

**Universidad Autónoma de Ciudad Juárez  
Instituto de Ingeniería y Tecnología  
Departamento de Física y Matemáticas**



**DESARROLLO DE UN HIDROGEL DE QUERATINA-SÍLICE  
COMO POSIBLE APLICACIÓN BIOMÉDICA.**

**Disertación que presenta**

**Enrique Villegas Serralta**

**Como requisito parcial para obtener el grado de**

**Maestro(a) en Ciencias de los Materiales**

**Ciudad Juárez, Chihuahua, 11/19**







**Universidad Autónoma de Ciudad Juárez**  
**Instituto de Ingeniería y Tecnología**  
**Departamento de Física y Matemáticas**



**DESARROLLO DE UN HIDROGEL DE QUERATINA-SÍLICE  
COMO POSIBLE APLICACIÓN BIOMÉDICA.**

**Disertación que presenta**

**Enrique Villegas Serralta**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
Maestro(a) en Ciencias de los Materiales**

**Director de Tesis  
Dra. Perla García Casillas**

**Ciudad Juárez, Chihuahua, 11/19**

DR. HÉCTOR CAMACHO MONTES

COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS MATERIALES

PRESENTE.-

Los que suscribimos, integrantes del Comité Tutorial nombrado para dar seguimiento y examinar el manuscrito de la Tesis titulada:

**“DESARROLLO DE UN HIDROGEL DE QUERATINA-SÍLICE COMO POSIBLE APLICACIÓN BIOMÉDICA”.**

que presenta el candidato al Grado de Maestro en Ciencias de los Materiales,

**El Ing. Enrique Villegas Serralta**

reunidos para tal efecto, después de intercambiar opiniones manifestamos nuestra aceptación a dicho trabajo en virtud de que satisface los requerimientos necesarios para su presentación, ya que se han realizado las correcciones que cada uno en particular consideró pertinentes.

*A t e n t a m e n t e*

**“EL COMITE TUTORIAL DE TESIS”**

---

*Presidente*

*Dra. Santos Adriana Martel Estrada*

---

*Secretario*

*Dr. Carlos Alberto Martínez Pérez*

---

*Vocal*

*Dr. Calos Velasco Santos*

c.c. Jefe del Departamento de Física y Matemáticas

c.c. Coordinador del programa de Maestría en Ciencias de los Materiales

## **DEDICATORIA**

A mis padres por su entrega y sacrificio a lo largo de mi vida

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a esta instancia y bendecirme en todo momento.

A la Dra. Perla García Casillas, por ser mi guía en todo momento, por apoyarme y dedicar su tiempo y esfuerzo viendo que creciera en el ámbito personal y profesional, le agradezco por todas las oportunidades que me dio a lo largo de estos dos años, es sin duda una bendición en mi vida.

A mi novia Guillermina Álvarez que es un pilar en mi vida, siempre siendo fundamental en cada paso que doy, le agradezco su amor, paciencia y apoyo en todo momento.

A mi familia por siempre apoyarme y aconsejarme en todo momento a lo largo de estos dos años, en especial a mis padres y mi hermano Israel.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo con la beca de mantención que recibí ya que fue clave para el elaboración de este proyecto.

A la Dra. Claudia Alejandra Rodríguez por su apoyo a lo largo de estos dos años, siendo de gran ayuda en momentos clave durante mi posgrado, siempre le estaré eternamente agradecido.

A Nidia por ser una buena amiga y tesista, siendo parte fundamental a lo largo del desarrollo de este proyecto le agradezco su paciencia y dedicación.

A M.C Jorge Roacho, por su invaluable guía en las pruebas de hemotoxicidad y sacarme siempre una sonrisa.

Al Dr. Christian Chapa y a mis compañeros de grupo de investigación Nanomedicina (Sofia, Cinthia, Víctor, Jazzely, Itzel, Ely) por su apoyo y enseñanza durante esta investigación además de los buenos momentos que pasamos juntos.

A mis compañeros de maestría Mario y Monserrat por su amistad y compañerismo a lo largo de la maestría.

Al Dr. Joaquín García y a Hortensia Reyes por su ayuda y disposición para el uso de equipos en esta investigación

## RESUMEN

Las plumas de ave poseen grandes cantidades de queratina a pesar que son consideradas uno de los mayores desechos dentro de la industria avícola. No obstante es una base más sencilla para la obtención de extracto de proteína a diferencia de otro tipo de fuentes como cabello, y el bajo costo de estos desechos lo hace muy atractivo para una aplicación biomédica. La queratina fue extraída a partir de la metodología de Kakkar. Hidrogeles queratina-sílice (HQS) fueron sintetizados usando tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor mediante el método Sol-Gel a diferentes relaciones ratio of 1:1, 1:4 and 1:7 (p/p). HQS fueron caracterizados mediante espectroscopia FTIR, Raman, MEB, EDS, pruebas de hinchamiento y ensayos de hemólisis. Los espectros infrarrojos mostraron 3 bandas en específico: Amida A (3385-3337  $\text{cm}^{-1}$ ) Amida I (1644-1640 $\text{cm}^{-1}$ ) TEOS (1087-1086 $\text{cm}^{-1}$ ), ambas bandas amida corresponden a la estructura de la queratina mientras que la banda de TEOS se atribuye a enlaces Si-O-Si. A pesar que el espectro no muestra un enlace covalente entre la queratina y el sílice, esto da a entender, que existe una interacción física entre ellos. Además las micrográficas MEB exhiben una microestructura porosa, las pruebas de hinchamiento demuestran una capacidad de absorción de ambos geles con 126% para la relación 1:4 y 113% para la relación 1:7, por último los ensayos de demuestran un bajo porcentaje de hemólisis por lo que da indicios de biocompatibilidad del material. En conjunto estos resultados dejan entrever que este tipo de materiales puede ser usado para la fabricación de hidrogeles.

**(Palabras clave:** Queratina, Sílice, Hidrogeles, Sol-Gel, Biopolímeros, Proteínas)

## ABSTRACT

Feather keratins are derived from chicken feathers, which are considered to be the major waste in the poultry industry, nevertheless the quality of feather keratin is easier to control than that of human hair keratin due to human hair perming and colouring-dyeing (Wang et al., 2017) and low cost source therefore the development of feather keratin for biomedical applications is very attractive. Hydrolyzed Keratin was extracted according to Kakkar methodology. Keratin-Silica hydrogels (KSH) were fabricated using tetraethyl orthosilicate (TEOS) as a precursor by Sol-Gel method, with a ratio of 1:1, 1:4 and 1:7 (w/w). KSH were characterized using FTIR, Raman spectroscopy, SEM, EDS, swelling tests and hemolysis assays. FTIR spectra showed 3 specific bands: Amide A (3385-3337 cm<sup>-1</sup>) Amide I (1644-1640cm<sup>-1</sup>) TEOS (1087-1086cm<sup>-1</sup>), both amides corresponding to the keratin structure, TEOS band corresponding to Si-O-Si bonds. Moreover the spectra's no indicate in particular any covalent bond between keratin and silica, hence it seems to be a physical interaction. Furthermore SEM images exhibit remarkably porous architecture, swelling studies showed the relationship between ratio and swelled percentage with 126% for ratio 1:4 and 113% for 1:7, and hemolysis assays demonstrate a low percentage of hemolysis hence biocompatibility of this composite. Collectively these results showed promising properties of KSH for being employed as materials for producing hydrogels.

**(Key words:** Keratin, Silica, Hydrogels, Sol-Gel, Biopolymers, Protein)

## ÍNDICE GENERAL

<b>CAPITULO I</b> .....	17
<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	17
<b>CAPITULO II</b> .....	19
<b>2.1 ANTECEDENTES</b> .....	19
<b>2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	22
<b>2.3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>2.4 HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>2.5 OBJETIVOS</b> .....	25
<b>2.5.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	25
<b>2.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	25
<b>CAPITULO III</b> .....	26
<b>3.1 MARCO TEÓRICO</b> .....	26
<b>3.1.1 HIDROGELES</b> .....	26
<b>3.1.2 BIOPOLÍMEROS</b> .....	31
<b>3.1.3 SÍNTESIS DE HIDROGELES</b> .....	35
<b>3.1.4 MÉTODO SOL-GEL</b> .....	41
<b>3.1.5 DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS</b> .....	42
<b>3.1.6 SECRECIONES MAMARIAS</b> .....	44
<b>3.1.7 BIOCOMPATIBILIDAD</b> .....	46
<b>3.1.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN</b> .....	50
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	54
<b>4.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	54
<b>4.1.1 LISTA DE MATERIALES</b> .....	54
<b>4.1.2 OBTENCIÓN EXTRACTO DE QUERATINA</b> .....	54
<b>4.1.3 SÍNTESIS HIDROGELES QUERATINA-SÍLICE</b> .....	56

4.1.3 CARACTERIZACIÓN HIDROGELES QUERATINA-SÍLICE .....	57
4.1.4 PRUEBA DE HINCHAMIENTO .....	57
4.1.5 PRUEBAS DE DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA .....	58
4.1.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS .....	59
4.1.7 ENSAYO DE HEMOLISIS .....	59
4.1.8 ENSAYO DE HEMOLISIS EXTENDIDO .....	62
<b>CAPÍTULO V</b> .....	63
5.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	63
5.1.1 EXTRACTO DE QUERATINA Y BIOFIBRA .....	63
5.1.2 GELES QUERATINA SÍLICE 1:4 Y 1:7 .....	71
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	96
6.1 CONCLUSIONES .....	96
6.2 RECOMENDACIONES .....	98
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	99
<b>ANEXOS</b> .....	108

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Hidrogeles con polímeros naturales	29
2	Hidrogeles con polímeros sintéticos	30
3	Clasificación de hemotoxicidad acorde al porcentaje de hemolisis	49
4	Lista de reactivos empleados para la extracción de la queratina	55
5	Diseño de experimentos relación hidrogeles queratina-sílice	56
6	Diseño experimental pruebas de degradación hidrogeles queratina-sílice.	59
7	Lista de reactivos para preparación solución Alsever	60
8	Porcentaje de degradación de los hidrogeles queratina-sílice a relaciones de 1:4 y 1:7.	83
9	Análisis de varianza (ANOVA) de las pruebas de degradación hidrolítica	84
10	Porcentajes de hemolisis hidrogeles 0:1, 1:4 y 1:7	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de un hidrogel antes y después de un hinchamiento.....	27
Figura 2 Organigrama con las diferentes clasificaciones de los biopolímeros.....	32
Figura 3 Estructura de la queratina.....	34
Figura 4 a) Hidrogel entrecruzado físicamente, b) Hidrogel entrecruzado químicamente .....	36
Figura 5 Esquema de entrecruzamiento físico de un hidrogel de PVA usando ciclos de congelamiento-descongelamiento.....	37
Figura 6 Estructura del sílice.....	40
Figura 7 Diferente tipos de grupos silanol presentes en la estructura de la sílice...	40
Figura 8 Formación del entrecruzamiento químico entre dos cadenas poliméricas de PVA y moléculas de sílice.....	41
Figura 9 Esquema de degradación hidrolítica.....	43
Figura 10 Ilustración de secreción anormal en el pezón y estructura general de las glándulas mamarias.....	45
Figura 11 Ilustración de secreción anormal en el pezón y estructura general de las glándulas mamarias.....	46

Figura 12 Esquema de la hemolisis de los eritrocitos.....	<b>47</b>
Figura 13 Esquema ensayo hemolisis de acuerdo a las normas ISO-10993-4 y ASTM 756-17.....	<b>49</b>
Figura 14 Diferentes tipos de señales arrojadas por el material al momento de que el incide el haz de electrones.....	<b>51</b>
Figura 15 Esquema general de un microscopio electrónico de barrido/SEM.....	<b>51</b>
Figura 16 Proceso de adquisición de señal espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	<b>53</b>
Figura 17 Esquema general de prueba de degradación hidrolítica a hidrogeles de queratina-sílice con relaciones de 1:4 y 1:7.....	<b>58</b>
Figura 18. Esquema general de ensayos de hemolisis.....	<b>61</b>
Figura 19 Espectros FTIR de la A) biofibra pluma de gallo y B) extracto de queratina.....	<b>65</b>
Figura 20 Espectros FTIR de la A) biofibra pluma de gallo y B) extracto de queratina analizados en la región de $1200\text{ cm}^{-1}$ a $600\text{ cm}^{-1}$ .....	<b>66</b>
Figura. 21 Micrografías de biofibra pluma de gallo y extracto de queratina.....	<b>68</b>
Figura 22 EDS de biofibra de pluma de gallo.....	<b>69</b>
Figura 23 EDS de extracto de queratina.....	<b>70</b>
Figura 24 Espectros FTIR del A) Hidrogel queratina-sílice 1:7 y B) Hidrogel queratina-sílice 1:4.....	<b>72</b>
Figura 25 Espectros FTIR hidrogel sílice relación 0:1.....	<b>73</b>

