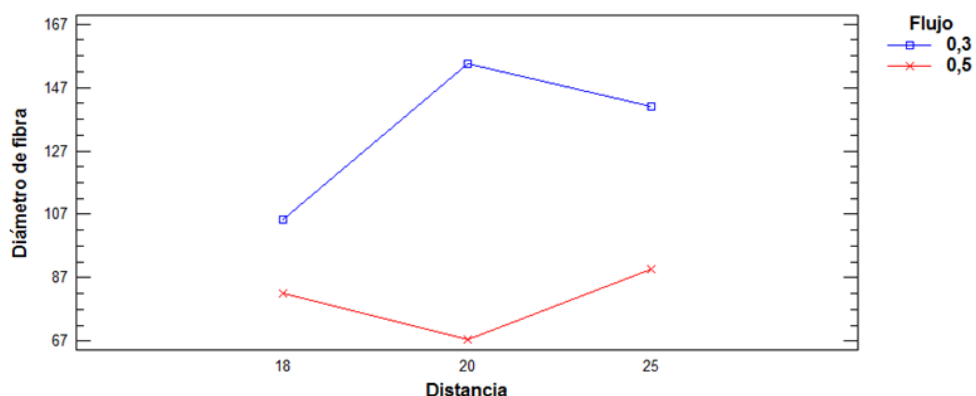


Figura 23. Gráfico de interacción entre parámetros respuestas y variables del diseño No.5 PCL/QMMW. Con un $n=3$.

Posteriormente, se escogió los parámetros finales de electrohilatura para cada tipo de muestra (PCL/QLMW y PCL/QMMW), en los cuales se eligieron aquellos que permitieron la obtención de morfologías sin defectos y fibras a escala nanométrica, consecuente a esto se procedió a electrohilar por un periodo de 10 horas.

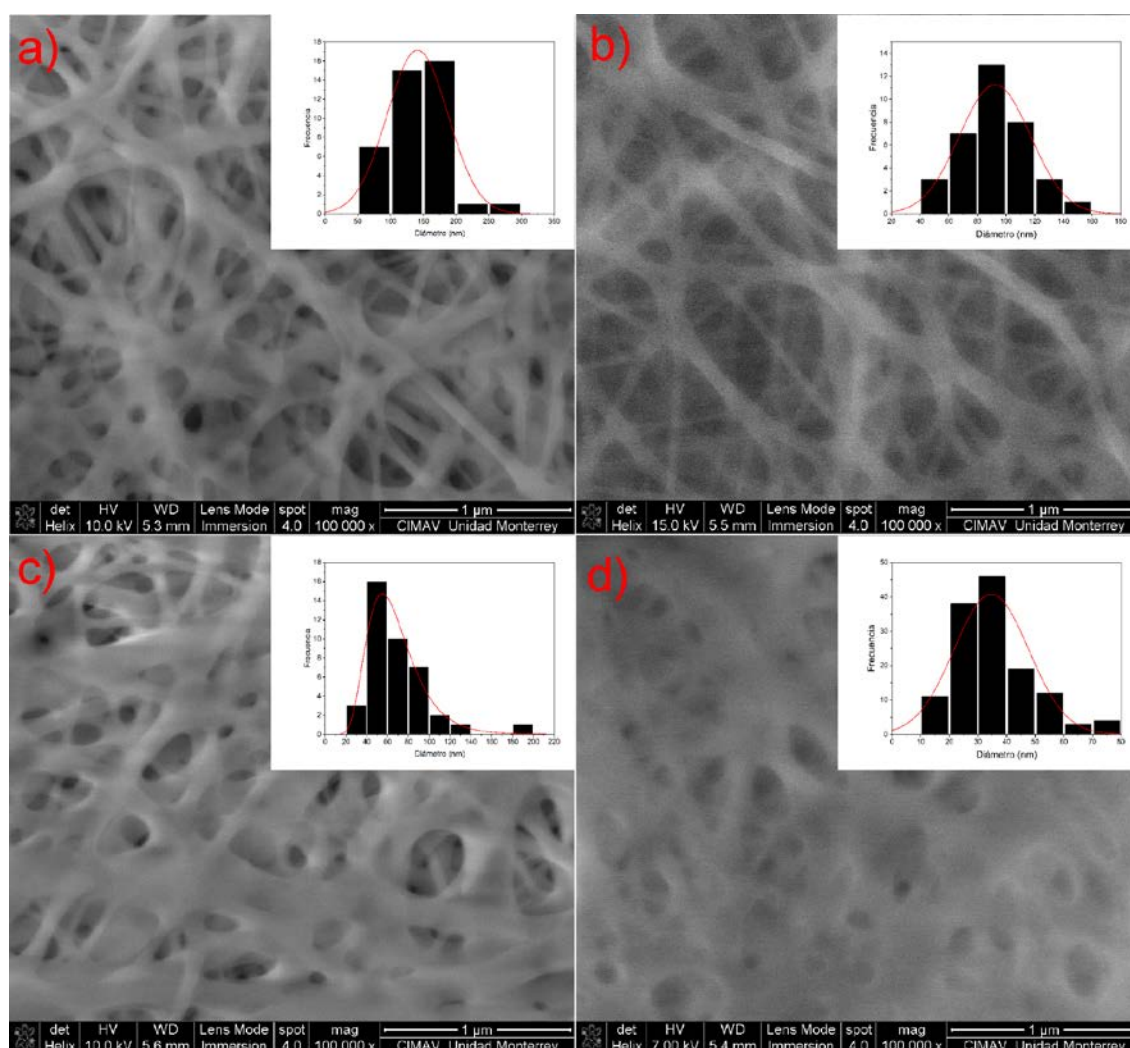


Figura 24. Micrografías las membranas de PCL/QMMW y PCL/QLMW. a) PA/PM/PB de PCL/QLMW, b) PA/PM/PB de PCL/QMMW, c) PB/PM/PA de PCL/QLMW, d) PB/PM/PA de PCL/QLMW.

Como se puede observar en la Figura 24 a y 24 b, cualitativamente se evidencia membranas con un tamaño de poro mayor, por lo cual se procedió a determinar el tamaño de poro y porosidad por medio de la segmentación de la imagen y uso del programa Fiji (Ver Tabla 20), donde se encontró que el tamaño de poro aparente se ve influenciado por la sinergia entre los diferentes parámetros de electrohilatura, en especial, entre la relación del flujo y la distancia aguja-colector.

Tabla 20. Resumen de los parámetros de electrohilatura para las membranas de PCL/QMMW y PCL/QLMW.

Parámetros constantes		
Concentración (%)	PCL	2

			QMMW o QLMW				12	
Relación PCL/QMMW o PCL/QLMW (v/v)			4:6					
Humedad (%)			30					
Parámetros variables			Parámetro respuesta					
Membrana	PCL QMMW	PCL QLMW	Porosidad (%)	Tamaño de poro (nm)		Pdl		
Capa A	Porosidad Alta		PCL QMMW	PCL QLMW	PCL QMMW	PCL QLMW	PCL QMMW	PCL QLMW
Voltaje (kV)	22	11	31	31,6	39,2	22,5	0,008	0,010
Distancia (cm)	25	25						
Flujo (m/h)	0.3	0.3						
Capa B	Porosidad Baja		PCL QMMW	PCL QLMW	PCL QMMW	PCL QLMW	PCL QMMW	PCL QLMW
Voltaje (kV)	22	11	29	30	21,9	19,1	0,017	0,008
Distancia (cm)	20	20						
Flujo (m/h)	0.3	0.5						

Finalmente, al observar el índice de polidispersidad, se encontró que al ser un valor cercano en todas las membranas a 0 (ver Tabla 20), se determinó que el comportamiento de las fibras de PCL/QMMW y PCL/QLMW exhiben monodispersidad, esto indica que los valores del diámetro de fibra se encuentran delimitados entre intervalos cortos, es decir que las membranas obtenidas presentan homogeneidad en sus fibras.

2. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE MEMBRANAS COMPUESTAS ELECTROHILADAS.

a. Espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de determinar la interacción química entre el polímero natural y el sintético, se realizaron mediciones por FTIR de las muestras de PCL, PCL/QLMW, PCL/QMMW, QLMW y QMMW. En el espectro de la Figura 25, 26 y 27 se indican los picos característicos de los grupos funcionales presentes en la estructura de la PCL, del QLMW y QMMW, respectivamente. Como se observa en la Figura 25, hay dos bandas características ubicadas en 2940 y 1723 cm^{-1} que pertenecen a la vibración del grupo -CH y -C=O de la PCL, las cuales se evidenciaron en las membranas compuestas de PCL/QLMW y PCL/QMMW, a pesar de que la intensidad varió dependiendo de la relación volumétrica de la solución a electrohilar del PCL, se determinó la presencia de este polímero en la estructura final de las membranas compuestas electrohiladas [73] [74].

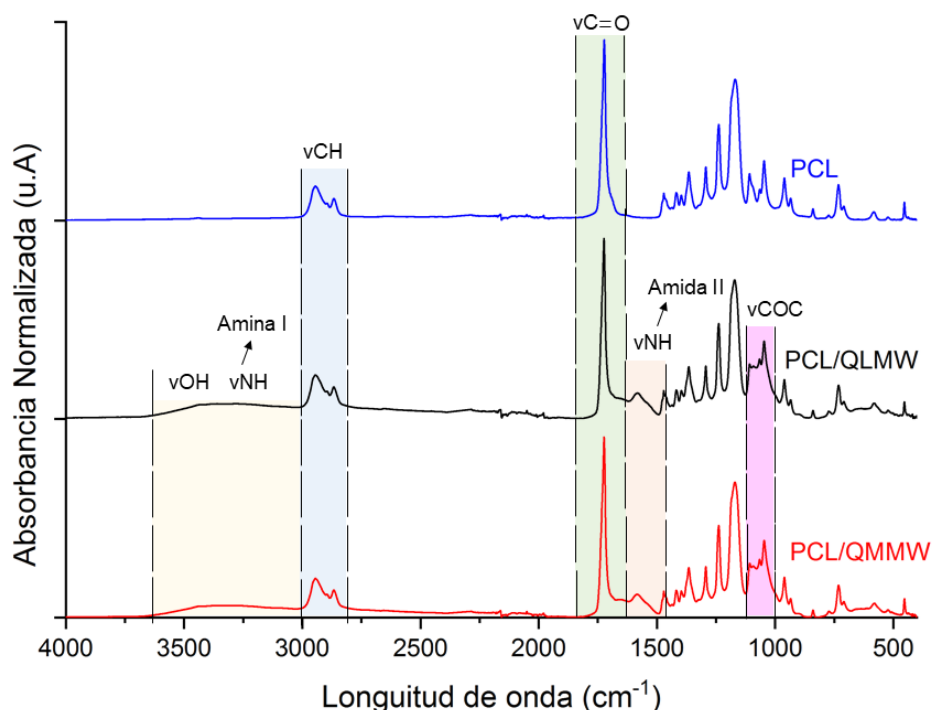


Figura 25. Espectros de FTIR de las membranas electrohiladas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW.