Figura 26 Micrografías Hidrogeles queratina-sílice relación 1:7 y 1:4.....	<b>75</b>
Figura 27 Micrografías Hidrogeles queratina-sílice relación 0:1.....	<b>76</b>
Figura 28. EDS de Hidrogel de sílice-queratina a relación de 1:7.....	<b>78</b>
Figura 29. EDS de Hidrogel de sílice-queratina a relación de 1:4.....	<b>78</b>
Figura 30. EDS de Hidrogel de sílice a relación de 0:1.....	<b>79</b>
Figura 31. Graficas de hinchamiento hidrogeles queratina-sílice (1:4 y 1:7) con respecto al tiempo.....	<b>80</b>
Figura 32. Graficas de pérdida de peso hidrogeles queratina-sílice (1:4 y 1:7) con respecto al tiempo.....	<b>81</b>
Figura 33. Primera derivada de graficas resultantes pérdida de peso hidrogeles queratina-sílice.....	<b>82</b>
Figura 34 Grafica pérdida de peso a lo largo de la prueba de degradación hidrolítica	<b>85</b>
Figura 35. a) Grafica degradación hidrolítica hidrogel queratina-sílice 1:4 a un pH 6.8.....	<b>86</b>
Figura 36. Espectros FTIR de los hidrogeles queratina-sílice 1:4 a pH de 5.4 y 6.8	<b>88</b>
Figura 37. Espectros FTIR de los hidrogeles queratina-sílice 1:7 a pH de 5.4 y 6.8	<b>89</b>
Figura 38. Resultados de las pruebas de hemolisis a lo hidrogeles 1:4 y 1:7.....	<b>90</b>
Figura 39. Resultados de las pruebas de hemolisis a lo hidrogeles 1:4 y 1:7 con su morfología completa.....	<b>92</b>
Figura 40 Grafica ensayo de hemolisis extendido hidrogeles 0:1, 1:4 y 1:7.....	<b>93</b>

## CAPITULO I

### 1.1 INTRODUCCIÓN

La nanomedicina se define como la rama de la nanotecnología que se encarga de emplear el uso de materiales nanoestructurados, para el uso de las ciencias de la salud[1]. Su irrupción en los últimos años ha dado lugar al desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades en estados poco avanzados o en el inicio de su desarrollo[2]. Las investigaciones en este campo darán lugar a sistemas de diagnóstico temprano y oportuno y tratamientos terapéuticos de mayor eficiencia que los procedimientos existentes frente a enfermedades difíciles de detectar a una etapa primaria como es el cáncer[2]

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 14 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer en el año 2015, la mayoría de estos casos fueron diagnosticados en países subdesarrollados, de los casos detectados 8 millones murieron a causa de ello siendo la sexta causa de muerte a nivel global[3]. Se estima que para el 2030 existan alrededor de 23.6 millones de casos[4]. Dentro de estas estadísticas el segundo con más incidencia a nivel global es el cáncer de mama siendo que este es el tipo de neoplasia más común entre las mujeres[4],[5] con 1.67 millones de casos anualmente y un total de 522,000 muertes. Sin embargo, la tendencia de la mortalidad es ascendente debido al envejecimiento poblacional y la poca capacidad de respuesta de los sistemas de salud en países subdesarrollados[3][6].

Por otro lado la estructura de las glándulas mamarias está conectada tanto como adentro como afuera, teniendo contacto hacia el exterior por medio de diferentes conductos que desembocan en el pezón[7][8], siendo que existe una correlación entre las secreciones mamarias y el entorno celular presente en las células de las glándulas mamarias; dentro de la vasta variedad de moléculas presentes en las

secreciones se encuentran biomoléculas como proteínas y estrógenos. Se ha observado que una alta producción de estrógenos es un indicador clave en el desarrollo de cáncer de mama, esto relacionado a un cambio en la metabolización de los estrógenos[9]. En este caso las catecol quioninas de estrógeno al formarse en exceso inducen a la depuración del ADN y por consiguiente a la iniciación de la neoplasia[10]. Al haber una cantidad excedente de catecol quioninas, en especial del 4 catecol, ésta fluye desde los conductos de la mama hasta el pezón, por lo que esta molécula puede ser usada como analito para la detección temprana de la enfermedad. Dentro de la amplia gama de materiales nanoestructurados con los que trabaja la nanomedicina, los hidrogeles son materiales poliméricos que se caracterizan por su capacidad de absorber un líquido sin disolverse en agua[11]. Por lo cual, la parte medular de este proyecto es sintetizar un hidrogel a base de queratina-sílice que pueda absorber secreciones mamarias para su posible aplicación en sistemas de detección temprana.

## CAPITULO II

### 2.1 ANTECEDENTES

El primer uso del término “hidrogel” data de un artículo en 1894 por Lee, Kwon y Park[11]. Sin embargo, ellos no realizaron un hidrogel como se conoce en la actualidad, sino un gel coloidal hecho con sales inorgánicas[11]. Para remontarnos hacia el primer estudio y desarrollo de un hidrogel, fue en el año 1960, cuando Witchterle y Lim polimerizaron y entrecruzaron el 2-hidroximetil metacrilato (HEMA) [12], descubriendo que este material tenía una alta afinidad hacia el agua además de ser translucido, el cual fue utilizado para la fabricación de lentes de contacto[11].

A partir de este descubrimiento se dio paso a la primera generación de hidrogeles. Esta generación se desarrolló a finales de las décadas de los 50's y 60's; las investigaciones se centraron principalmente en perfeccionar matrices poliméricas de polímeros sintéticos[11][13], como lo es el polivinil alcohol (PVA), o el polietilenglicol (PEG). En 1958 Danno obtiene el primer gel de PVA entrecruzado mediante la radiación de rayos gamma[13][14] , y King y Ward (1970) sintetizan un gel de PEG usando el mismo tipo de radiación[13][15].

Posteriormente dentro de la década de los 70's y 80's, se dio paso a la segunda generación de hidrogeles. En 1980 Yannas y colaboradores incorporaron polímeros naturales como colágeno y cartílago de tiburón para la fabricación de hidrogeles[11][13]; en este período las investigaciones de hidrogeles se enfocaron en cambiar de redes macromoleculares poliméricas que solo absorbían agua a hidrogeles capaces de tener alguna especie de reacción o respuesta frente a un cambio en el medio en que el material se desempeña, dichos estímulos pueden ser el pH, la temperatura o la concentración de biomoléculas[11][13]. Entre las aplicaciones que se buscaba en estos hidrogeles radicaban en la oftalmología y la liberación de fármacos[13]. Pero fue hasta la década de 1990 cuando se dio un avance en este tipo de hidrogeles y se realizaron diferentes descubrimientos; aquí

nace la tercera generación de hidrogeles, esta generación se enfoca en la investigación y elaboración de técnicas para la elaboración de materiales estereocomplejos e hidrogeles entrecruzados con otras interacciones físicas[11].

En 1990 Otaka y col. obtuvieron un hidrogel entrecruzado de poli n isopropilamida (pNIPAAm) vía reacción redox mediante polimerización de radicales[13][16]. En 1993 Sawhney y col. sintetizaron un hidrogel de PVA y PEG entrecruzado mediante la técnica de foto polimerización[13][17]. Después en el año de 1995 Cascone y col. obtuvieron un hidrogel híbrido entre polímeros naturales y sintéticos [13][18]. Posteriormente en 1997, Jeong y col. consiguen un hidrogel a base de PEG-PLA con respuesta en función de la temperatura[13][19]. Consecutivamente en 1998, Petka y col. desarrollaron un hidrogel a base de proteínas auto ensambladas artificialmente, en este caso leptina[13][20].

En el año 2000, Jong y col. elaboraron un hidrogel estereocomplejo a base de dextrano[13][9]. En esta década se profundizó en el estudio de nuevas formas de entrecruzamiento químico; por ejemplo en el 2001 Hubell y col. entrecruzaron un hidrogel a base de PEG mediante el método de adición tipo Michael usando PEG-multiacrilato y PEG-ditio[13] [21]. Después en 2006, Ossipov y col. logran entrecruzar un hidrogel a base de PVA mediante la técnica de química click[13][22].

Actualmente en esta década los hidrogeles a base de biopolímeros, que son aquellos polímeros que son generados dentro del organismo como DNA, proteínas, celulosa, etc. Estos han sido ampliamente estudiados, aunque desde los años 80 se viene trabajando con biopolímeros como el colágeno y la celulosa, se busca que estos geles sean “inteligentes”, es decir que ante cierto estímulo, estos den una respuesta determinada, dentro de esta gama de biopolímeros usados se encuentra la queratina. En 2008, Sierpinski y col. lograron diseñar un hidrogel a base de queratina extraída de cabello humano, demostrando que el material era neuroinductivo y a su vez que permitía la regeneración del nervio[23][24]. En 2013 Park y col. diseñaron un hidrogel de queratina extraída a partir de cabello humano y lana por medio de foto polimerización[25], luego Park y col. (2015) evaluaron el efecto de los hidrogeles de queratina en el proceso de sanación de heridas en

vivo[26], en el mismo año Nakata y col. los evaluaron como sustrato celular y su habilidad para la liberación de fármacos[27].

Posteriormente en 2016 Ma y col. realizaron un estudio de membranas de queratina derivadas de las plumas de los pollos[28]. Consecutivamente Kakkar y Madhan utilizaron sílice como entrecruzante, consiguiendo un material con alto grado de hinchamiento y buena viabilidad celular[29]. Es importante remarcar que previamente se habían realizado estudios para evaluar a la sílice como un entrecruzante. Xie y col. (2009) obtuvieron un nanocomposito de celulosa y sílice, dando como resultado que la sílice como entrecruzante proveía al material estabilidad térmica[30], después en 2011, Pirzada y col. sintetizaron películas delgadas a base de PVA/Sílice mediante la técnica sol-gel y electrospinning, reportando que al usar la sílice como un entrecruzante este le provee al sistema un aumento en la estabilidad térmica además de que reportaron que el entrecruzado volvió al sistema estable en un medio acuoso[31].

Recientemente en el año 2017, Wang y col. realizaron un hidrogel a base de queratina para la curación de heridas evaluando su efecto en la sanación de las heridas y su biocompatibilidad, dando como resultado un material desprovisto de inmunogenicidad siendo un material candidato para la curación de heridas[32]. En el mismo año Peralta Ramos y col. obtuvieron un hidrogel de queratina inteligente el cual es capaz de responder a diferentes valores de pH, determinando que entre el pH de 6 y 8 es cuando el hidrogel tendía a absorber más agua[33]. En el año 2018, Esparza, Ullah y Wu estudiaron el mecanismo molecular y gelación de los hidrogeles de queratina, obteniendo que la gelación ocurrida en el pH de 3 resultó más rígida que en los pH 5, pH 7 y pH 9[34].

Visto anteriormente este material se encuentra dentro del estado del arte en el campo de los hidrogeles; lo cual ofrece una oportunidad para estudiar sus características y encausarlas hacia otro tipo de aplicaciones biomédicas.

## 2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a datos recientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en México 15 mexicanas mueren diariamente a causa del cáncer de mama, representando la primera causa de muerte en mujeres mayores de 25 años[6][35]. El aumento en el número de casos y la mortalidad se atribuye de manera considerable a la tendencia de la mortalidad es ascendente debido a una mayor incidencia de la enfermedad, el envejecimiento poblacional y la poca capacidad de respuesta de los sistemas de salud en países subdesarrollados[6][35], por lo que lo convierte un problema importante en materia de salud pública.

Actualmente existen diferentes métodos de diagnóstico como lo son la mastografía, tomografía, química sanguínea, etc.[36]. Sin embargo estos no proporcionan un diagnóstico temprano en la enfermedad si no que estos detectan estadios de la enfermedad en etapas medianamente a ampliamente avanzadas, y esto contribuye a que la tasa de mortalidad aumente. Se ha comprobado que la detección temprana de esta enfermedad en estadios tempranos aumenta la tasa de supervivencia al cáncer de mama. Por ejemplo, en la etapa 0 hay 95 % de probabilidad de supervivencia; en la etapa I es de 88 %[37], a pesar de ello a medida que se avanza en el estadio de la enfermedad disminuye la probabilidad de supervivencia pasando a un 66% en la etapa II; y descendiendo a un 36 % en la etapa III y de apenas 7 % en la etapa IV[37].

La relación del cáncer de mama con los estrógenos está claramente establecida. Los estrógenos, junto a la predisposición genética, constituyen los elementos de mayor peso en la génesis de este cáncer[38]. El metabolismo de los estrógenos se realiza por dos vías: a) hidroxilación para la formación de los estrógenos 2- y 4-catecol; b) hidroxilación en la posición 16- $\alpha$ [39]. En la primera ruta ocurre una oxidación adicional en las semiquinonas y quinonas dando como resultado el estrógeno catecol 3-4 quinona. En este proceso la oxidación que se produce en las quinonas presentes en los estrógenos es normal. Sin embargo, cuando este

proceso se ve alterado se forman cantidades excesivas de catecol-quioninas da pie a un proceso de depuración o una deaminación de las bases nitrogenadas presentes en el ADN, lo que dichas mutaciones en el código genético conllevan a un iniciación del cáncer[38]. Por su parte las secreciones mamarias son secreciones que normalmente están compuestas de leche, galactorrea neo natal, galactorrea, etc.[40]. Las secreciones mamarias se encuentran altamente relacionadas con el fluido que se encuentra presente dentro de las unidades secretorias, por lo que cuando hay una excesiva cantidad de catecol, este fluye por los conductos de mama hasta llegar al pezón. Actualmente no existe un dispositivo que use estos estrógenos para detectar el cáncer de mama Por lo que es imprescindible elaborar un material capaz de absorber las secreciones mamarias y su futura aplicación como un sistema de detección temprana.

## **2.3 JUSTIFICACIÓN**

Este trabajo contribuirá al avance en la elaboración de sistemas de diagnóstico temprano, en este caso la detección de estrógenos asociado al cáncer de mama. La importancia del estudio de estos nuevos sistemas de diagnóstico yace en la posibilidad de disminuir la tasa de mortalidad de la enfermedad. De las 522,000 muertes a nivel mundial que reporta la OMS en 2012, 324,000 se dieron en países subdesarrollados y 198,000 en países desarrollados[3], atribuyéndose principalmente a que los diagnósticos no se hicieron en un etapa temprana si no en estadios muy avanzados, y en algunos casos la falta de accesibilidad a los métodos de diagnóstico; lo que se busca en esta investigación es contribuir hacia el desarrollo de un sistema de detección temprana y accesible, por lo cual se propone la elaboración de un hidrogel a base de queratina-sílice con capacidad de absorber secreciones mamarias.

La queratina es una proteína estructural presente en los seres vivos vertebrados. Posee diferentes características que lo hacen un candidato idóneo para la fabricación de hidrogeles, es biocompatible, biodegradable y propiedades físicas[32]. Además que se ha demostrado que tiene altas propiedades de absorción

de alrededor de un 600% de su masa[29][33]. Aunado a esto este material es de fácil obtención y procesamiento a un bajo costo.

Por otro lado la sílice es un material que posee propiedades de estabilidad térmica, se ha comprobado que a diferentes composites usando la sílice como entrecruzante aumentan su estabilidad térmica y mecánica[29][30][31]. Por otra parte el método de para la obtención de sílice es relativamente sencillo mediante la catálisis del precursor TEOS[31].

La técnica de Sol-Gel es ampliamente conocida y practicada para sintetizar nuevos geles híbridos biocompatibles para una amplia gama de aplicaciones[29]. Cabe resaltar que el proceso no es costoso y los geles producidos no son tóxicos[29]. La ventaja de emplear el método de sol-gel para producir materiales híbridos es que combina propiedades inorgánicas y orgánicas. Además, que este método ofrece la posibilidad de obtener materiales híbridos homogéneos a una baja temperatura, lo que proporciona la posibilidad de incorporar una variedad de compuestos[29]. En su conjunto este sistema representa un avance hacia el proceso de elaboración de sistemas de detección temprana de enfermedades.

## **2.4 HIPÓTESIS**

El hidrogel de sílice-queratina a partir de un extracto *gallus gallus domesticus* presentará una relación inversamente proporcional entre la degradación hidrolítica y el porcentaje de hemolisis.

## **2.5 OBJETIVOS**

### **2.5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar y determinar la relación entre la degradación hidrolítica del hidrogel de queratina-sílice y el proceso de hemolisis.

### **2.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Sintetizar hidrogeles de queratina-sílice mediante la técnica Sol-Gel.
- Evaluar la degradación de los hidrogeles de queratina-sílice por medio de pruebas de degradación hidrolítica.
- Determinar porcentaje de hemolisis en los hidrogeles de queratina-sílice mediante un ensayo de hemolisis.
- Establecer una relación entre la degradación y el porcentaje de hemolisis de los hidrogeles queratina-sílice.

## CAPITULO III

### 3.1 MARCO TEÓRICO

#### 3.1.1 HIDROGELES

Un hidrogel es una red polimérica tridimensional compuesta por un polímero hidrofílicos, o una mezcla de polímeros[41]; la matriz polimérica es resultado de un entrecruzamiento entre interacciones físicas entre las moléculas del polímero o entrecruzamiento químico mediante enlaces covalentes[42]. Generalmente al menos el 10-20% de la composición del gel es agua. Cuando un hidrogel es secado se le denomina xerogel o hidrogel seco; al momento en que se pone en contacto con un medio acuoso este tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de agua e hincharse isotrópicamente es decir de manera uniforme [41], pero manteniendo su forma hasta alcanzar un equilibrio fisicoquímico[43]. . Su afinidad al agua radica en la presencia de grupos funcionales afines al agua como:  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONH-$ , and  $-SO_3H$  [44]. En recientes años se les ha considerado como biomateriales inteligentes, debido a que algunos de ellos responden variando su volumen a estímulos externos en el ambiente en que se desarrollan tales como cambios de pH, temperatura, concentración de especies, radiaciones, etc. [45].

Debido a la fuerte presencia de agua en su estructura y su semejanza con las propiedades de los tejidos naturales los hace candidatos idóneos para diversas aplicaciones biomédicas[46]. Fue en la décadas de 1960 cuando Witchterle y Lim desarrollaron un gel a base de 2- hidroxietil metacrilato (HEMA) para su aplicación en lentes de contacto[46]. Prediciendo que este tipo de materiales eran altamente biocompatibles con el tejido vivo[47]. Los hidrogeles han mostrado un gran potencial en diferentes disciplinas, entre ellas la ingeniería tisular, siendo que su aplicación

reside en vehículos para el transporte de fármacos, células y proteínas además de la liberación controlada de fármacos[47].

Este material posee características natas que lo convierten en la opción para aplicaciones biomédicas, por ejemplo[47]:

- Habilidad de retener agua dentro de la matriz del gel, presentando así un ambiente semi-húmedo que se asemeja a los tejidos naturales (Figura 1).
- Capacidad de incorporar ligandos bioactivos que promuevan la interacción del gel con células encapsuladas.
- Habilidad de proveer superficies inertes, previniendo una adsorción no específica de proteínas evitando interacción con biomoléculas que no son de interés.
- Capacidad de controlar tanto propiedades físicas y mecánicas ajustando la densidad del entrecruzado y el tipo de polímero/molécula usada como entrecruzante.
- Habilidad de permitir la difusión de nutrientes y gases dentro y fuera del gel.

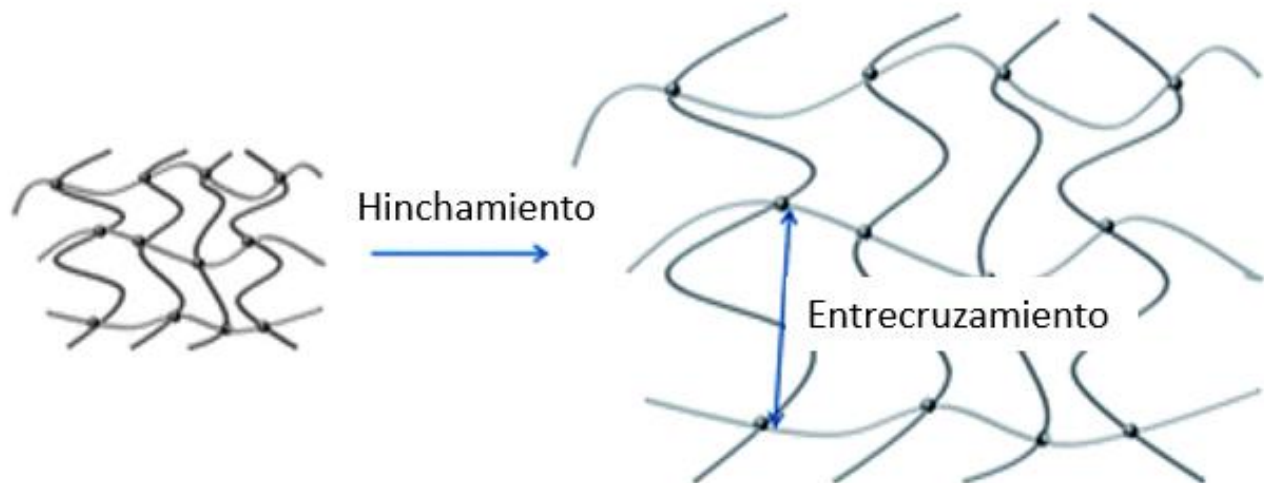


Figura 1 Esquema de un hidrogel antes y después de un hinchamiento [48].

Los hidrogeles en general pueden clasificarse de la siguiente manera:

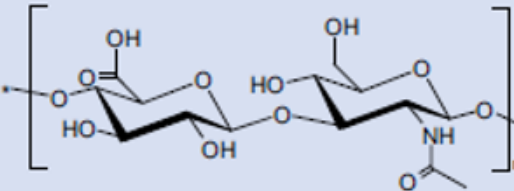
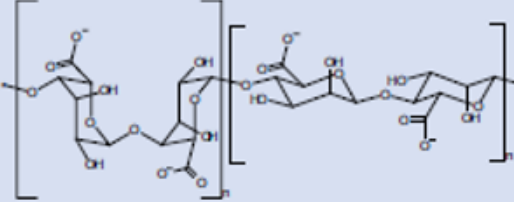
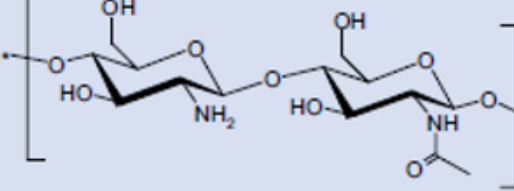
- a) *Hidrogeles permanentes (geles químicos)*: Son denominados así ya que estos están entrecruzados covalentemente. Poseen un estado de hinchamiento en equilibrio el cual depende de la densidad del entrecruzante y la interacción entre el polímero y el agua[49].
- b) *Hidrogeles reversibles (geles físicos)*: Son llamados así ya que la red polimérica del hidrogel está unida entre sí por medio de enredos moleculares dados por interacción inter e intramoleculares[49].

A lo largo de este capítulo se explicara a detalle la mecánica de este tipo de entrecruzamientos.