Basado en lo anterior, se compararon los espectros de las membranas compuestas electrohiladas con el control de quitosano, en busca de confirmar una interacción química entre estos materiales (ver Figura 26 y 27). En los espectros de FTIR del quitosano se pudo observar la región espectral entre 1000 y 1700 cm^{-1} , la cual corresponde a las bandas de absorción de la amida I y amida II ubicadas a una longitud de onda entre los 1630-1660 cm^{-1} y 1564 cm^{-1} , respectivamente. Así mismo, se encontró una vibración de grupos -CH₃ y -CO a una longitud de onda de 1347 cm^{-1} y 1062 cm^{-1} , respectivamente [75]. Además, los espectros mostraron bandas entre los 3000-3600 cm^{-1} asociado a la vibración de los grupos -OH y a las aminas primarias, y una banda a una longitud de onda de 2870 cm^{-1} , el cual está relacionado con el estiramiento del enlace -CH.

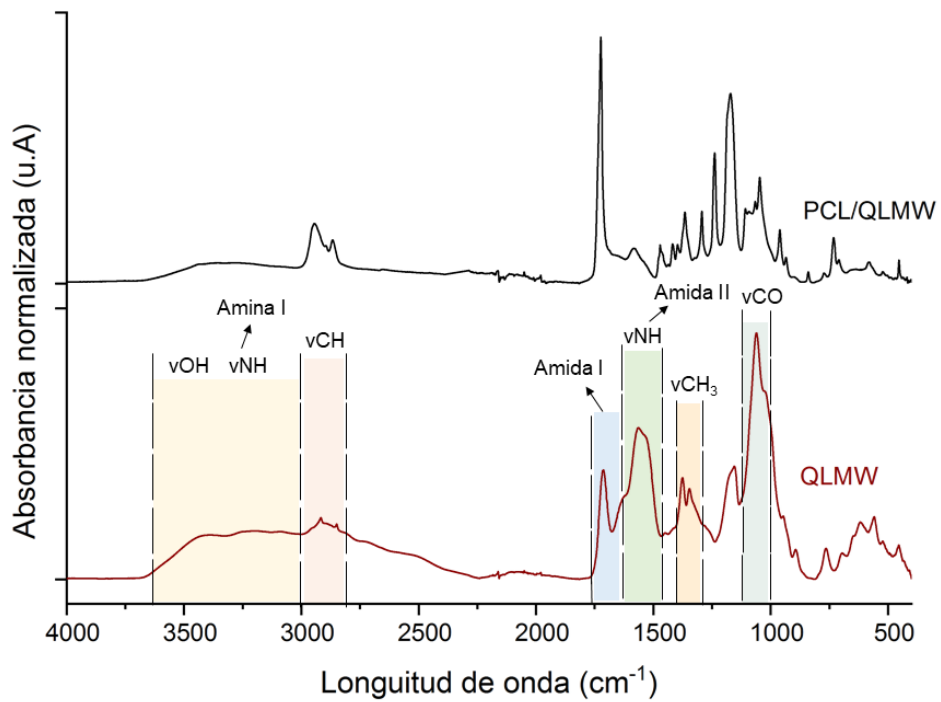


Figura 26. Espectros de FTIR de control de QLMW y membranas electrohiladas de PCL/QLMW.

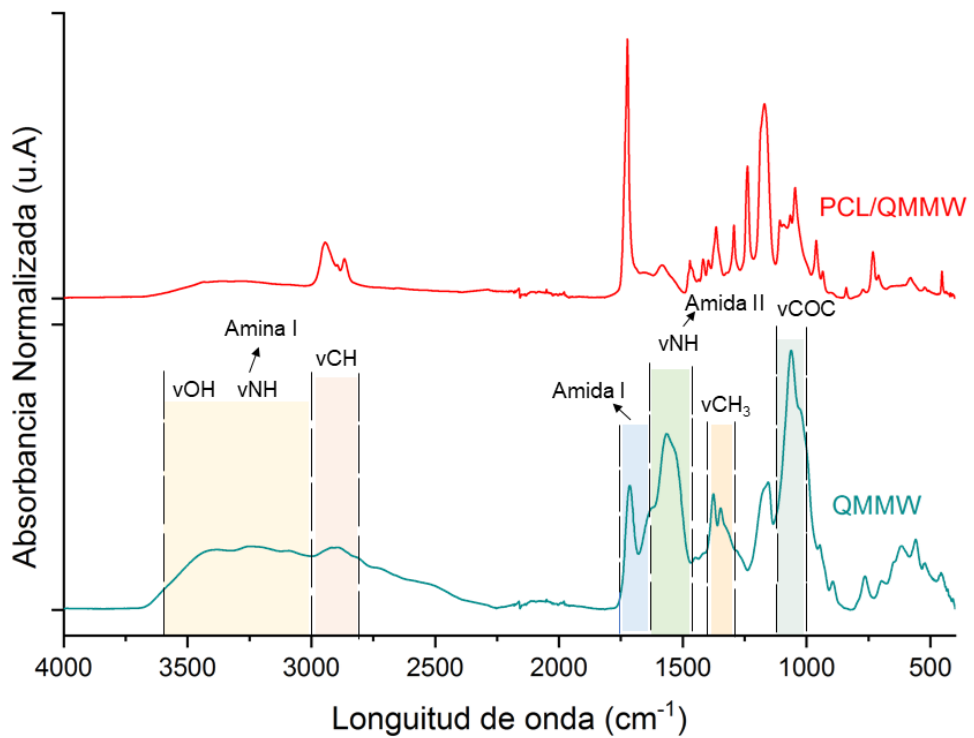


Figura 27. Espectros de FTIR de las muestras de control de QMMW y membranas electrohiladas de PCL/QMMW.

Como se puede observar en la Figura 26 y 27 para las membranas electrohiladas de PCL/QLMW y PCL/QMMW mostraron el pico correspondiente a la amida II alrededor de los 1583 - 1582 cm^{-1} , el cual presentó una desviación hacia la izquierda comparado con

los controles de quitosano ($1564 - 1563 \text{ cm}^{-1}$). Dicho comportamiento podría atribuirse una interacción mediada por uniones débiles tales como puentes de hidrógeno.

Para confirmar dicha hipótesis se analizó por medio de una deconvolución de la banda en el rango de los $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ el cambio de los porcentajes de aminas primarias y secundarias ($-\text{NH}_2$, $-\text{NH}$) y grupos hidroxilos ($-\text{OH}$) de los espectros de las membranas electrohiladas PCL/QLMW, PCL/QMMW y sus respectivos controles (ver Tabla 21).

Tabla 21. Resumen del porcentaje de área de los grupos funcionales de las membranas compuestas y sus respectivos controles.

Muestra	QLMW	PCL/QLMW	QMMW	PCL/QMMW
Grupo Funcional	Área (%)			
-NH-Primaria	82,04	52,23	50,17	38,13
-NH-Secundaria	---	---	---	---
-OH	17,95	47,77	49,82	61,87

A partir de los resultados, se encontró una disminución en el porcentaje de NH-primaria en las muestras compuestas. Dicho efecto podría estar asociado a posibles interacciones químicas entre los grupos amino, carboxilo e hidroxilo de la PCL y el quitosano (Ver Figura 28), así mismo hubo un aumento el porcentaje de área del grupo -OH en las muestras compuestas [73].

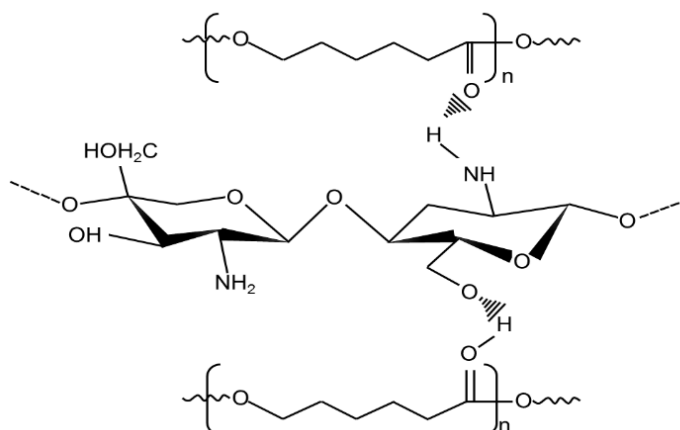


Figura 28. Esquema de posible interacción por puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de la PCL y el quitosano. [Fuente: María Oviedo, Grupo Dinámica Cardiovascular].

b. Pruebas mecánicas

Los valores de deformación obtenidos bajo la prueba de tensión mecánica estática uniaxial dependen de la composición del material, de imperfecciones microscópicas, del proceso de fabricación, de la velocidad de carga, de las fuerzas de interacción entre los componentes y la estructura del material [76] [77].

Como se observa en la Figura hay un aumento en la rigidez del material al momento de agregar quitosano en la mezcla, el cual muestra un esfuerzo para la PCL es de aproximadamente 47% antes del punto de fractura, mientras que, los esfuerzos para las muestras de PCL/QMMW y PCL/QLMW fueron de 18% y 13%, respectivamente. Esto podría deberse a que el quitosano se comporta como una carga que rigidiza al material compuesto con respecto a la policaprolactona que forma la matriz, así mismo la diferencia de elongación entre las muestras de quitosano son debido al aumento en el

peso molecular y a la presencia de diámetros entre 33 a 90 nm que componen la membrana de PCL/QMMW en comparación del diámetro de las fibras de la membrana PCL/QLMW, la cual presenta fibras entre 60 a 150 nm [78].

De igual forma, se puede observar que el módulo de Young, al igual que los porcentajes de elongación se ven afectados al adicionar quitosano en la estructura, en este caso se presenta un aumento de dicho parámetro al momento de incorporar el polímero natural. Este comportamiento se puede deber a tres razones: la primera se atribuye a la homogeneidad y tamaño de fibra, ya que la membrana de PCL/QLMW presentan mayores diámetros de fibra en comparación a la membrana de PCL/QMMW, lo que bajo un mismo tipo de fuerza aplicada supone un menor módulo de Young pasando de 77.3 a 43.6 MPa, valor que podría verse afectado por un diámetro menor. La segunda razón, sería el aumento en el tamaño de los poros y el porcentaje de porosidad, lo que causa puntos de concentración de fuerzas y por lo tanto puntos de fractura, a pesar de que las muestras presentan un porcentaje de porosidad similar en el caso de PCL/QMMW este presenta un tamaño de poro mayor (ver Tabla 20) en comparación con la muestra de PCL/QLMW [72].

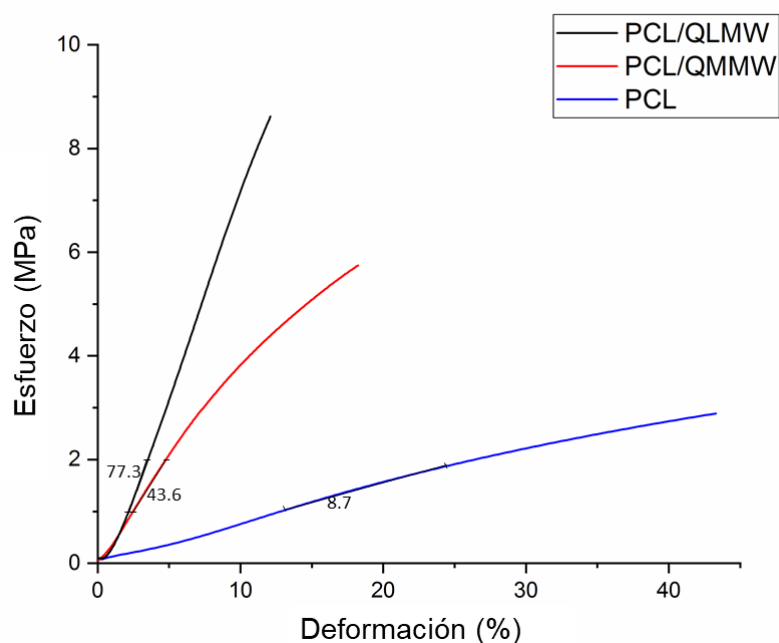


Figura 29. Gráfico de Esfuerzo (%) versus Deformación (MPa) para las muestras de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW. Con n=3.

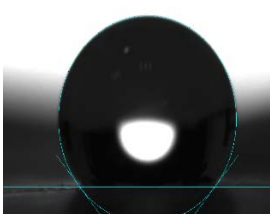
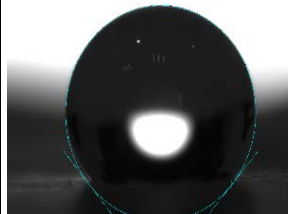
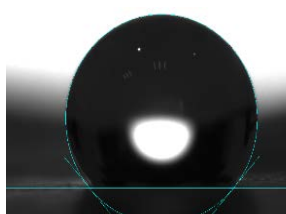
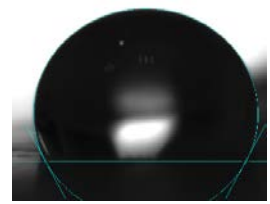


Finalmente, lo tercero, la diferencia en el módulo de Young podría atribuirse no solo a la presencia y distribución uniforme del quitosano en la matriz de PCL sino también a las posibles interacciones químicas o intermoleculares entre ambos compuestos, como se observa en la Tabla 21 donde se evidencia la disminución en el porcentaje de NH-primarias en las muestras compuestas dichos resultados indican que existen posibles interacciones químicas entre los grupos laterales del quitosano y de la PCL, lo que ocasiona una integración de los elementos que componen integran las membranas electrohiladas [63].

Con el fin de determinar la influencia de los datos sobre la variable respuesta, se realizó un análisis estadístico donde se comprobó que existe una significancia estadística entre las muestras de PCL, PCL/QMMW y PCL/QLMW respecto al módulo de Young, gracias a que se cumplió la afirmación de $p < \alpha$, con un valor de $p=0.00$; y al momento de realizar la prueba de normalidad y homocedasticidad se obtuvieron valores de p de 0.92 y 0.21, lo que confirma la hipótesis ($p > \alpha$) (ver Anexo 11).

c. Ángulo de contacto

En base a los ángulos de contacto obtenidos para las membranas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW (ver Figura 30 y 31) se observó que la PCL presentó un ángulo de contacto mayor comparado con los otros tipos de membranas, esto debido a la naturaleza hidrofóbica de la PCL que no permite formar puentes de unión con las moléculas de la solución de trabajo. Así mismo, se observa que la presencia de quitosano en las membranas compuestas, aumenta el ángulo de contacto, ocasionando que éstas presenten un comportamiento hidrofílico, lo cual se atribuye a la presencia de grupos -OH en las cadenas laterales del quitosano.

Basado en los resultados, se encontró que las membranas de PCL/QMMW presentan un menor ángulo de contacto en agua y plasma sanguíneo en comparación con las muestras de PCL/QLMW. Esto puede deberse a que la absorción del agua depende tanto de la porosidad como del contenido de quitosano, si bien la porosidad es similar entre las membranas, la muestra de PCL/QMMW presenta mayor tamaño de poro, lo que podría permitir que la gota permee con mayor facilidad la estructura del andamio. De otro lado, el posible acomodamiento estructural de las cadenas de quitosano sobre la estructura hidrofoba de PCL, da lugar a la obtención de una mayor área superficial hidrofílica que interactúa con los fluidos trabajados, a raíz de la obtención de estructuras con mayor porosidad [79].

<div style="text-align: right;">Tiempo</div> <div style="text-align: left;">Muestra</div>	Inicial: 0 s	Medio: 12.5 s	Final: 23 s
Membrana PCL	 $131.7^\circ \pm 0.141$	 $131.7^\circ \pm 0.123$	 $131.6^\circ \pm 0.070$
Membrana PCL/QLMW	 $122.6^\circ \pm 0.070$	 $82.0^\circ \pm 1.060$	 $80.1^\circ \pm 1.225$

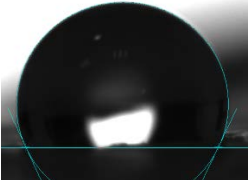
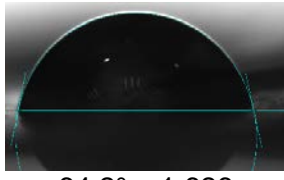
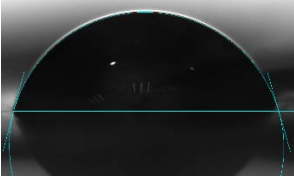
Membrana PCL/QMMW			
	$118.5^\circ \pm 0.683$	$64.2^\circ \pm 1.626$	$61.7^\circ \pm 1.461$

Figura 30. Resumen de los ángulos de contacto para las muestras de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW en interacción con agua. Con n=3.

Igualmente, la presencia de fibras de menor diámetro en las membranas de PCL/QMMW dan lugar a una mayor área de contacto con el medio que rodea al material. líquido-sólido más grande influenciado en gran manera por el tamaño de poro, lo que está permitiendo que aun al momento de interactuar con plasma presente el mismo comportamiento.

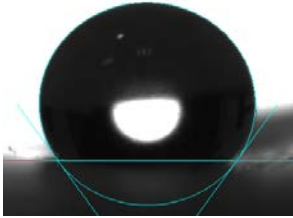
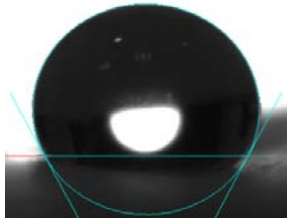
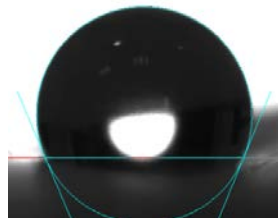
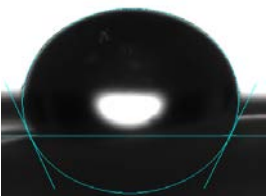
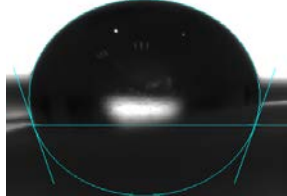
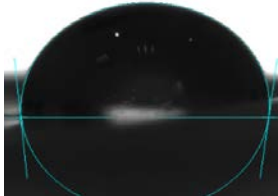
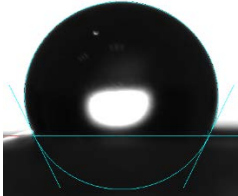
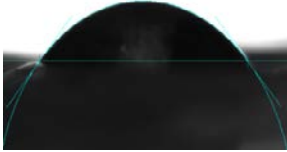

Tiempo	Inicial: 0s	Medio: 23.5 s	Final: 47 s
Muestra			
Membrana PCL	 $124.1^\circ \pm 0.141$	 $117.0^\circ \pm 0.212$	 $113.4^\circ \pm 0.424$
Membrana PCL/QLMW	 $115.8^\circ \pm 0.329$	 $103.8^\circ \pm 0.447$	 $90.4^\circ \pm 0.047$
Membrana PCL/QMMW	 $113.9^\circ \pm 0.07$	 $55.5^\circ \pm 0.013$	 $45.0^\circ \pm 0.329$

Figura 31. Resumen de los ángulos de contacto para las muestras PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW en interacción con plasma. Con n=3.

Al evaluar el comportamiento de las membranas con el plasma, se evidencio un comportamiento similar al encontrado para el agua, pese al presentarse una disminución

en los valores de ángulo de contacto. Dicho comportamiento podría estar relacionado con la presencia de grupos $-OH$ (ver Tabla 21) en las cadenas laterales del material compuesto las cuales interactúan con las estructuras proteicas presentes en el plasma.

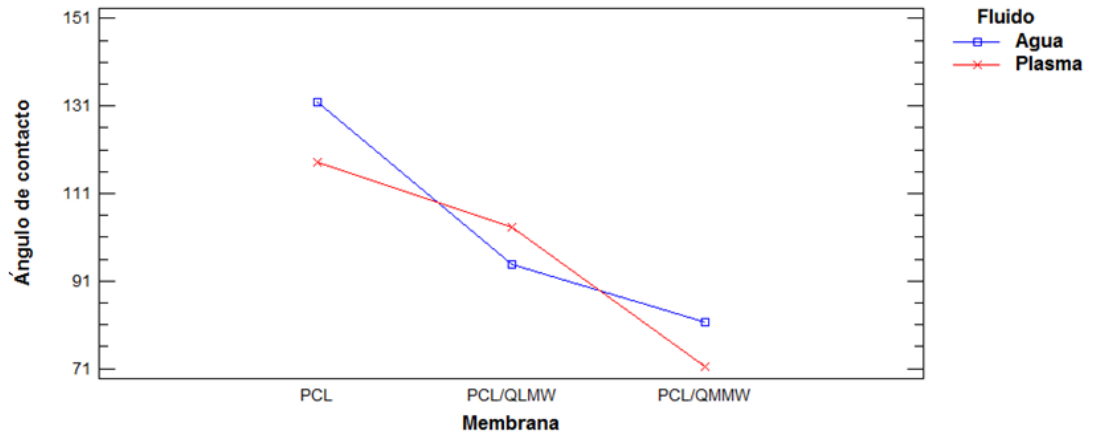


Figura 32. Gráfico de interacciones tipo de membrana y ángulo de contacto. Con $n=3$.

Como se observa en la Figura 32, se muestra el comportamiento hidrofílico de la membrana de PCL/QMMW en comparación a las otras membranas. Con el fin de determinar si hay una significancia estadística entre el biomaterial desarrollado, el ángulo de contacto y/o el fluido, se realiza un análisis estadístico mediante un Anova simple, en este se observa que no hay una significancia entre el ángulo de contacto y el fluido de interacción ya que se presenta un valor de $p=0.72$, contrario a la premisa de $p < \alpha$. Así mismo, al analizar estadísticamente el ángulo de contacto respecto a la membrana, se observó que a pesar de cumplir la premisa de $p < \alpha$, al momento de realizar la prueba de normalidad y de homocedasticidad se obtuvieron valores de p de 0.92 y 0.003, contrario a la premisa $p > \alpha$, con este se afirma que no hay una diferencia significativa entre los datos obtenidos (ver Anexo 12).

d. Pérdida de masa

La presencia de quitosano en las membranas compuestas dio lugar a una mayor pérdida de masa al interactuar con los tres tipos de medios trabajados, en comparación al comportamiento obtenido para las membranas de PCL. Dichos resultados están relacionados a la hidrofiliencia conferida por la presencia de quitosano en la estructura. A partir de lo anterior, se realizó el análisis por microscopia electrónica de barrido a las membranas en interacción por 4 horas en medio básico (Ver Figura 33), encontrando que para el caso de las muestras de PCL, la conservación de su estructura composicional con respecto a lo evidenciado para las membranas compuestas de PCL/QLMW y PCL/QMMW, presentan una menor degradación superficial atribuida a la ausencia de puntos de anclaje propiciado por los grupos $-OH$ en el quitosano, los cuales están presentes en los andamios compuestos.