### **3.1.1.1 POLÍMEROS USADOS PARA LA FABRICACIÓN DE HIDROGELES**

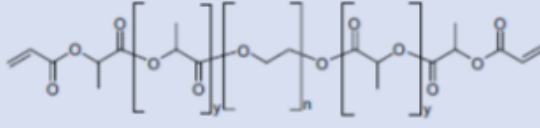
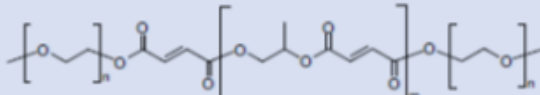
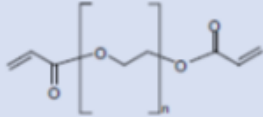
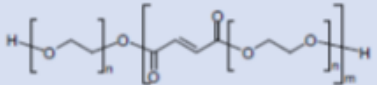
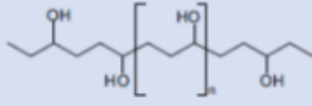
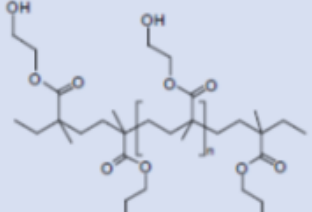
De acuerdo a la aplicación que se quiera llevar a cabo, se puede elegir entre una amplia gama de polímeros [50]. En primer lugar tenemos los polímeros naturales, estos abarcaron una gran cantidad de materiales, desde matrices extracelulares de mamíferos (colágenos, gelatina, fibrina, ácido hialurónico), a polímeros derivados de plantas, como algas (Alginatos)[50]. Sin embargo este tipo de polímeros tienen una capacidad de gelificación débil, por lo que si se desea usar para aplicaciones en la ingeniería tisular, se debe realizar modificaciones químicas (entrecruzamiento químico) para aumentar la estabilidad mecánica y química[50].

Tabla 1 Hidrogeles con polímeros naturales[51]

Estructura química	Modificaciones/ Entrecruzamiento
<p>Colágeno Gelatina</p>	<p>Entrecruzamiento físico inducido por temperatura; entrecruzamiento químico con glutaraldehído o carbodiimidas. Polipéptido triple helicoidal, componente principal estructural de matriz extracelular, varios tipos y derivados.</p>
<p>Fibrina Ácido hialurónico</p> <p>Proteína involucrada en coagulación de la sangre</p> 	<p>Proteínas parcialmente hidrolizadas derivadas del colágeno Entrecruzamiento físico después de activación enzimática Entrecruzamiento físico y modificaciones químicas por entrecruzamiento químico</p>
<p>Alginato</p> 	<p>Entrecruzamiento físico mediado por cationes divalentes; entrecruzamiento químico con aminas</p>
<p>Quitosano</p> 	<p>Entrecruzamiento físico mediado a través de aniones; entrecruzamiento químico con glutaraldehído</p>

Después se encuentran los polímeros sintéticos, estos han sido desarrollados para ofrecer una alternativa en la elaboración de hidrogeles frente a los polímeros naturales[50]. Este tipo de polímeros ofrece un conjunto de propiedades además de la particularidad de mejorar las características del hidrogel resultante[50], esto se debe en gran medida en que este tipo de polímeros tienen propiedades físicas químicas y biológicas que pueden ser fácilmente reproducibles[46]. Entre ellos destacan: Polivinil Alcohol (PVA), Polietilenglicol (PEG), Poliácridamida, Polimetilmetacrilato (PMMA), Acido poli láctico (PLA), etc. [46][50].

Tabla 2. Hidrogeles con polímeros sintéticos [51]

Estructura	Modificaciones/ Entrecruzamiento
<p>Copolímero de ácido polilactídico</p> 	<p>Entrecruzamiento químico de los enlaces dobles insaturados con iniciación radical (temperatura o luz UV)</p>
<p>Copolímero de polipropileno fumarato</p> 	
<p>Poli(etilenglicol acrilato)</p> 	<p>Entrecruzamiento químico de los enlaces dobles insaturados con iniciación radical (temperatura o luz UV)</p>
<p>Oligo (poli(etilenglicol fumarato))</p> 	
<p>Alcohol polivinílico</p> 	<p>Entrecruzamiento físico; entrecruzamiento químico con glutaraldehído y otros entrecruzantes divalentes</p>
<p>Poli(hidroxi etil metacrilato)</p> 	

Sin embargo, no todos los hidrogeles sintéticos son biodegradables y, a menudo, inducen inflamación local y toxicidad por compuestos químicos traza producto de la descomposición del polímero [52]. Los hidrogeles a base de biopolímeros han cobrado relevancia en los últimos años, estos provienen de plantas o macromoléculas derivadas de organismos, en general, son biodegradables, ya que interactúan con las enzimas presentes en el cuerpo[52]. A continuación se hablará del porqué este tipo de biomateriales es usado como una alternativa para la elaboración de hidrogeles.

### 3.1.2 BIOPOLÍMEROS

Los biopolímeros son biomoléculas poliméricas que contienen unidades monoméricas las cuales se encuentran unidas covalentemente para formar moléculas más grandes. El prefijo “bio”, hace referencia que son materiales biodegradables producidos por organismos vivos [53], como los materiales producidos a partir de la síntesis química de fuentes biológicas como aceites vegetales, azúcares, grasas, resinas, proteínas, aminoácidos, etc.[53] En comparación con los polímeros sintéticos que poseen una estructura más simple y aleatoria, los biopolímeros al tener conjuntos moleculares complejos, adoptan formas y estructuras tridimensionales precisas y definidas. Esta es una propiedad importante que hace que los biopolímeros sean moléculas activas in vivo[53].

Estos se clasifican de diferentes maneras en diferentes escalas. Por ejemplo en función de su degradabilidad, los biopolímeros se pueden dividir en dos grandes grupos, si son biodegradables y no biodegradables, si su composición es de base biológica [53]. Otra forma de clasificarlos es de acorde a la naturaleza de la unidad de repetición de la que están conformados; estos se clasifican en tres grupos: 1) los polisacáridos conformados de azúcares (por ejemplo, la celulosa que se encuentra en las plantas, almidón presente en la mayoría de los tubérculos, ácido hialurónico, etc.), 2) las proteínas constituidas de aminoácidos (por ejemplo, mioglobina que se encuentra en los tejidos musculares, colágeno presente en la matriz extracelular, zeína presente en el maíz, etc. y 3) los ácidos nucleicos los cuales están hechos de nucleótidos (ADN, material genético de un organismo dado). En el siguiente esquema se observan las diferentes clasificaciones de biopolímeros (Figura 2).

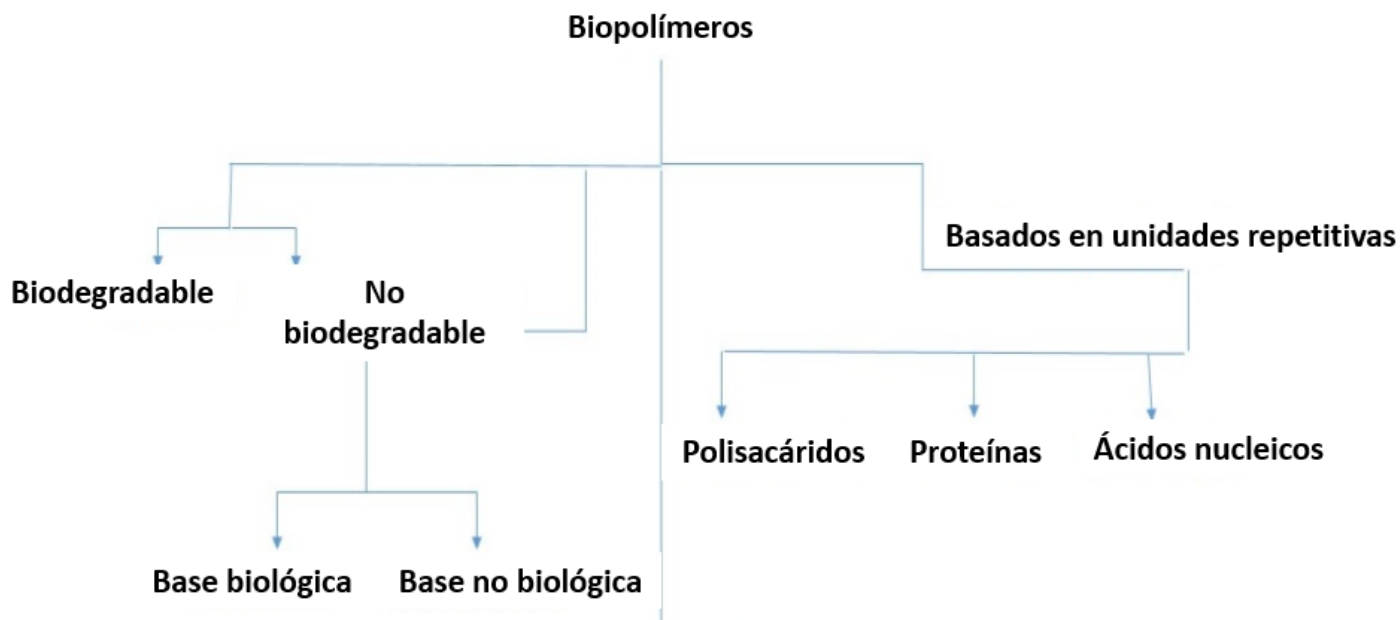


Figura 2 Organigrama con las diferentes clasificaciones de los biopolímeros [53].

Las proteínas en este caso se encuentran presentes en animales y plantas, su extracción es posible a partir de los subproductos y desechos de la industria agrícola y de cría. Un ejemplo en concreto son el colágeno, queratina, zeína y soya, debido a que se encuentran en estos subproductos su obtención es de bajo costo[54]; su potencial como un biomaterial es muy prometedor debido a su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y baja respuesta inmune por consiguiente, en la actualidad se estudian hidrogeles basados en proteínas para aplicaciones biomédicas [54].

### 3.1.2.1 QUERATINA

La queratina es una proteína que conforma la mayor parte de las estructuras epiteliales y epidérmicas citoplasmas. Por lo tanto, es abundante en pelos de animales, uñas, lana, cuernos y plumas[32][54]. Esta se clasifica en dos grupos: a) queratina blanda y b) queratina dura. La queratina epidérmica, se conoce como queratina blanda y contiene 1% de azufre, mientras que la queratina dura contiene aproximadamente 5% de azufre y se encuentra en pelos, uñas, cuernos y plumas[55]. Dentro de la queratina se pueden encontrar dos tipos de

conformaciones en queratina: hélice- $\alpha$  y lamina- $\beta$ . Los cabellos humanos están estructurados principalmente por dos subtipos de  $\alpha$ -queratinas, que interactúan entre sí y se convierten en una hélice levógira heterodímera[56]. Mientras que la lámina- $\beta$  primariamente forma parte de una estructura protectora en la cutícula[57].

Hay 14 tipos de aminoácidos presentes que conforman la queratina en donde la cisteína varía entre el 7 y 20% del total de residuos de aminoácidos.[54]. Estos residuos en su mayoría interactúan con otros residuos de cisteína formando puentes disulfuro [58], los puentes disulfuro tanto intermoleculares como intramoleculares tienen un rol muy importante en las altas propiedades mecánicas que posee la queratina[58]. En el caso de la queratina dura su alta durabilidad y dureza se debe al alto contenido de cisteínas en su estructura[54].

Otro punto a destacar es que la degradación *in vivo* causada por enzimas proteolíticas para proteínas comunes no aplica de igual manera en la queratina, básicamente porque, los mamíferos no tienen queratinas u otras enzimas que degradan la queratina[59]. Por lo tanto los hidrogeles a base de queratina tienen también la propiedad de ser estables en un largo periodo de tiempo sin ser degradados por enzimas[54].