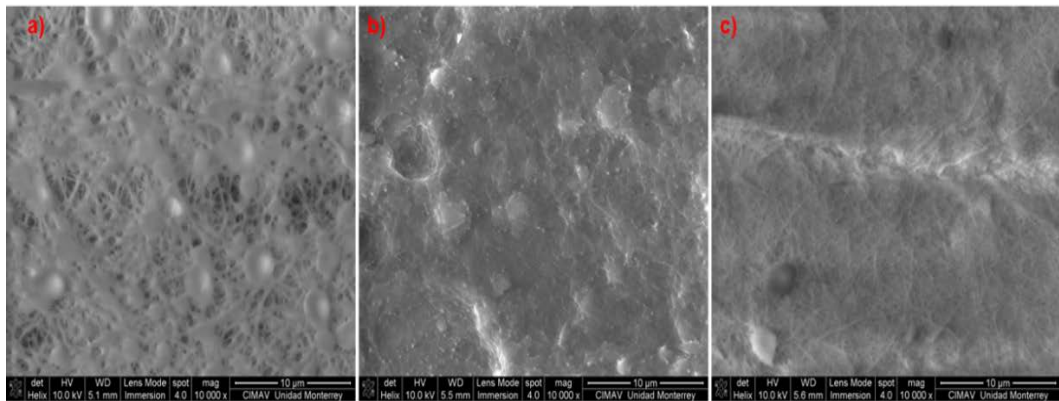


Figura 33. Micrografías de muestras que interactuaron en medio básico por un tiempo de 4h. a) PCL, b) PCL/QLMW, c) PCL/QMMW.

Lo anterior es corroborado en la Figura 34 donde se evidencia la pérdida de masa para las membranas compuestas aquí la membrana de PCL/QMMW exhibe la mayor pérdida de masa con un valor de 17.1 %, dicho comportamiento podría deberse a las cadenas de quitosano que presentan grupos hidrófilos como $-NH$, lo que le confiere una afinidad hacia los medios básicos. Este parámetro revela el nivel de interacción del medio con la membrana, ya que dicha biodegradabilidad depende en gran medida de la cantidad y la naturaleza de las interacciones intermoleculares de la cadena. Es importante mencionar que esta pérdida de masa en la membrana de PCL/QLMW puede deberse no solo a la interacción que surge mediante puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilos y grupos aminos, sino, al diámetro de fibra que por ser en escala nanométrica favorece una mayor área de interacción por aumentar el área superficial de contacto [80].

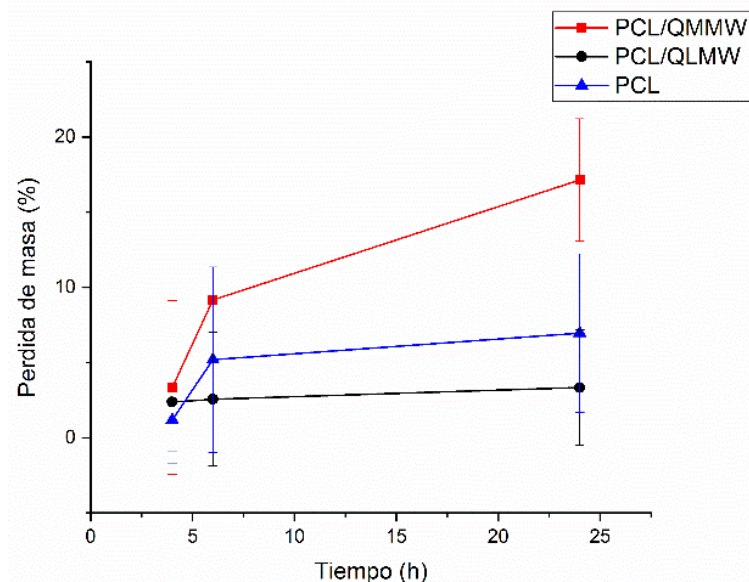


Figura 34. Gráfico de pérdida de masa versus tiempo para membranas electrohiladas de PCL, PCL/QMMW y PCL/QLMW en interacción con medios básicos. Con $n=3$.

Estudios realizados han comprobado que el quitosano con grados de desacetilación aproximado al 60% es soluble en condiciones de pH neutro, incluso investigaciones más recientes han demostrado que la solubilidad de este polisacárido en condiciones neutras de pH se logra mediante el control del grado de desacetilación y su peso molecular [81]. Dicho comportamiento se ve evidenciado en la Figura 35, en donde las membranas de PCL/QLMW y PCL/QMMW presentan una degradación en la superficie del material.

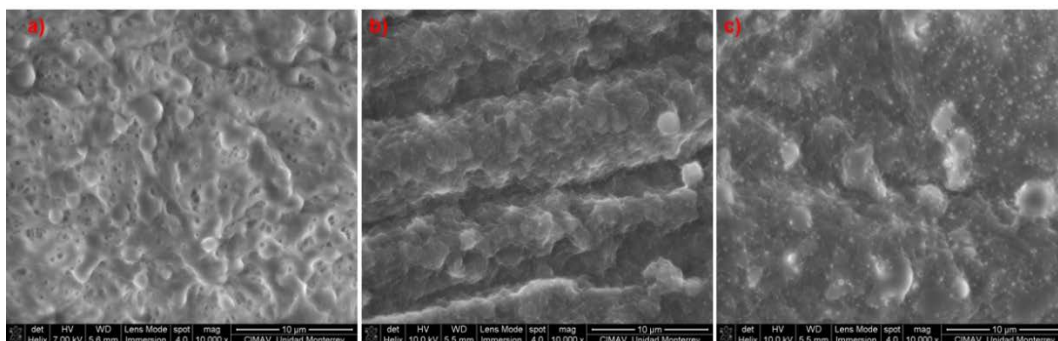


Figura 35. Micrografías de muestras que interactuaron en medio neutro por un tiempo de 4h. a) PCL, b) PCL/QLMW, c) PCL/QMMW.

De otro lado, en la Figura 36 se confirmó que para el caso de las membranas de PCL, estas presentaron un menor porcentaje de pérdida de masa y degradación en la superficie del andamio, ocasionado por el carácter hidrófobo del polímero sintético.

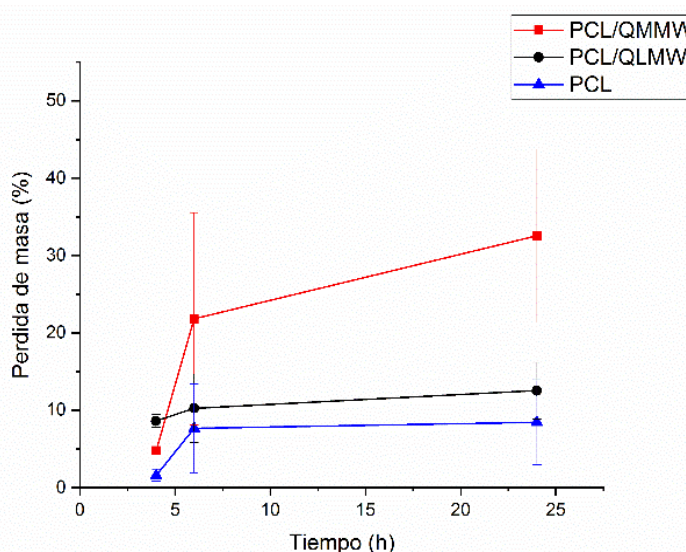


Figura 36. Gráfico de pérdida de masa versus tiempo para membranas electrohiladas de PCL, PCL/QMMW y PCL/QLMW en interacción con medios neutros. Con n=3.

Por otro lado, algunas investigaciones han demostrado que el quitosano con un grado de desacetilación aproximadamente de 20% son solubles en medios ácidos a un pH por debajo 6.5, lo que favorece la protonación de los grupos amino presentes en la cadena del polisacárido dando lugar a una alta densidad de cargas positivas [82]. Como se puede observar en la Figura 37, hay una alta pérdida de masa en las tres membranas

que se encuentran en interacción con el medio ácido, esto debido a que la PCL es soluble en dichos medios por los grupos carbonilos presentes en sus cadenas laterales, así mismo, el quitosano es soluble en presencia de un ácido debido a la protonación de los grupos amino presente en su estructura a lo largo de la cadena polimérica, lo cual genera un incremento en la polaridad y en las repulsiones electrostáticas.

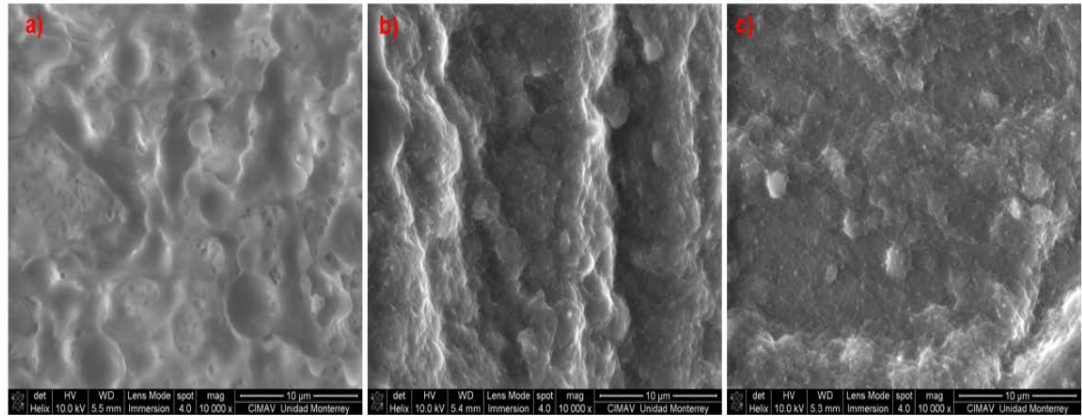


Figura 37. Micrografías de las muestras que interactuaron en medio ácido por un tiempo de 4h. a) PCL, b) PCL/QLMW, c) PCL/QMMW.

Como se observa en la Figura 37, la membrana de control presenta menor pérdida de masa en comparación con las membranas compuestas por quitosano, esto se puede atribuir a los sitios activos de anclaje asociado a los grupos funcionales presentes en la estructura, así como la disposición y tamaño de fibra que permite mayor área de contacto, favoreciendo la interacción molecular. De igual forma, se puede observar para la membrana de PCL/QLMW un comportamiento similar de pérdida de masa respecto a la membrana de PCL/QMMW, no obstante, los cambios pueden atribuirse a la presencia del grupo $-NH$ que favorece una protonación que incide en la integridad química de la membrana.

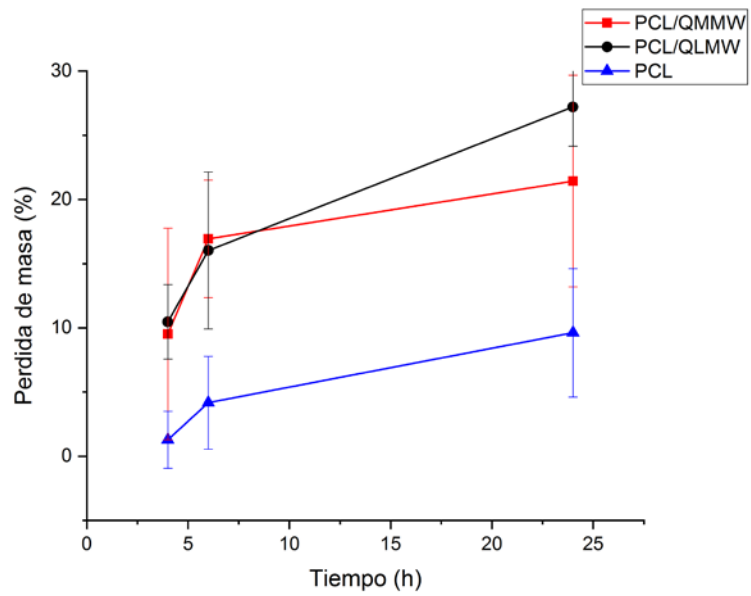


Figura 38. Gráfico de pérdida de masa versus tiempo para para membranas electrohiladas de PCL, PCL/QMMW y PCL/QLMW en interacción con medios ácidos. Con n=3.

3. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO HEMOSTÁTICO Y FUNCIONAL *IN VITRO* DEL BIOMATERIAL COMPUESTO.

a. Ensayo hemolítico

El ensayo de hemocompatibilidad de las membranas de PCL/QMMW y PCL/QLMW reveló un porcentaje hemólisis de 1.1 y 1.4 %, respectivamente (ver Figura 39). Aunque todas las muestras se pueden caracterizar como hemocompatibles, no hubo una diferencia estadística frente al parámetro de respuesta (porcentaje de hemólisis) y los factores (membranas y absorbancia). Estos resultados indican la naturaleza hemocompatible de las membranas desarrolladas según la norma ISO 10993-4, donde dicho porcentaje de hemólisis debe ser inferior al 5% para la aplicación de dispositivos médicos [83].

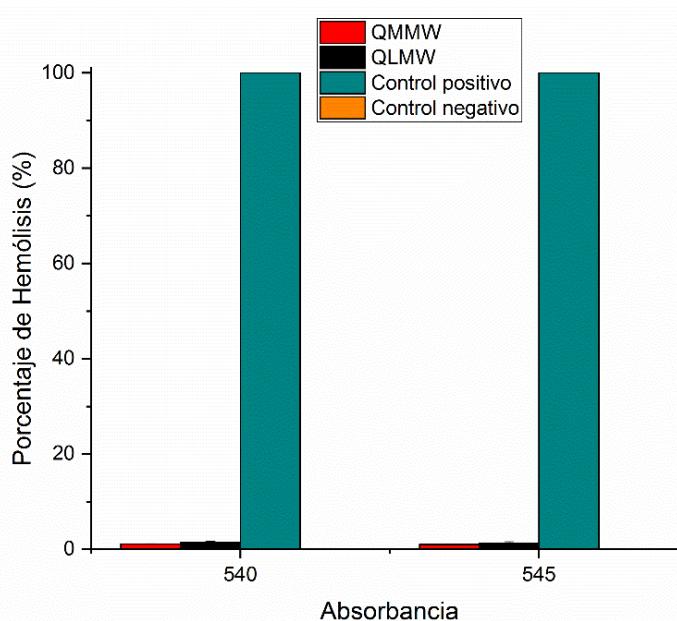


Figura 39. Gráfico de absorbancia versus porcentaje de hemólisis para muestras de PCL/QLMW y PCL/QMMW, control positivo y control negativo. Con n=3.

A partir de varias investigaciones, se ha reportado que el mecanismo de coagulación sanguíneo del quitosano es independiente de la cascada de coagulación y se basa en la interacción electrostática entre las membranas celulares de los eritrocitos que poseen una carga negativa y la densidad de carga policationica del quitosano. Esto produce una hemoconcentración de todos los factores de coagulación formando así coágulos sanguíneos estables que sellan los vasos de pequeño diámetro. No obstante, se presenta una diferencia en el porcentaje de hemólisis que puede ser atribuida a la diferencia de diámetros de fibras presente en las membranas de PCL/QLMW y PCL/QMMW, de esta manera a menores tamaños de fibras menor porcentaje de hemólisis, esto debido a que presenta un área de interacción mayor que permiten que las estructuras celulares se alojen e interactúen con una mayor disposición en el andamio [84] [85].

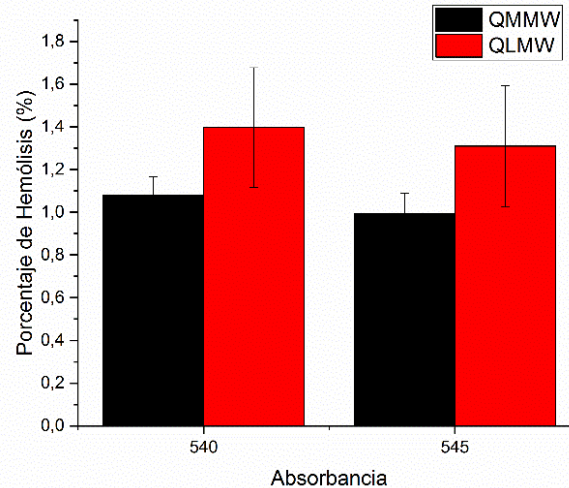


Figura 40. Grafica de absorbancia vs porcentaje de hemólisis para muestras de PCL/QLMW y PCL/QMMW. Con n=3.

De otro lado, al presentar la membrana de PCL/QMMW un porcentaje mayor de enlaces de OH, presenta mayor hidrofiliidad para interactuar con la sangre, por lo cual estos puntos de anclaje podrían estar mejorando el porcentaje de hemólisis a pesar de que no es significativo gracias a la facilidad de interacción de la solución con la membrana en estudio [86].

b. Ensayo de permeabilidad

Se ha reportado que la permeabilidad para membranas que han sido obtenidas mediante el proceso de electrohilado, depende de la capacidad de este para atribuir a la estructura una porosidad, que en este caso específico para las tres membranas es de alrededor del 30% y que al ser mayor permite tener una gran área de superficie por unidad de volumen de membrana. De igual forma, depende de los tamaños de poros, homogeneidad de la muestra y hidrofiliidad de la misma.

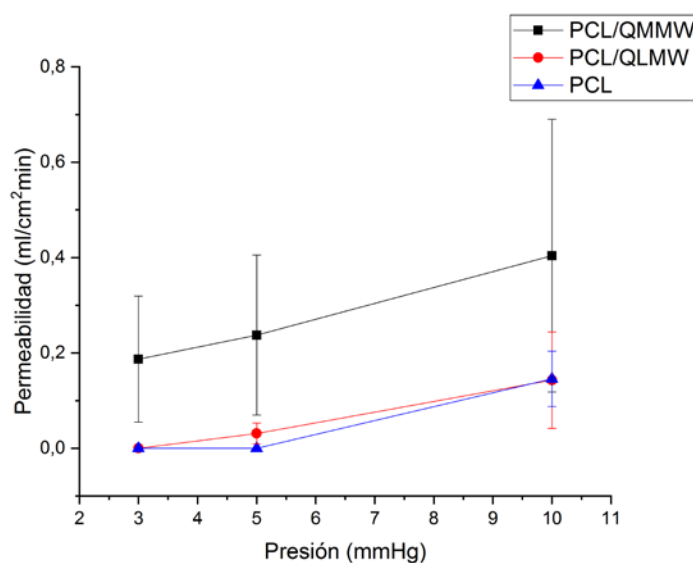


Figura 41. Gráfico de presión versus permeabilidad para membranas electrohiladas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW.

Como se observa en la Figura 41 la membrana de PCL es la que presenta menor permeabilidad, esto puede ser atribuido a que su naturaleza es hidrofóbica, lo que no permite una interacción con el agua al momento de estar en contacto, así mismo, al presentar diámetro de fibras mayores en comparación a las membranas de PCL/QLMW y PCL/QMMW, un mayor entrecruzamiento entres sus fibras, dificulta el paso de la solución por la red de fibras del andamio, por lo cual esta membrana solo fue permeable a una presión de 10 mmHg (ver Tabla 22). De otro lado, se evidenció que la membrana de PCL/QMMW fue la que presentó mayor permeabilidad en comparación con las membranas PCL/QLMW y PCL (ver Anexo 15), esto debido a su mayor tamaño de poro, diámetros de fibra y presencia de grupos –OH disponibles atribuidos a la presencia de quitosano en la muestra y al peso molecular [87].

Tabla 22. Resumen de los datos de permeabilidad para las membranas de PCL, PCL/QLMW y PCL/QMMW.

Presión (mmHg)	PCL (ml/cm ² min)	PCL/QLMW (ml/cm ² min)	PCL/QMMW (ml/cm ² min)
3	0	0	0.1871
5	0	0.0311	0.2374
10	0.1455	0.1428	0.4041

En general, la permeabilidad aumentó a medida que se incrementó la presión, esto gracias a que la fuerza que ejercía el agua sobre la fibra causaba un desplazamiento de esta que permitió que dicho fluido atravesara la membrana con mayor facilidad. Sin embargo, al realizar un análisis estadístico de estos datos, se encontró que no hay una significancia estadística entre la permeabilidad y la presión puesto que el valor de p es 0.30, es decir que es mayor a α . No obstante, si hay una significancia estadística entre la permeabilidad y el tipo de membrana en interacción, debido a que el valor de p en las pruebas de normalidad y homocedasticidad cumplen la premisa de $p > \alpha$. Esta relación y significancia estadística podría deberse a las características que confiere la estructura química de cada membrana, asociado a los puntos de anclajes activos del quitosano, de igual manera, la disposición, tamaño de fibras y porosidad en el andamio influyen en la deposición e interacción de la gota en la membrana y en la capacidad de permear esta por medio de los espacios interfibrilares [88].

CAPITULO 4: CONCLUSIONES

En esta investigación se logró el desarrollo de membranas electrohiladas compuestas de policaprolactona y quitosano de bajo y mediano peso molecular con diámetros de fibra entre 33 a 90 nm para la membrana de PCL/QMMW y 60 a 150 nm para membrana PCL/QLMW. Así mismo, al aumentar la concentración del quitosano en la mezcla polimérica, se obtuvieron fibras fusionadas con mayor homogeneidad, además, se identificó que el aumento de la distancia aguja-colector permite la evaporación completa del solvente y la obtención de fibras sin defectos. De igual forma, fue notorio que la viscosidad aparente de la solución influye notablemente en las características morfológicas de las membranas electrohiladas, actuando sobre el tamaño y la morfología de las fibras. Además, el aumento del voltaje aplicado influye en la disminución del diámetro promedio de la fibra, mientras que las viscosidades más altas afectan la estabilidad de la formación del cono de Taylor, lo que produce fibras de diámetros heterogéneos y bordes asimétricos.

Los resultados obtenidos en los espectros de FTIR revelan interacciones químicas entre los grupos amino, carboxilo e hidroxilo de los polímeros de la membrana, las cuales se atribuyen a los enlaces de hidrógeno formados entre los grupos amino del quitosano y carboxilo de la PCL, esto se corrobora con el aumento del porcentaje de área del grupo -OH presente en las muestras compuestas. Así mismo, se concluye que la mezcla de polímeros natural y sintético mejoran las propiedades mecánicas del polímero puro; además, la interacción intermolecular entre ambos componentes, la adición de quitosano en el material, el tamaño de poro y diámetro de fibra juegan un papel importante en el cambio del módulo de Young.