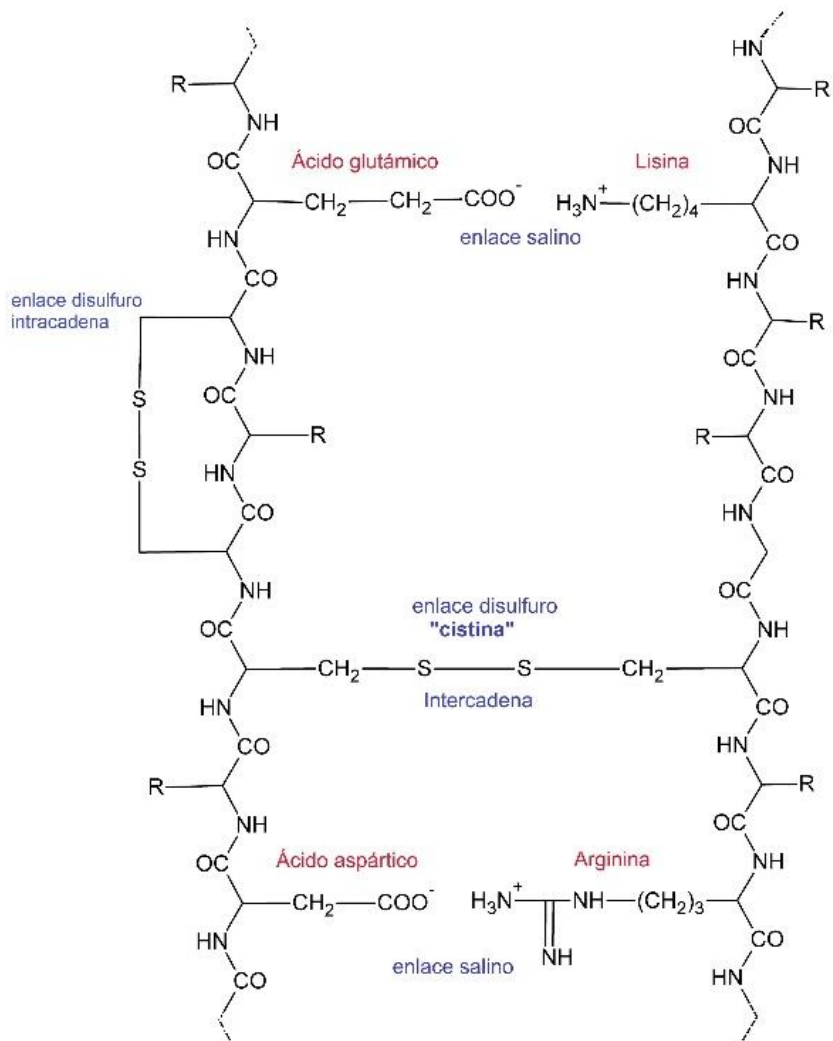


Figura 3 Estructura de la queratina [60], se observan dos cadenas polipeptídicas, dentro de ellas se observa la unión de algunos aminoácidos propios de la queratina y las interacción intermoleculares e intramoleculares.

### **3.1.3 SÍNTESIS DE HIDROGELES**

Los hidrogeles se sintetizan mediante diferentes métodos de polimerización usando rutas de entrecruzamiento físico y químico [61], copolímeros de injerto, y entrecruzamiento por radiación [49]. Tanto los polímeros naturales como las proteínas o los polímeros sintéticos como el PVA con una alta afinidad por el agua pueden entrecruzarse y así implementarlos para la elaboración de hidrogeles[61]. Se pueden llevar a cabo diferentes métodos de entrecruzamiento para el diseño de un hidrogel, todo depende de la aplicación en la cual el material se va a desempeñar, de hecho en los últimos años se ha descubierto que estos métodos de síntesis permiten mejorar las propiedades mecánicas, y viscoelásticas, las cuales son de vital importancia para las aplicaciones biomédicas[49].

#### **3.1.3.1 ENTRECruzAMIENTO DE HIDROGELES**

El entrecruzamiento es una técnica de estabilización química en un polímero, el cual conduce a una ampliación multidimensional de las cadenas poliméricas, dando como resultado una estructura en forma de red[61]. Este proceso permite la unión de una cadena polimérica a otra, siendo de manera iónica o covalente[61]. Los hidrogeles requieren de un entrecruzamiento adicional y modificación química para obtener mejores propiedades[50]. Dentro de las consideraciones que se debe tener para este proceso, la más importante es la biocompatibilidad de los productos químicos elegidos para entrecruzar y de la reacción de entrecruzamiento, que determina la supervivencia de las células dentro y fuera del hidrogel[50].

Basados en los métodos de entrecruzamiento tenemos dos diferentes sistemas de hidrogeles, el primero es el entrecruzamiento físico, en este tipo de entrecruzamiento, las cadenas poliméricas se encuentran unidas mediante interacciones secundarias, como lo son las fuerzas de Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo e interacciones electroestáticas entre iones divalentes y las cadenas del polímero[50], la relevancia de este sistema es que no incorpora moléculas entrecruzantes a partir de la síntesis[62], y también la facilidad para su

elaboración[49]. Por otro lado tenemos el entrecruzamiento químico el cual consiste principalmente en moléculas entrecruzadas entre largas cadenas poliméricas mediante enlaces covalentes[50]. Actualmente el interés en los hidrogeles entrecruzados químicamente se debe a la buena resistencia mecánica que estos poseen[62], aunado a esto ofrecen la posibilidad de elegir entre una amplia gama de entrecruzantes siendo que este sea degradable o no degradable, una cualidad de relevancia para las aplicaciones en la ingeniería tisular[50].

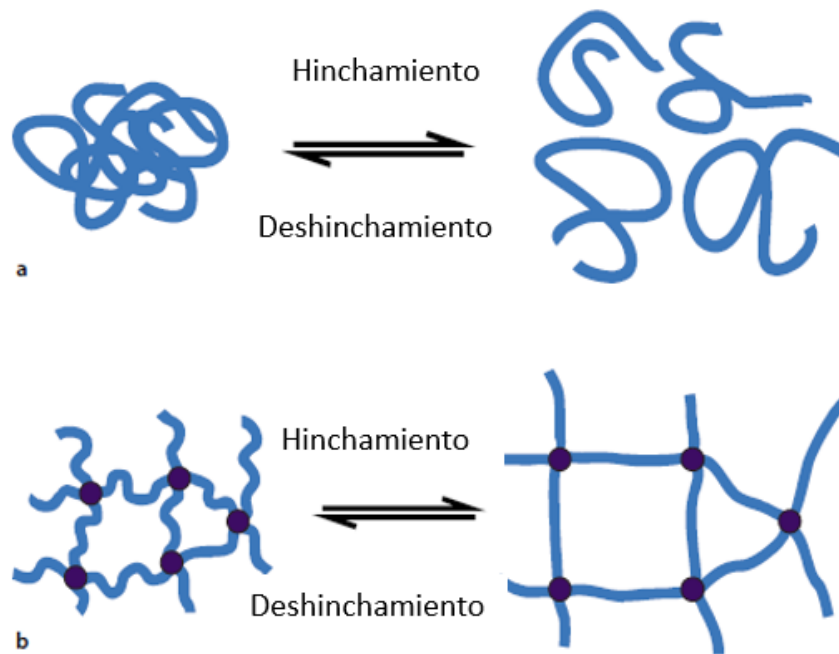


Figura 4 a) Hidrogel entrecruzado físicamente, b) Hidrogel entrecruzado químicamente. [50].

### 3.1.3.1.1 ENTRECruzamiento Físico

En todos los entrecruzamientos físicos el resultado serán enlaces débiles y no permanentes entre las cadenas del polímero, aunque sea un gel muy sencillo, este tipo de entrecruzamiento comprende la formación de un enredado de las cadenas del polímero[50]. La longitud o ramificación del polímero controla las propiedades mecánicas de los geles hasta cierto punto; aunque, este tipo de los geles siempre perderán integridad mecánica tras la dilución, por lo que es extremadamente difícil aplicarlos in vivo[50].

Existen diferentes procedimientos para la obtención de hidrogeles con entrecruzamientos físicos, uno de los más utilizados son los ciclos de congelamiento-descongelamiento[63], en el cual una solución con el precursor es congelado y descongelado en un medio con agua o una mezcla entre agua y un solvente orgánico[63]. El producto de este proceso se le denomina criogel; en este procedimiento durante la formación del gel, los cristales crecientes van a determinar el tamaño y la forma de los poros una vez que este se descongele[63](Figura 5).

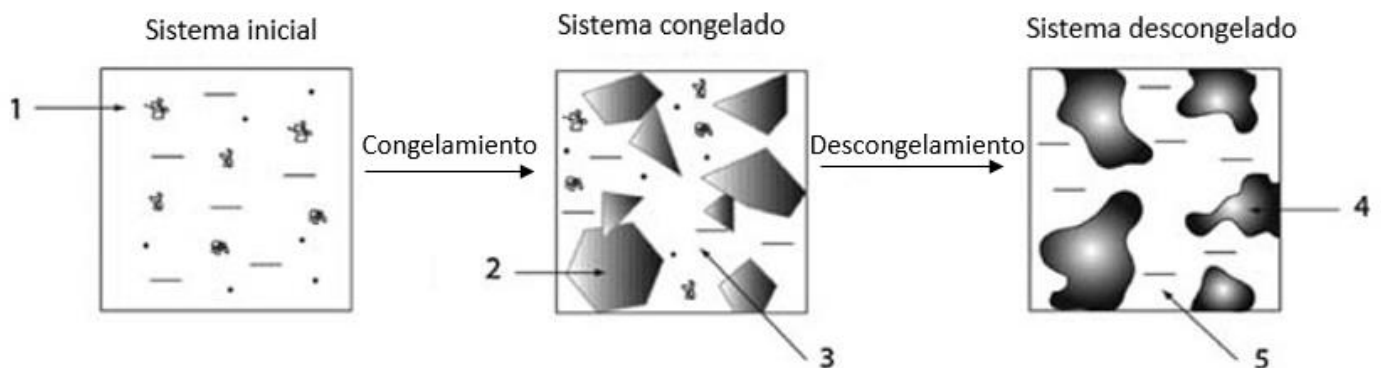


Figura 5 Esquema de entrecruzamiento físico de un hidrogel de PVA usando ciclos de congelamiento-descongelamiento[64]

Existen otros métodos por los cuales se puede obtener un entrecruzamiento físico como:

- a) *Calentamiento-enfriamiento*: en donde se enfrían y calientan soluciones de gelatina y carragenina, enredándose en hélices al momento de calentarse, al enfriarse esta barra en forma de hélice entrecruza las cadenas poliméricas[49].
- b) *Interacción iónica*; este se logra mediante la adición de contraiones divalentes o trivalentes usando el principio de la gelación de una solución polielectrolítica como el alginato( $\text{Na}^+$ ) con iones multivalentes de cargas opuestas[49].
- c) *Unión por puentes de hidrogeno*: esto se puede obtener disminuyendo el pH de la solución acuosa de los polímeros acarreado grupos carboxilo para gestar el entrecruzamiento[49].

Aunque los hidrogeles entrecruzados físicamente son obtenidos sin necesidad de utilizar una molécula entrecruzante, o algún tipo de modificación química. Esta ventaja se ve contrastada respecto a diversas variables como lo es el tiempo de gelificación, el control sobre el tamaño del poro del gel, su funcionalización química y su degradación; lo que conlleva a que el rendimiento in vivo de este sistema sea incierto [65].

### 3.1.3.1.2 ENTRECRUZAMIENTO QUÍMICO

Los hidrogeles entrecruzados químicamente implican la inserción de monómeros en la cadena principal de los polímeros o de agentes o moléculas entrecruzantes para unir dos cadenas poliméricas[49]; obteniendo como resultado una red polimérica de moléculas ramificadas unidas covalentemente[63]. El entrecruzamiento de los polímeros naturales y sintéticos se puede lograr por mediante la reacción de sus grupos funcionales (tales como OH, COOH y NH<sub>2</sub>) con moléculas entrecruzantes como aldehídos (por ejemplo, glutaraldehído, ácido adípico dihidrazida). Hay una serie de métodos reportados en la literatura para obtener hidrogeles permanentes entrecruzados químicamente [49]. Dentro de estos métodos se encuentra:

- a) *Entrecruzamiento por moléculas pequeñas*: en este tipo de entrecruzamiento un polímero y una pequeña molécula entrecruzante interactúan en un disolvente apropiado, las moléculas poseen al menos dos grupos funcionales reactivos que permiten la formación de puentes entre cadenas poliméricas[65].
- b) *Redes híbridas poliméricas*: Esta tipo de entrecruzamiento se produce entre una unidad estructural de una cadena polimérica y un monómero de otra cadena polimérica. Por lo tanto, los polímeros deben estar pre-funcionalizados con grupos funcionales reactivos para permitir enlaces covalentes[49][65].
- c) *Foto-entrecruzamiento*: Depende en gran medida de la presencia de grupos funcionales fotosensibles (Ej. grupos amino). El entrecruzamiento se obtiene al unir un grupo funcional foto sensible a un polímero que se desea

entrecruzar, permitiéndole formar enlaces entrecruzados tras la irradiación con luz, tal como la luz Ultravioleta, haz de electrones, radiación gamma[49][65].