En el caso específico del ángulo de contacto, fue notable que la absorción del agua depende tanto del tamaño de poro como del contenido de quitosano en la estructura, de esta manera, la presencia de quitosano en las membranas de PCL aumentan la hidrofiliidad debido a la presencia de grupos -OH en sus cadenas, lo que conlleva a que membrana de PCL/QMMW presente menor ángulo de contacto en comparación a la de PCL y PCL/QLMW, debido a que tiene un mayor tamaño de poro y porcentaje de área. Así mismo, la presencia de proteínas en el plasma disminuye el ángulo de contacto debido a la interacción de estas con los sitios activos de la cadena polimérica de cada muestra.

Según lo anterior, estas condiciones tuvieron repercusiones en el comportamiento de la membrana de PCL/QMMW frente al porcentaje de pérdida de masa y a la permeabilidad de las otras membranas electrohiladas, ya que esta fue la que presentó una mayor pérdida de masa y permeabilidad. No obstante, es importante resaltar que medios ácidos influyen en un porcentaje de pérdida de masa mayor debido a la protonación de los grupos amino contenidos en la estructura del quitosano a lo largo de la cadena polimérica, lo cual genera un incremento en la polaridad y en las repulsiones electrostáticas.

Finalmente, se resalta la importancia del diámetro de fibra y la microarquitectura en las membranas compuestas electrohiladas, dado que estas mejoran la respuesta hemolítica. Además, las características morfológicas y fisicoquímicas, podrían favorecer

la activación de la cascada de coagulación debido a una mayor área superficial de interacción, y a la baja tasa de degradación del material para la aplicación biomédica propuesta en esta investigación.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

En el marco del proyecto mencionado se evaluó el comportamiento hemostático y funcional *in vitro* de una membrana electrohilada compuesta de policaprolactona y quitosano de bajo y medio peso molecular. Esta información fue soportada con las caracterizaciones fisicoquímicas, morfológicas, mecánicas, hemolíticas y funcionales de la membrana, lo que permitió verificar su posible aplicación en el control de hemorragias en capas externas de la piel y generar los siguientes productos:

Presentación oral en *15th International Topical Meeting on Nanostructured Materials and Nanotechnology (Nanotech 2019)*. “*Effect of the molecular weight of chitosan on the microarchitecture of electrospun membranes as possible hemostatic biomaterial*”. Maria Oviedo. Yuliet Montoya, Wilson Agudelo, John Bustamante. 21 octubre 2019, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Presentación de poster en *15th International Topical Meeting on Nanostructured Materials and Nanotechnology (Nanotech 2019)*. “*Effect of the molecular weight of chitosan on the microarchitecture of electrospun membranes as possible hemostatic biomaterial*”. Maria Oviedo. Yuliet Montoya, Wilson Agudelo, John Bustamante. 23 octubre 2019, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Pasantía de investigación en Centro de Investigación de materiales avanzados CIMAV (Monterrey- México) 30 de septiembre de 2019- 15 de noviembre de 2019.

Premio a estudiantes de pregrado destacados por su vinculación a la investigación, Medellín Investiga Revolución 4.0.

En escritura artículo científico sometido a revista indexada internacional. “*Development of a hemostatic biomaterial composed of a synthetic and natural polymer for possible applications in the control of external bleeding*”. María Camila Oviedo, Yuliet Montoya, Alejandra García, John Bustamante.

TRABAJO FUTURO

A partir de los resultados encontrados en esta investigación, en el futuro se pretende continuar con el desarrollo de membranas electrohiladas considerando el efecto del peso molecular del quitosano en la estructura de un material biocompuesto, con un diseño experimental factorial que involucre la fabricación de nuevas membranas cuyas porosidades se vean alternadas, con el fin de observar el cambio en la microarquitectura del material producido por la porosidad y el peso molecular. Así mismo, se podría complementar la determinación de las características fisicoquímicas de membranas compuestas electrohiladas, incluyendo pruebas de adhesividad y un ensayo de degradación con estructuras enzimáticas como la colagenasa, con el fin de ver la respuesta biodegradable del material a estructuras celulares presentes en el plasma y/o piel.

Finalmente, se debería estudiar la respuesta citocompatible del material evaluado en un modelo *in vitro* epitelial, el cual deberá emular disrupciones de las capas de la piel ocasionadas por heridas de los vasos periféricos. Además, de estudiar el comportamiento de la respuesta trombogénica y diferentes vías de señalización que se involucran en la activación de la cascada de coagulación.

ANEXOS

Anexo 1. Resumen de datos PCL/QLMW No.1 para cálculo de significancia estadística.

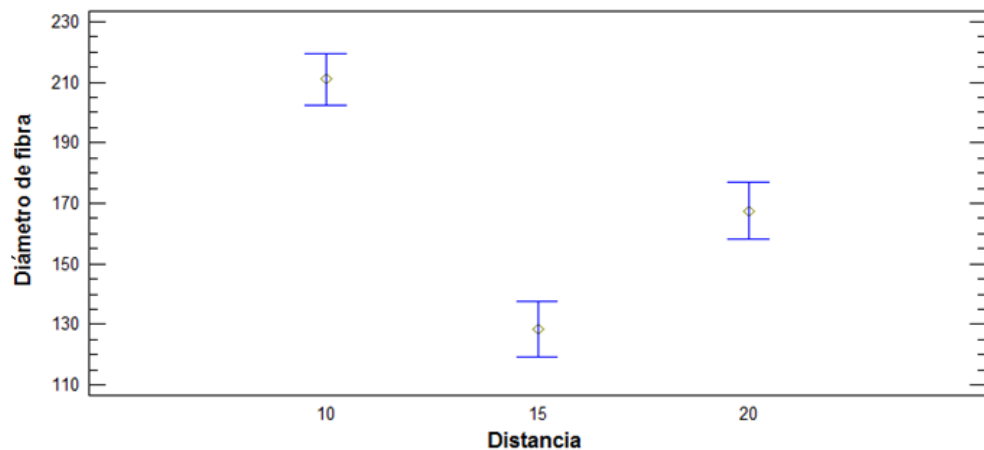
*Valor no calculado debido a descarte de la hipótesis

Análisis	Variables	Valor p	Prueba	Valor p
Simple	Diámetro de fibra-Distancia	0,000	Normalidad	0,000
			Homocedasticidad	---*
Simple	Diámetro de fibra-Voltaje	0,002	Normalidad	0,000
			Homocedasticidad	---*

Anexo 2. Resumen de datos PCL/QMMW No.1 para cálculo de significancia estadística.

*Valor no calculado debido a descarte de la hipótesis

Análisis	Variables	Valor p	Prueba	Valor p
Simple	Diámetro de fibra-Distancia	0,000	Normalidad	---*
			Homocedasticidad	0,000
Simple	Diámetro de fibra-Voltaje	0,202	Normalidad	---*
			Homocedasticidad	---*

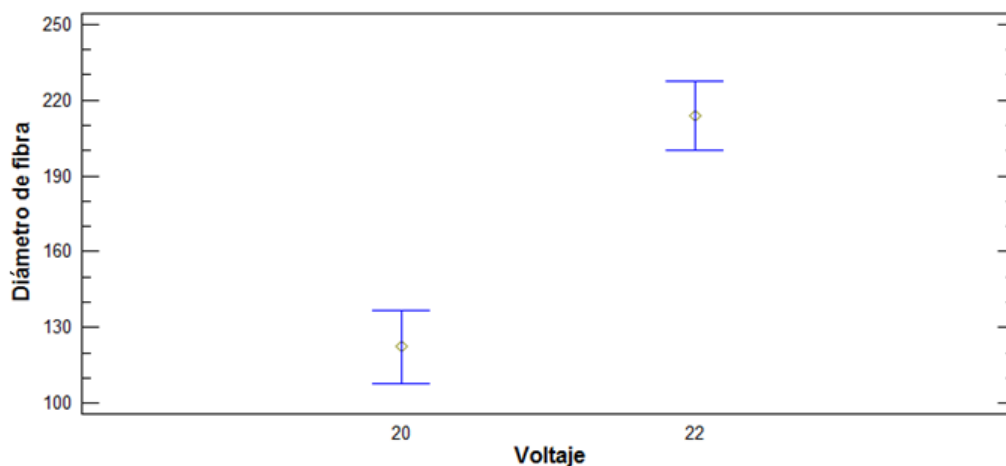


Anexo 3 .Gráfico de medias entre diámetro de fibra- Distancia para diseño de experimento No.1 PCL/QMMW. Con n=3.

Anexo 4. Resumen de datos PCL/QMMW No.2 para cálculo de significancia estadística.

*Valor no calculado debido a descarte de la hipótesis

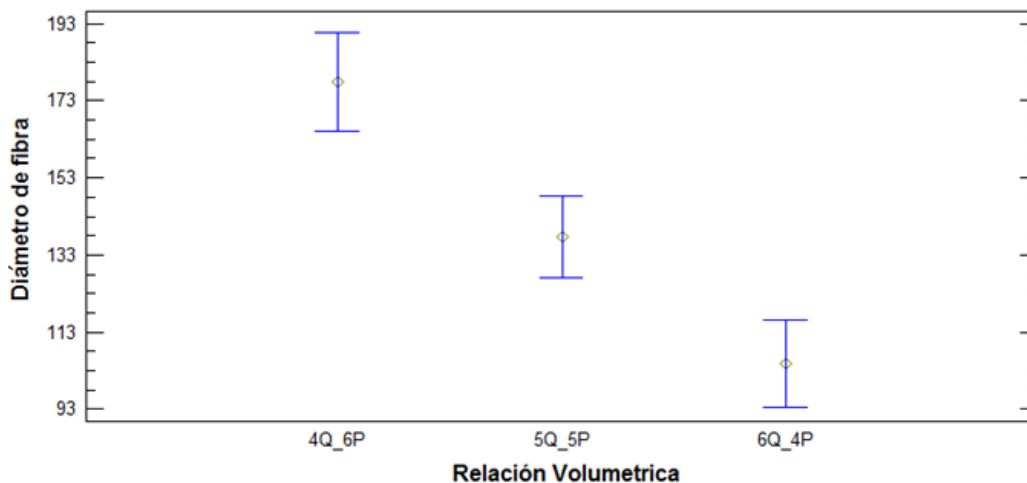
Análisis	Variables	Valor p	Prueba	Valor p
Simple	Diámetro de fibra-Distancia	0,000	Normalidad	---*
			Homocedasticidad	0,000
Simple	Diámetro de fibra-Voltaje	0,000	Normalidad	---*
			Homocedasticidad	0,000



Anexo 5. Gráfico de medias entre diámetro de fibra-Voltaje para diseño de experimento No. 2 PCL/QMMW. Con n=3.

Anexo 6. Resumen de datos PCL/QMMW No.3 para cálculo de significancia estadística.

Análisis	Variables	Valor p	Prueba	Valor p
Simple	Diámetro de fibra- Relación Volumétrica	0,000	Normalidad	0,000
			Homocedasticidad	0,069

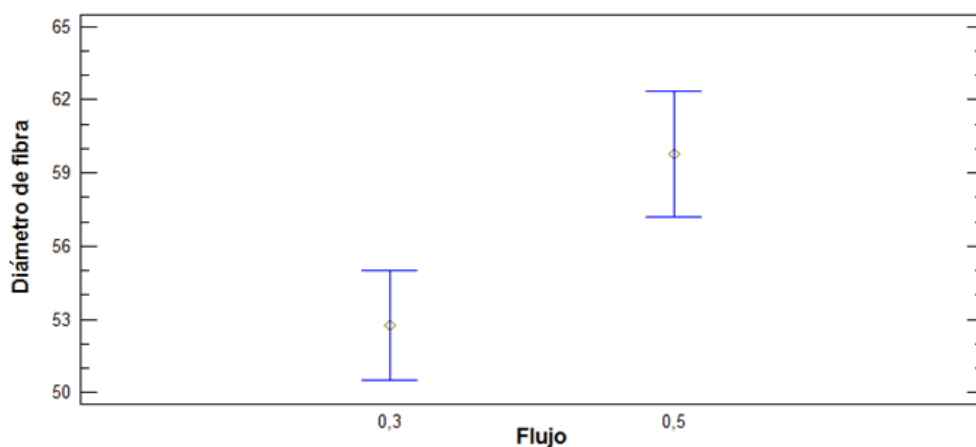


Anexo 7. Gráfico de medias entre diámetro de fibra-Voltaje para diseño de experimento No. 3 PCL/QMMW. Con n=3.

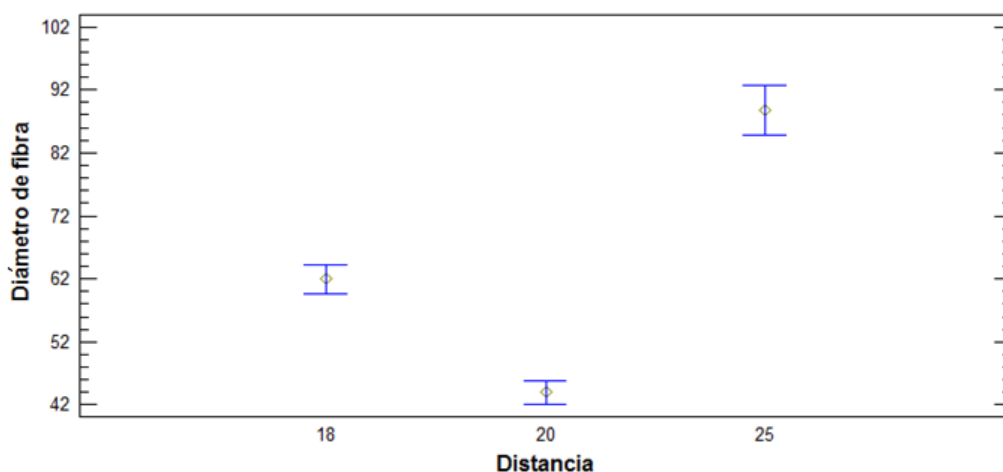
Anexo 8. Resumen de datos PCL/QLMW No.4 para cálculo de significancia estadística.

Análisis	Variables	Valor p	Prueba	Valor p
Simple		0,000	Normalidad	0,000

	Diámetro de fibra- Relación Volumétrica		Homocedasticidad	0,030
--	---	--	------------------	-------



Anexo 9. Gráfico de medias entre diámetro de fibra- Flujo para diseño de experimento No. 4 PCL/QMMW. Con n=3.



Anexo 10. Gráfico de medias entre diámetro de fibra- distancia para diseño de experimento No. 4 PCL/QMMW. Con n=3.

Anexo 11. Resumen de datos prueba mecánica para cálculo de significancia estadística.

Análisis	Variables	Valor p	Prueba	Valor p
Simple	Membrana- Módulo de Young	0,000	Normalidad	0,929
			Homocedasticidad	0,217

Anexo 12. Resumen de datos ángulo de contacto para cálculo de significancia estadística.

*Valor no calculado debido a descarte de la hipótesis.

Análisis	VARIABLES	Valor p	Prueba	Valor p
Simple	Ángulo de contacto-Membrana	0,000	Normalidad	0,944
			Homocedasticidad	0,003
Simple	Ángulo de contacto-Fluido	0,720	Normalidad	---*
			Homocedasticidad	---*

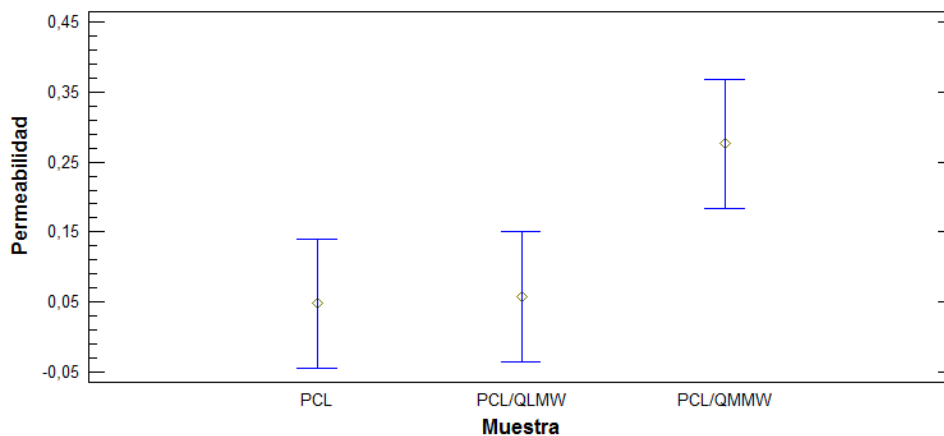
Anexo 13. Resumen de datos de pérdida de masa para cálculo de significancia estadística.

Análisis	VARIABLES	Valor p	Prueba	Valor p
Simple	Pérdida de masa-Membrana	0,027	Normalidad	0,159
			Homocedasticidad	0,083

Anexo 14. Resumen de datos permeabilidad para cálculo de significancia estadística.

*Valor no calculado debido a descarte de la hipótesis.

Análisis	VARIABLES	Valor p	Prueba	Valor p
Simple	Permeabilidad-Membrana	0,0392	Normalidad	0,507
			Homocedasticidad	0,6063
Simple	Permeabilidad-Presión	0,3069	Normalidad	---*
			Homocedasticidad	---*



Anexo 15. Gráfico de medias entre permeabilidad y muestra. Con n=3.

REFERENCIAS

- [1] D. Kauvar, R. Lefering, and C. Wade, "Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations.," *Trauma*, vol. 60, p. 11, 2006.
- [2] C. Mejia, J., Puentes, F., Ciro, J. and Morales, ""Hemorragia y trauma, avances del estudio CRASH2 en Colombia", " *Grup. CRASH2*, 2009.
- [3] R. Heckbert, S., Vedder, N., Hoffman, W., Winn, R., Hudson, L., Jurkovich, G., Copass, G., Harlan, M., Rice, J., and Maier, "Outcome after hemorrhagic shock in traumapatients.," *J. Trauma*, vol. 45, pp. 545–9, 1998.
- [4] R. Bellamy, ""The cause of death in convention a land warfare: implications for combat casualty care research", " *Mil. Med.*, vol. 149, pp. 55–62, 1998.
- [5] S. Zhang, J. Li, S. Chen, X. Zhang, J. Ma, and J. He, "Oxidized cellulose-based hemostatic materials," *Carbohydr. Polym.*, vol. 230, no. November 2019, p. 115585, 2020.
- [6] P. Rey, P. Dahhan, J. Leandri, and Z. Wierzbicki, "New fiber for ligament and tendon prosthesis.," *Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, vol. 31, pp. 305–307, 1985.
- [7] S. Gorgieva, L. Zemljic, S. Sternad, and V. Kokol, ""Textile-based biomaterials for surgical applications", " *Woodhead Publ. Ser. Biomater.*, pp. 179–215, 2018.
- [8] H. Services, "Use of International Standard ISO 10993-1 , " Biological evaluation of medical devices - Part 1 : Evaluation and testing within a risk management process " Guidance for Industry and Food and," 2016.
- [9] S. Gorgieva, L. F. Zemljić, S. Strnad, and V. Kokol, *Textile-based biomaterials for surgical applications*, vol. 9. 2018.
- [10] C. Zhang, F. Feng, and H. Zhang, "Trends in Food Science & Technology Emulsion electrospinning: Fundamentals, food applications and prospects," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 80, pp. 175–186, 2018.
- [11] A. Radisavljevic *et al.*, "Cefazolin-loaded polycaprolactone fibers produced via different electrospinning methods: Characterization, drug release and antibacterial effect," *J. Pharm. Sci.*, vol. 124, pp. 26–36, 2018.
- [12] E. Gaston, J. F. Fraser, Z. P. Xu, and H. T. Ta, "Nano- and micro-materials in the treatment of internal bleeding and uncontrolled hemorrhage," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 507–519, 2018.
- [13] Alonso G, ""Hemorragias", " *Traumatismos mecánicos abiertos*, 2018.
- [14] H. P. Barham and R. J. Harvey, 'Hemostatic Materials and Devices Hemostatic Sinus Skull base Materials Vasoconstrictors Topical Agents,' *Otolaryngol. Clin.*, vol. 49, no. 3, pp. 577–584, 2016.
- [15] E. Ramírez and B. Villa, "Revista de Actualización Clínica Hemorragias," *Revisa Actual. clínica*, vol. 36, pp. 1862–1866, 2013.
- [16] A. Quick, C. C, and T. C, ""The hemorrhagic diseases and the physiology of hemostasis", " *Springfield*, vol. 3, 1942.

- [17] W. Segers and E. Sharp, "Hemostatic agents. Eith special reference to thrombin, fibrinogen and absorbable cellulose" *Charles C. Thomas Publ. Springf.*, vol. 3, 1948.
- [18] A. Krogh, "The anatomy and physiology of capillaires" *Yale Univ. Press*, 1930.
- [19] R. D. Davenport, "Pathophysiology of hemolytic transfusion reactions," *Semin Hematol*, vol. 42, pp. 165–168, 2005.
- [20] Z. Tan *et al.*, "Materials Science & Engineering C Electrospun vein grafts with high cell infiltration for vascular tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 81, no. August, pp. 407–415, 2017.
- [21] C. Liu *et al.*, "Redox Biology Mechanism of faster NO scavenging by older stored red blood cells \$," *Redox Biol.*, vol. 2, pp. 211–219, 2014.
- [22] R. I. Litvinov and J. W. Weisel, "HHS Public Access," vol. 12, no. 1, pp. 176–183, 2018.
- [23] A. Jimenez, "El mecanismo de la hemostasis en neurocirugia" *Rev. la Fac. Med.*, vol. 17, no. 12, 1949.
- [24] A. Bharadwaz and A. C. Jayasuriya, "Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, p. 110698, 2020.
- [25] S. Podzimek and C. Republic, *Synthetic Polymers*, 3rd ed., no. June. Elsevier Inc., 2017.
- [26] M. Alizadeh-osgouei, Y. Li, and C. Wen, "Bioactive Materials A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications," *Bioact. Mater.*, vol. 4, no. September 2018, pp. 22–36, 2020.
- [27] E. Wyman, "Synthetic Polymers: Definition & Examples," *Study.com*, 2017. .
- [28] Chemistryexplained.com, "Synthetic Polymers - Chemistry Encyclopedia - structure, reaction, water, examples, number, name, molecule," 2018.
- [29] Chemistry LibreTexts, "Introduction to Synthetic Polymers," pp. 1–5, 2018.
- [30] J. Brode G.L., Koleske J.V., "Polycaprolactone and applications," *Macromol. Sci. Chem.*, vol. 6, no. 1109, 1972.
- [31] Pitt G., "Poly(a-caprolactone) and its copolymers.," *Biodegrad. Polym. as Drug Deliv. Syst.*, vol. 1, p. 71, 1990.
- [32] T. Khatti, H. Naderi-manesh, and S. Mehdi, "Materials Science & Engineering B Polypyrrole-Coated Polycaprolactone-Gelatin Conductive Nano fibers: Fabrication and Characterization," *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 250, no. July 2018, p. 114440, 2019.
- [33] Zhu Y., Gao,C.Y., Shen J.Y., "Biomaterials," *Bioamaterials*, vol. 12, p. 292, 2002.
- [34] M. Nur and T. Vasiljevic, "International Journal of Biological Macromolecules Can natural polymers assist in delivering insulin orally" *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 103, pp. 889–901, 2017.
- [35] A. Rafique, K. Zia, M. Zuber, and S. Tabasum, "International Journal of Biological