Una ventaja de este tipo de hidrogeles es que permiten la absorción de agua y componentes bioactivos insolubles lo que contribuye en una liberación de fármacos mediante la difusión[65]; otra aplicación de este tipo de sistema es en la fabricación de sensores químicos. Esto se debe en gran parte al capacidad de atrapamiento que tiene este sistema, siendo que el gel es biocompatible y la matriz es lo suficientemente holgada para permitir la penetración de pequeñas biomoléculas moléculas ( Ej. oligonucleótidos, enzimas ) que son analitos de interés [42].

### **3.1.3.1.2.1 SÍLICE**

La sílice es usada como abreviatura del dióxido de silicio en todas sus formas, ya sea como material cristalino, amorfo, hidratado e hidroxilado, se expresa con una fórmula general:  $\text{SiO}_2$  o  $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [66]. Está conformado por matrices tetraédricas de  $\text{SiO}_4$  interconectadas entre sí (Figura 6). Por otro lado en su superficie, la estructura termina en un grupo siloxano (Si-O-Si) con el oxígeno en la superficie o en una de varias formas de grupos silanol (Si-OH)[66]. Los grupos silanol y siloxano que se crean en la superficie de la sílice, conducen a la naturaleza hidrófila de las partículas[67].

Posee una superficie extremadamente grande, lisa y no porosa, lo que promueve un contacto físico fuerte entre la carga y la matriz del polímero[67]. Las superficies de la sílice típicamente terminan con tres tipos de silanol: a) silanoles libres o aislados con grupos OH libres, b) silanoles enlazados con hidrógeno también denominados silanoles puenteados o asociados; se producen cuando dos grupos silanol unidos a diferentes átomos de silicio están lo suficientemente cerca para formar un enlace de hidrógeno y silanoles germinales (Figura 7) [67].

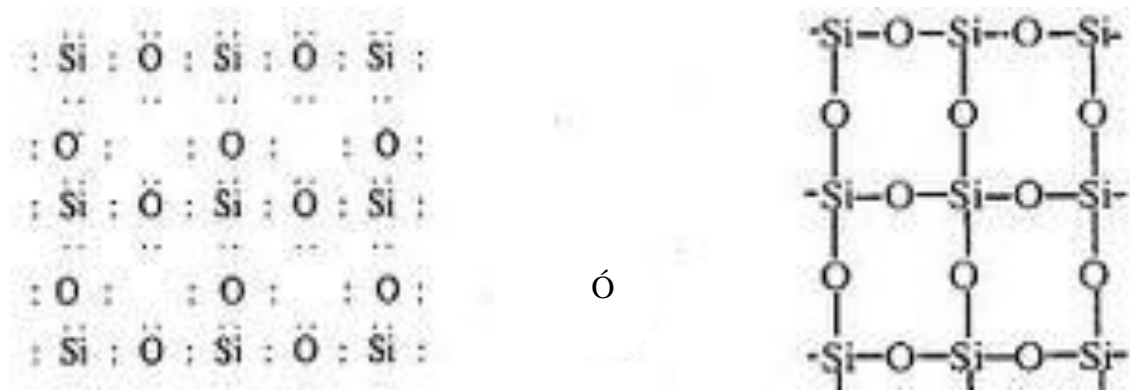


Figura 6 Estructura del sílice[68]

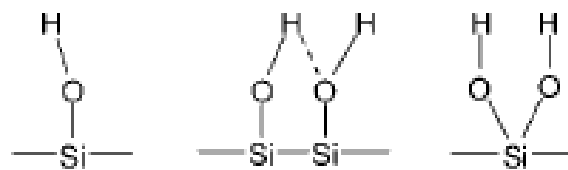


Figura 7 Diferente tipos de grupos silanol presentes en la estructura de la sílice: libres/aislados(izquierda), enlazados(centro), geminales(derecha) [67]

Existen dos maneras para la síntesis de la sílice, a) por Sol-Gel y b) micro-emulsión, siendo el Sol-Gel el más utilizado debido a su proceso en baja temperatura, menor costo y mejor control de la morfología[29][69]; en este proceso se utiliza el tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor su obtención. El cual en presencia de un medio acuoso (Agua) y usando un ácido inorgánico como catalizador (HCl) o una base (NaOH) se produce una hidrólisis que conduce a la formación de la sílice[29]. Dada su habilidad para enlazar moléculas (Figura 8), este material ha sido ampliamente estudiado como entrecruzante químico de hidrogeles, debido a que le confiere estabilidad térmica al sistema, lo vuelve insoluble ante el agua, y mejora las propiedades mecánicas como la rigidez[31][70].

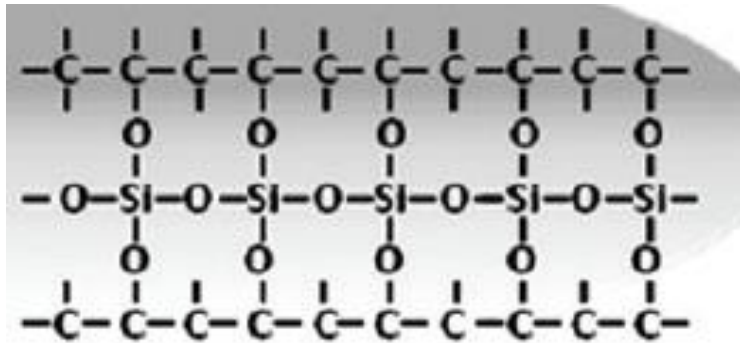


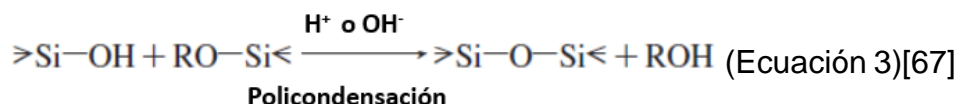
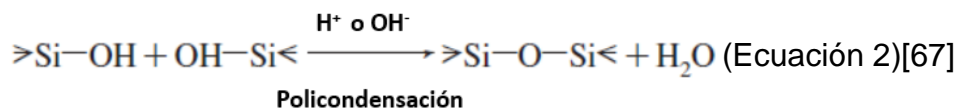
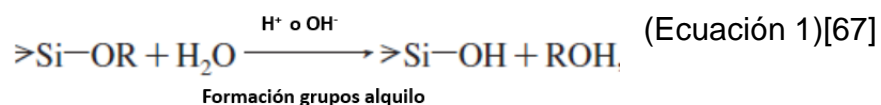
Figura 8 Formación del entrecruzamiento químico entre dos cadenas poliméricas de PVA y moléculas de sílice [31].

### 3.1.4 MÉTODO SOL-GEL

Las reacciones sol-gel se han estudiado ampliamente durante varias décadas como un método para preparar precursores de cerámica y vidrios inorgánicos a temperaturas relativamente bajas. La principal ventaja de este proceso es que se utilizan condiciones simples, como temperatura y presiones relativamente bajas, algo de mucha utilidad en la síntesis y procesamiento de cerámicos[67][71]. En las últimas décadas, el proceso de sol-gel se ha utilizado ampliamente para crear nuevos materiales compuestos orgánicos-inorgánicos (híbridos)[68] . Estas combinaciones facilitan el diseño de nuevos materiales con diversas propiedades enfocado hacia una amplia gama de aplicaciones. Las aplicaciones biomédicas requieren el diseño de nuevos biomateriales, y esto se puede lograr fusionando la química y la bioquímica sol-gel[68], teniendo el potencial de proporcionar combinaciones únicas de propiedades que otros materiales no pueden lograr[67].

El proceso de sol-gel se puede ver como un proceso de formación de dos pasos, el primer paso es la hidrólisis de un alcóxido metálico (Ecuación 1) y el segundo consiste en una reacción de policondensación (Ecuación 2) (Ecuación 3). La mayor parte del interés en este método se concentra en los alcóxidos metálicos y orgánicos,

especialmente la sílice, ya que pueden formar una red de óxido en las matrices orgánicas[67]. La reacción se describe de la siguiente manera:



### 3.1.5 DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

La degradación es un proceso irreversible que implica cambios en la estructura del material, normalmente caracterizada por una pérdida de propiedades (peso molecular, estructura, resistencia mecánica)[72]. Existen diferentes tipos de degradación de polímeros, como degradación fotolítica, térmica, mecánica y química[73][74]. Para aplicaciones in vivo; la degradación térmica no tiene mucha importancia. La degradación mecánica afecta a los polímeros que están sometidos a estrés mecánico (por ejemplo implantes médicos, suturas, etc.)[74]. Sin embargo, todos los polímeros biodegradables contienen enlaces hidrolizables que los hacen más propensos a la degradación química por hidrólisis o hidrólisis catalizada por enzimas[74].

Se han identificado diversos factores que influyen y contribuyen a la degradación del polímero. Entre ellos se encuentran la composición de copolímero/entrecruzante, la morfología, la autocatálisis por productos de degradación ácidos dentro de la matriz, por la presencia de fármacos u otros excipientes y la técnica de preparación[74]. Aunque, los impactos de estos parámetros que aumentan o disminuyen la tasa de degradación no son exactamente claros y completamente determinantes. Por lo tanto, el estudio de la degradación hidrolítica es sumamente importante al considerar el rendimiento de los implantes

poliméricos o del rendimiento de sistemas poliméricos de liberación de fármacos[74].

### 3.1.5.1 DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA

La degradación hidrolítica de un polímero es producto del contacto del material con un medio acuoso, al momento en que el agua entra en la matriz polimérica esta genera la hidratación de las moléculas dando como resultado la ruptura de puentes de hidrogeno presentes en la red, lo que lleva a un hinchamiento de la estructura y finalmente a la hidrolisis de enlaces inestables[74][72]. Este proceso es regido por diferentes factores, como la cantidad de agua absorbida, la composición del polímero, la solubilidad de los productos de degradación, la temperatura y el pH de la solución, etc.[72]. A lo largo de esta hidrolisis, hay una reducción del peso molecular de las cadenas poliméricas, esto se debe a las escisiones de cadena al azar características de este proceso[72].

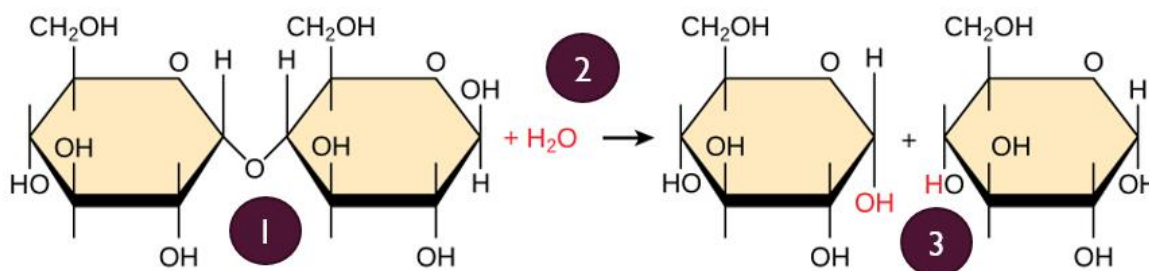


Figura 9 Esquema de degradación hidrolítica, Se muestra un disacárido, maltosa, (1) que entra en contacto con una molécula de agua (2), de esta interacción resultan compuestos más sencillos, en este caso monosacáridos de glucosa.(3) Una obtiene un átomo de hidrogeno y la otra un grupo hidróxido [75].

En consecuencia para que sistema polimérico sea exitoso, independientemente si su aplicación se enfoca en la liberación de fármacos o para algún tipo de soporte, este no debe causar ninguna reacción sistema o local de manera significativa[74], de aquí yace la relevancia de estudiar la biocompatibilidad de las moléculas resultantes de la degradación de los polímeros. Para la mejora continua de los biomateriales y sus aplicaciones.

### **3.1.6 SECRECIONES MAMARIAS**

Las secreciones mamarias son una parte normal de la función mamaria durante el embarazo o la lactancia. También puede estar asociado con cambios hormonales menstruales y cambios fibroquísticos[76]. La secreción lechosa después de la lactancia normalmente afectará ambos senos y puede continuar hasta dos o tres años después de dejar de amamantar[77]. Sin embargo las secreciones mamarias anormales no lactacionales (es decir, el paciente no está embarazada o tiene más de 2 años de la última lactancia materna), a menudo este tipo de secreción es persistente y unilateral, generalmente por un solo conducto[78]. Estas secreciones son comúnmente causadas por afecciones benignas como papilomas introductores, ectasia del conducto, papilomatosis, mastitis, cambios fibroquísticos, etc.[78] La incidencia informada de carcinoma de mama en las secreciones mamarias es de 7 a 15%. No obstante la mayoría de los pacientes con cáncer de mama que se manifiestan con secreciones aisladas tienen una enfermedad en etapa temprana asociada con carcinoma ductal in situ[78].

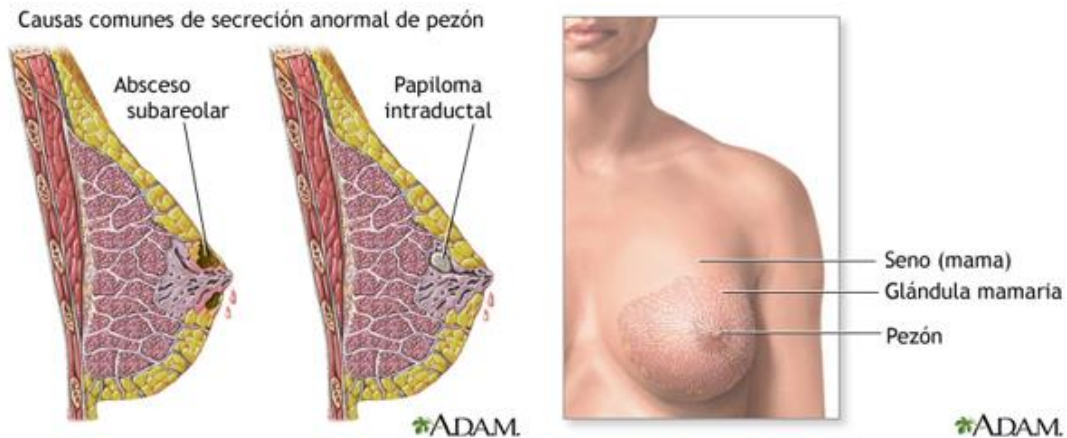


Figura 10 Ilustración de secreción anormal en el pezón y estructura general de las glándulas mamarias[76].

El color en las secreciones mamarias es una de las características más directas tanto para los pacientes como para los médicos, debido a que es un reflejo de las sustancias químicas del tejido mamario en cierta medida[79]. Siendo el primer síntoma alarmante para los pacientes[79]. La secreción del pezón puede ser de varios tipos: (1) lechosa, (2) multicolor y pegajosa, (3) purulenta, (4) clara y acuosa, (5) amarilla o serosa, (6) rosada o serosanguínea, o (7) sanguinolenta[79]. Recientes investigaciones apuntan que los pacientes con secreción del pezón con sangre podrían tener un mayor efecto relativo al cáncer de mama que la secreción del pezón clara / serosa, por lo tanto, los pacientes que presentan sangre en la secreción tenían más probabilidades de ser considerados sospechosos de malignidad[79]. Si bien las descargas de los pezones requieren una evaluación sistemática para determinar la etiología, la descarga de los pezones con sangre podría predecir el riesgo de cáncer de mama entre los diferentes colores de las descargas. No obstante, aún se necesitan estudios adicionales intensivos basados en muestras de mayor tamaño para obtener una evaluación más precisa de la sensibilidad y especificidad de la secreción del pezón con sangre como indicador del riesgo de cáncer de mama. Por lo tanto, los pacientes con secreción del pezón como el primer síntoma pueden beneficiarse de tratamientos adicionales mínimamente invasivos pero eficaces[79].



Figura 11 Ilustración de secreción anormal en el pezón y estructura general de las glándulas mamarias[80].

### **3.1.7 BIOCOPATIBILIDAD**

La biocompatibilidad es la habilidad de un material de actuar dentro del organismo sin producir una reacción desfavorable en el paciente, en una aplicación específica[81]. Dentro de los criterios básicos de la ingeniería tisular es la adecuada selección del material, siendo de vital importancia que este sea biocompatible, no tóxico, químicamente estable, etc. [82]. Para ello el estudio de la biocompatibilidad se expresa como la descripción y caracterización de una respuesta reproducible por parte del tejido biológico al estar en constante convivencia con determinado material[83]. Por lo cual la importancia de su estudio, deriva de la necesidad de conocer la diferencia que existe entre un tejido vivo y un material al estar dentro del organismo; pudiendo desencadenar tanto efectos beneficiosos como perniciosos[83].

Dentro de los estudios en la primera fase de evaluación de los biomateriales y equipos médicos implantables, los ensayos de citotoxicidad *in vitro* conforman una ruta simple, rápida y económica para obtener valiosa información acerca de la biocompatibilidad de los biomateriales[84]. Internacionalmente existe las normas ISO 10993-4, ISO 10993-5, y la ASTM F756-17, las cuales hablan acerca de la evaluación biológica en los dispositivos médicos; describiendo las diferentes pruebas para evaluar la citotoxicidad y porcentaje de hemólisis *in vitro* de dispositivos médicos. Estos métodos especifican la incubación de células cultivadas

y extracción de sangre, en contacto con un dispositivo y / o extractos de un dispositivo, ya sea directamente o por difusión. Las pruebas están diseñadas para determinar la respuesta biológica de células *in vitro* de mamífero usando parámetros biológicos apropiados[85][86]. Uno de los ensayos principales incluidos en la norma para la evaluación de la viabilidad celular son los ensayos de hemólisis y el ensayo MTT.

### 8.5.1 ENSAYO DE HEMÓLISIS ACORDE A LA NORMA ASTM F756-17

La sangre es un fluido presente en la mayoría de los organismos, cuya función radica en el transporte de nutrientes, oxígeno, productos excretores y endocrinos a través de ubicaciones definidas del cuerpo[87]. Los diferentes componentes de la sangre tienen diversas funciones: los glóbulos rojos transportan oxígeno, los glóbulos blancos combaten las infecciones y las plaquetas ayudan en la coagulación de la sangre[87], por lo que el contacto que la sangre dentro del organismo pueda tener con sustancias ajenas o extraños al cuerpo, desencadena generalmente una serie de alteraciones hematológicas, tales como: inflamaciones, coagulación y hemólisis[88]. En términos generales, la falta de hemocompatibilidad deriva en la coagulación de la sangre en presencia de un cuerpo extraño e implica un riesgo de trombosis relacionado con esta coagulación. Al ser parte de la biocompatibilidad, evaluar la hemocompatibilidad es una prueba de evaluación inicial para obtener un efecto biológico para ambas categorías de dispositivos, comunicación externa e implantes que entran en contacto con sangre circulante o no circulante[88].

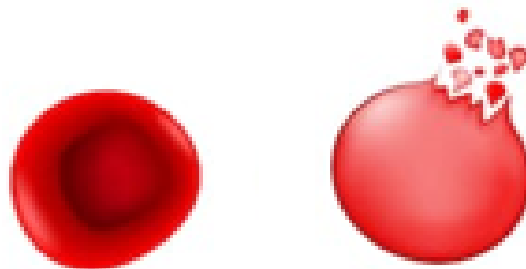


Figura 12 Esquema de la hemólisis de los eritrocitos, al izquierda de la imagen se observa un glóbulo rojo en su estado normal, a la derecha es un eritrocito que ha sufrido un proceso de hemólisis liberando hemoglobina y otro tipo de proteínas[89].

Hablando específicamente de la hemólisis, este proceso resulta esencialmente del aumento de la presión osmótica de los glóbulos rojos (eritrocitos). Durante la hemólisis, se produce la ruptura de los glóbulos rojos dando pie a la liberación de hemoglobina[88]. El porcentaje de hemólisis representa la extensión de los glóbulos rojos rotos por la muestra en contacto con la sangre total. Cuanto mayor sea el número de glóbulos rojos rotos, mayor será el porcentaje de hemólisis[90].

La Figura 13 muestra un esquema general del proceso llevado a cabo para un ensayo de hemólisis. Primeramente la sangre anti coagulada se centrifuga y se lava con solución salina tamponada con fosfato (PBS)/ solución Alsever tres a cinco veces en una centrífuga, para extraer completamente el suero y obtener glóbulos rojos. Después, 10 µl de glóbulos rojos se transfieren a un micro tubo de 2 ml, se afora con 990 µl de agua (como control positivo) y buffer PBS/solución Alsever (como control negativo), respectivamente. Las muestras se exponen luego a una suspensión de glóbulos rojos que contiene 10 µl de glóbulos rojos y 990 µl de buffer PBS/solución Alsever, respectivamente[90][91]. Las mezclas anteriores se incuban luego a 37 ° C durante 30min, seguido de centrifugación de acuerdo con diferentes investigadores (10,000 rpm; 3 min. o 2000 rpm; 5 min. o 2500 rpm; 5 min.)[91]. Luego, el sobrenadante será analizado mediante espectrofotometría UV-Vis a 415 nm[90]. El porcentaje de hemólisis se calcula utilizando la siguiente ecuación 8.4. La norma establece un rango en el cual dependiendo del porcentaje de hemólisis presente, se clasificará el material en tres categorías 1) no hemotóxico, 2) ligeramente hemotóxico, y 3) hemotóxico como se aprecia en la Tabla 3[86].

$$\text{Porcentaje hemólisis} = \frac{A_M - A_{CN}}{A_{CP} - A_{CN}} \times 100 \quad (8.4)[90]$$

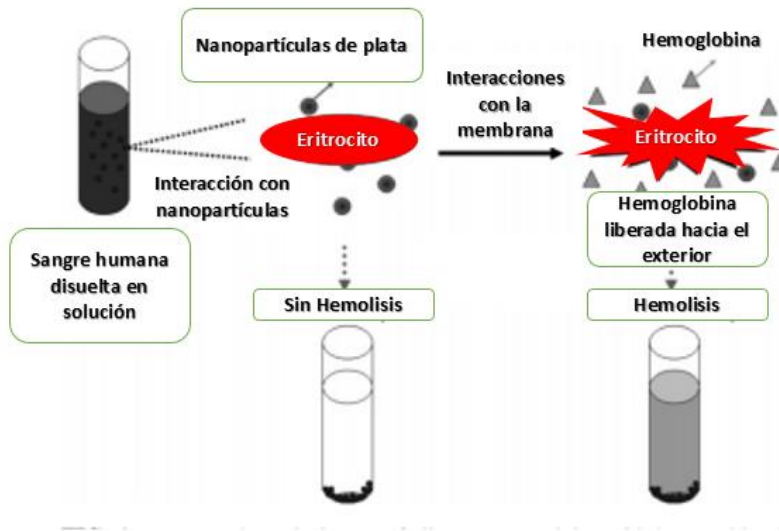


Figura 13 Esquema ensayo hemolisis de acuerdo a las normas ISO-10993-4 y ASTM 756-17: [92].

Tabla 3. Clasificación de hemotoxicidad acorde al porcentaje de hemolisis

Porcentaje de hemolisis	Hemotoxicidad
0 - <2%	No hemotóxico
2 – 5%	Ligeramente hemotóxico
> 5%	Hemotóxico

### **3.1.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN**

Las técnicas de caracterización nos permiten conocer más fondo la composición química y morfológica del material que se está sintetizando, a continuación se describirán los fundamentos de cada técnica de caracterización que se llevaran a cabo a lo largo de este proyecto.

#### **3.1.8.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)**

En un microscopio electrónico de barrido se barre mediante un rastreo programado la superficie del sólido con un haz de electrones de energía elevada y como consecuencia de ello se producen en la superficie diversos tipos de señales. Estas señales incluyen electrones retrodispersados, secundarios y Auger (Figura 14); fotones debidos a la fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías. Todas estas señales se han utilizado en estudios de superficies, pero las más usuales son las que corresponden a: (1) electrones retrodispersados y secundarios, en los que se fundamenta el microscopio de barrido de electrones y (2) la emisión de rayos X, que se utiliza en el análisis con microsonda de electrones.