- Macromolecules Chitosan functionalized poly (vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications : A review,” *Int. J. Biol. Macromol*, vol. 87, pp. 141–154, 2016.
- [36] S. Ahmed, A. Ali, and J. Sheikh, “International Journal of Biological Macromolecules A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol*, vol. 116, pp. 849–862, 2018.
- [37] A. Usman, M. Zia, M. Zuber, S. Tabasum, and S. Rehman, “International Journal of Biological Macromolecules Chitin and chitosan based polyurethanes : A review of recent advances and prospective biomedical applications,” *Int. J. Biol. Macromol*, vol. 88, pp. 630–645, 2016.
- [38] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, and K. Caba, “International Journal of Biological Macromolecules Chitosan as a bioactive polymer: Processing , properties and applications,” *Int. J. Biol. Macromol*, vol. 105, pp. 1358–1368, 2017.
- [39] J. C. Kasper, G. Winter, and W. Friess, “European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Recent advances and further challenges in lyophilization,” *Eur. J. Pharm. Biopharm*, vol. 85, pp. 162–169, 2013.
- [40] C. Dexiang, “Fast-dissolving tablet vaccines for enteric and other mucosal pathogens made by lyophilization—a case study in vaccine stabilization,” *PepTalk*, vol. 1, pp. 9–3, 2012.
- [41] A. González, E., González A., Castro, R., Luna, H. and Chávez, “Implementación de la técnica de doble emulsión para la microencapsulación polimérica de moléculas iónicas.”, *Rev. Iberoam. ciencias*, vol. 2, no. 4, pp. 117–123, 2015.
- [42] D. E. Galindo R. S., Allémann E., Fessi H., “Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods.Pharm,” *Res.21*, vol. 8, pp. 1428-1439., 2004.
- [43] E. Simiand, “Preparación de andamios constituidos por hidrogeles de ácidos poli(glutámico) mediante la técnica de electrohilado,” 2015.
- [44] M. Tripathi, S. Parthasarathy, and P. K. Roy, “Mechanically robust polyurea nanofibers processed through electrospinning technique,” *Mater. Today Commun.*, vol. 22, no. November 2019, p. 100771, 2020.
- [45] H. Zong, X. Xia, Y. Liang, S. Dai, A. Alsaedi, and T. Hayat, “Designing function-oriented artificial nanomaterials and membranes via electrospinning and electrospaying techniques,” *Mater. Sci. Eng. C*, p. 1, 2017.
- [46] J. A. Bhushani, “Electrospinning and electrospaying techniques : Potential food based applications,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 38, no. 1, pp. 21–33, 2014.
- [47] D. Li and Y. Xia, “Electrospinnin of Nanofibers: Reinventing the Wheel,” *Adv. Mater.*, vol. 16, pp. 1151–1170, 2004.
- [48] J. Clavijo, “Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM),” *Universidad de América*, 2013.
- [49] E. Rivera, “Laboratorio de Pruebas Mecánicas” *UNAM*, 2019.
- [50] Chemistry, “Espectroscopia Infrarroja” *Chemistry*, 2014.

- [51] P. H. Salame, V. B. Pawade, and B. A. Bhanvase, "Characterization tools and techniques for nanomaterials," *Nanomater. Green Energy, Elsevier*, vol. 1, pp. 83–111, 2018.
- [52] Testex, "Ensayos de permeabilidad al agua e impermeabilización de tejidos," *Testex*, 2018. .
- [53] ASTM, "Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials," *Practice*, ASTM, 2013. .
- [54] Pública Ministerio de Salud., "Guía general para la evaluación y registro de equipos médicos implantables," 2007. .
- [55] L. Van Der Schueren, I. Steyaert, B. De Schoenmaker, and K. De Clerck, "Polycaprolactone / chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid / formic acid solvent system," *Carbohydr. Polym*, vol. 88, no. 4, pp. 1221–1226, 2012.
- [56] J. Nourmohammadi, A. Ghaee, and S. Hosseini, "Preparation and characterization of bioactive composite scaffolds from polycaprolactone nanofibers-chitosan-oxidized starch for bone regeneration," *Carbohydr. Polym*, vol. 138, pp. 172–179, 2016.
- [57] L. W. Chan, C. Hwa, X. Wang, S. H. Pun, N. J. White, and T. Hee, "Acta Biomaterialia PolySTAT-modified chitosan gauzes for improved hemostasis in external hemorrhage," *Acta Biomater*, vol. 31, pp. 178–185, 2016.
- [58] J. Park, K. Kyung, K. Tsukada, S. Kim, and S. Shiratori, "Biodegradable polycaprolactone nanofibres with b-chitosan and calcium carbonate produce a hemostatic effect," *Polym. (Guildf)*, vol. 123, pp. 194–202, 2017.
- [59] B. Poornima and P. S. Korrapati, "Fabrication of chitosan-polycaprolactone composite nanofibrous scaffold for simultaneous delivery of ferulic acid and resveratrol," *Carbohydr. Polym*, vol. 157, pp. 1741–1749, 2017.
- [60] O. Urbanek, P. Sajkiewicz, and F. Pierini, "The effect of polarity in the electrospinning process on PCL / chitosan nano fibres structure, properties and efficiency of surface modification," vol. 124, pp. 168–175, 2017.
- [61] M. Fadaie, E. Mirzaei, B. Geramizadeh, and Z. Asvar, "Incorporation of nanofibrillated chitosan into electrospun PCL nanofibers makes scaffolds with enhanced mechanical and biological properties," vol. 199, pp. 628–640, 2018.
- [62] K. N. Clayton, J. W. Salameh, S. T. Wereley, and T. L. Kinzer-Ursem, "Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry," *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 5, pp. 1–14, 2016.
- [63] M. Fadaie, E. Mirzaei, B. Geramizadeh, and Z. Asvar, "Incorporation of nanofibrillated chitosan into electrospun PCL nanofibers makes scaffolds with enhanced mechanical and biological properties," *Carbohydr. Polym.*, vol. 199, pp. 628–640, 2018.
- [64] R. Nirmala, B. W. Il, R. Navamathavan, M. H. El-Newehy, and H. Y. Kim, "Preparation and characterizations of anisotropic chitosan nanofibers via electrospinning," *Macromol. Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 345–350, 2011.
- [65] Electrospin Tech, "Molécula / movimiento iónico y organización en electrohilado," *Electrospin Tech*, pp. 1–4, 2016.

- [66] Z. Li and C. Wang, "Effects of Working Parameters on Electrospinning", in *One-Dimensional nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 15–28, 2013.
- [67] R. Merchante, E. Giménez, and O. Sahuquillo, "Análisis y optimización de parámetros de proceso para la obtención de fibras poliméricas tipo core-shell mediante electrospinning coaxial," Universidad Politecnica de Valencia, 2016.
- [68] K. Kalwar, W. Sun, D. Li, X. Zhang, and D. Shan, "Coaxial electrospinning of polycaprolactone chitosan: Characterization and silver nanoparticles incorporation for antibacterial activity," vol. 107, pp. 87–92, 2016.
- [69] R. S, "An introduction to electrospinning and nanofibers:," *World Sci.*, vol. 1, pp. 1–6, 2005.
- [70] Y. T. Jia, J. Gong, X. H. Gu, H. Y. Kim, J. Dong, and X. Y. Shen, "Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method," *Carbohydr. Polym.*, vol. 67, no. 3, pp. 403–409, 2007.
- [71] K. De Vrieze, S., Westbroek, P., Van Camp, T., De Clerck, "Solvent system for steady state electrospinning of polyamide," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 115, pp. 837–842, 2010.
- [72] Á. P. Sánchez Cepeda, "Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina," *Cienc. En Desarro.*, vol. 7, no. 2, p. 133, 2016.
- [73] Y. Wan, X. Lu, S. Dalai, and J. Zhang, "Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes," *Thermochim. Acta*, vol. 487, no. 1–2, pp. 33–38, 2009.
- [74] Y. H. Wang, T. H. Young, and T. J. Wang, "Investigating the effect of chitosan/polycaprolactone blends in differentiation of corneal endothelial cells and extracellular matrix compositions," *Exp. Eye Res.*, vol. 185, no. 252, p. 107679, 2019.
- [75] I. K. D. Dimzon and T. P. Knepper, "Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 939–945, 2015.
- [76] A. S. Y. Chew, T. C. Hufnagel, C. T. Lim and K. W. Leong, "Mechanical properties of single electrospun drug-encapsulated nanofibres", *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 3880–3891, 2006.
- [77] R. C. Hibbeter, *Mecánica de materiales*, 7a ed. Person Educación, 2006.
- [78] G. Martínez *et al.*, "Estudio de una mezcla binaria biodegradable: policaprolactona/quitina," *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 9, no. 3, pp. 313–321, 2008.
- [79] J. Wu *et al.*, "Incorporation of protein-loaded microspheres into chitosan-polycaprolactone scaffolds for controlled release," *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 2, pp. 1048–1054, 2011.
- [80] R. B. Macea, C. F. De Hoyos, and Y. G. Montes, "Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano / lactosuero Synthesis and film properties of chitosan and whey," vol. 25, no. 1, pp. 58–69, 2015.

- [81] Sannan T., Kuda K., Iwakura Y., "Chitosan," *Macromol. Chem*, vol. 177, p. 36, 2005.
- [82] Domard A., "Chitosan," *Int. J. Biol. Macromol*, 2007.
- [83] P. Sasmal and P. Datta, "Tranexamic acid-loaded chitosan electrospun nanofibers as drug delivery system for hemorrhage control applications," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 52, no. April, pp. 559–567, 2019.
- [84] C. N. Sambasivan, S. D. Cho, K. A. Zink, J. A. Differding, and M. A. Schreiber, "A highly porous silica and chitosan-based hemostatic dressing is superior in controlling hemorrhage in a severe groin injury model in swine," *Am. J. Surg.*, vol. 197, no. 5, pp. 576–580, 2009.
- [85] B. C. Schmid, G. A. Rezniczek, N. Rolf, G. Saade, G. Gebauer, and H. Maul, "Uterine packing with chitosan-covered gauze for control of postpartum hemorrhage," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 209, no. 3, pp. 225.e1-225.e5, 2013.
- [86] X. Du *et al.*, "Injectable hydrogel composed of hydrophobically modified chitosan/oxidized-dextran for wound healing," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, no. March, p. 109930, 2019.
- [87] Y. Wang, T. Young, and T. Wang, "Investigating the effect of chitosan / polycaprolactone blends in differentiation of corneal endothelial cells and extracellular matrix compositions," *Exp. Eye Res.*, vol. 185, no. 252, p. 107679, 2019.
- [88] Y. Tao, L. Qian, and J. Xie, "Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*," *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 2, pp. 969–974, 2011.