A continuación se presenta un esquema con las partes que tiene un microscopio electrónico de barrido, este dispositivo emplea un cañón de electrones además de un sistema de focalización de electrones, esta señal es detectada por un detector de electrones que envía la señal al pantalla de rayos catódicos para procesar la señal y generar la imagen[93].

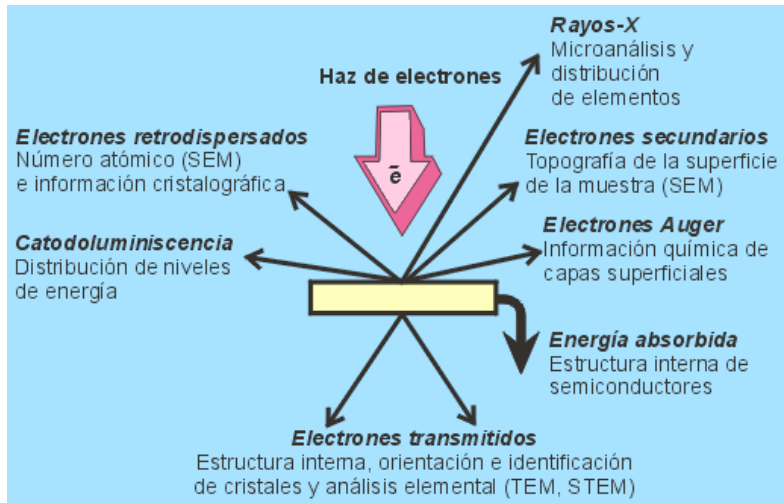


Figura 14 Diferentes tipos de señales arrojadas por el material al momento de que el incide el haz de electrones[94].

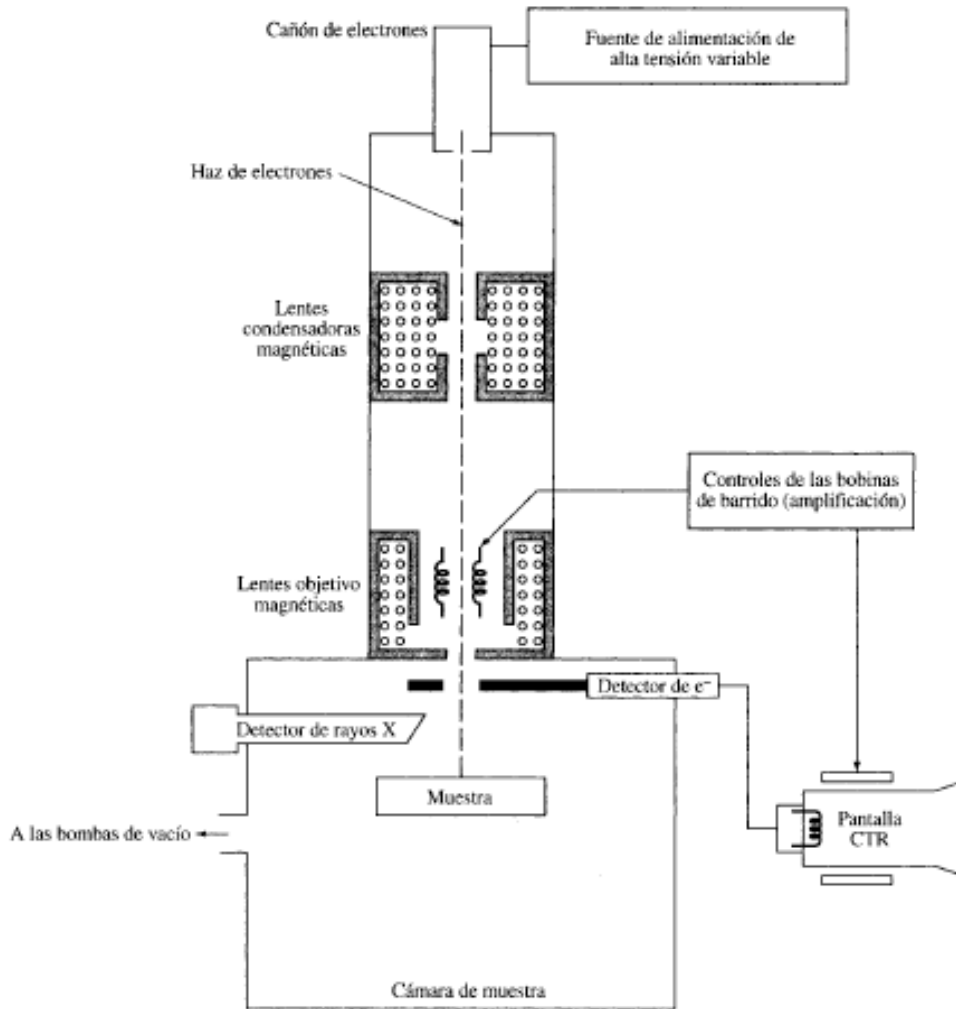


Figura 15 Esquema general de un microscopio electrónico de barrido/SEM[93]

### 3.1.8.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER FTIR

En la espectroscopía infrarroja, la radiación Infrarroja (IR) pasa a través de una muestra. Parte de la radiación infrarroja es absorbida por la muestra y parte de ella es transmitida. El espectro resultante representa la absorción y transmisión, creando una huella digital molecular de la muestra. Al igual que una huella dactilar, no hay dos estructuras moleculares únicas que produzcan el mismo espectro infrarrojo. Esto hace que la espectroscopía infrarroja sea útil para varios tipos de análisis[95]. El proceso de adquisición de la señal ocurre de la siguiente manera:

1. *La fuente:* la energía infrarroja se emite desde una brillante fuente de cuerpo negro. Este rayo pasa a través de una abertura que controla la cantidad de energía presentada a la muestra.[95]
2. *El Interferómetro:* el haz entra al interferómetro donde tiene lugar la "codificación espectral". La señal del interferograma resultante sale del interferómetro[95].
3. *La muestra:* el rayo entra al compartimento de la muestra donde se transmite o se refleja a través de la superficie de la muestra, según el tipo de análisis que se realice. Aquí es donde se absorben las frecuencias específicas de energía, que son características de la muestra[95].
4. *El detector:* el rayo finalmente pasa al detector para la medición final. Los detectores utilizados están especialmente diseñados para medir la señal especial del interferograma[95].
5. *La computadora:* la señal medida se digitaliza y se envía a la computadora donde tiene lugar la transformación de Fourier. El espectro infrarrojo final se presenta al usuario para la interpretación y cualquier manipulación posterior[95].

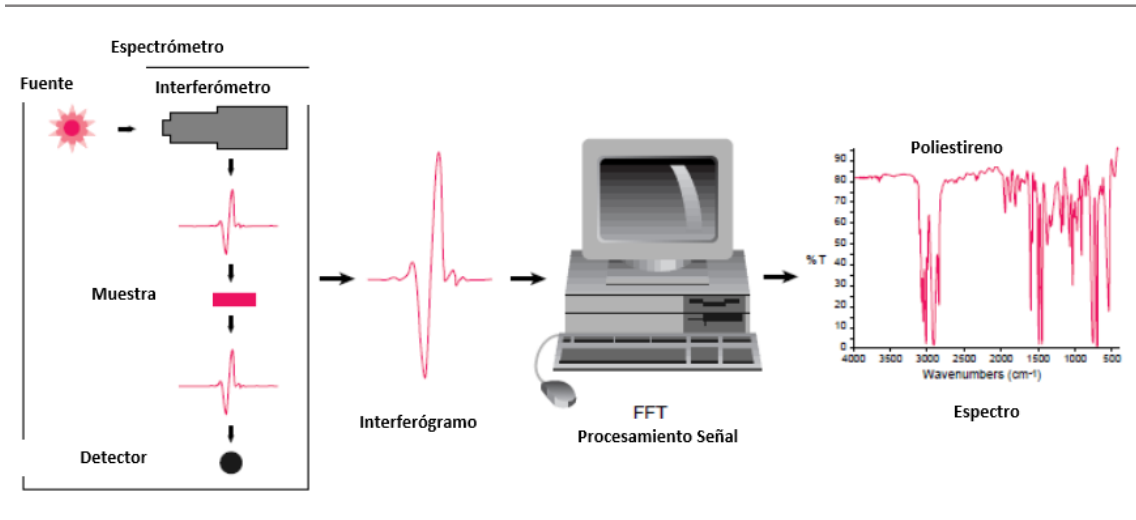


Figura 16 Proceso de adquisición de señal espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)[95].

## CAPÍTULO IV

### 4.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación se describe la metodología que se llevará a cabo a lo largo de esta investigación.

#### 4.1.1 LISTA DE MATERIALES

- Tabletas PBS(Sigma-Aldrich)
- Urea (J.T. Baker)
- 2-mercaptoetanol(Sigma-Aldrich)
- EDTA(Sigma-Aldrich)
- Tris Base (Sigma-Aldrich)
- SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 35mm dry diameter (ID) x 10.7m (Thermo-Scientific)
- Ácido clorhídrico HCl (J.T. Baker)
- Agua destilada
- Tetraetilortosilicato TEOS (Sigma-Aldrich)
- Biofibra de pluma de pollo
- SDS (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.2 OBTENCIÓN EXTRACTO DE QUERATINA

Primeramente se pesó 1g de biofibra de pluma de gallo (*Gallus gallus domesticus*), se puso bajo agitación orbital por 12 Hrs a una temperatura de 60°C junto con una solución de Urea al 7M, 0.6g de SDS (dodecilsulfato sódico) y 1.5 ml 2-mercaptoetanol (Tabla 4), posterior a ello, se hizo un proceso de diálisis con agua destilada cambiando el agua cada 24 Hrs, durante 5 días, usando una membrana de celulosa *SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 16 mm dry I.D*, acto seguido

se congeló la muestra durante 24 Hrs a  $-20^{\circ}\text{C}$  , se liofilizó a una temperatura de  $-85^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0.175 mbar en un liofilizador marca *Labconco Freezone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System* durante un periodo de 24 Hrs.

Tabla 4. Lista de reactivos empleados para la extracción de la queratina

Reactivos	Cantidades
Biofibra de pluma de gallo	1 g
Urea	7 M
SDS (Dodecil sulfato de sodio)	0.6 g
2 mercaptoetanol	500 $\mu\text{l}$

### 9.2.1 CARACTERIZACIÓN EXTRACTO DE QUERATINA

Para la caracterización de la Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR). Se usó un espectrómetro *Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer*. Se colocó una pequeña parte de cada muestra (biofibra y extracto de queratina) en la parte central de cristal, cada uno de los espectros fueron obtenidos en un rango de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ , con un número de 128 escaneos a una resolución de 4. Se hizo uso de un microscopio *HITACHI SU5000 SEM* con un detector EDS *Bruker Xflash 6160*. Para ello previamente se tomó una pequeña parte de la biofibra de pluma de pollo y del extracto de queratina. Ambas muestras fueron colocadas en porta muestras específico para SEM con una cinta de carbono de doble vista, las muestras fueron trabajadas en alto vacío usando con voltaje de aceleración de 20kV.

### 4.1.3 SÍNTESIS HIDROGELES QUERATINA-SÍLICE

Previo a la síntesis del hidrogel se preparó una solución stock de queratina, usando como base el extracto de queratina anteriormente liofilizada, se utilizó buffer de fosfato salino (PBS 1X a pH 7.4) como disolvente, teniendo una concentración final de 20mg/ml. Posteriormente se preparó la solución de Tetraetilortosilicato (TEOS), reactivo precursor para la obtención de sílice. Esta solución fue preparada con agua destilada y la cantidad de TEOS está en función de tres relaciones de queratina-sílice desde 1:1, 1:4 y 1:7 (p/p) (Tabla 5). Después se midió el pH de la solución de TEOS y se acidificó usando una solución de HCl 1N hasta llegar a un pH cercano a 2.5, por último fue sonicada por 30 segundos en un ultrasonificador (*Ultraturrax Ultrasonic Processor Ultraschallprozessor UP50H Hielscher*), para una mayor homogenización. Una vez acidificada la solución de TEOS, ambas soluciones, fueron vertidas en un vaso de precipitado de 10mL, y fueron mezcladas el sonicador por 1 minuto, se verificó el pH y se ajustó hasta un pH de 7 usando una solución de NaOH 1M, de nueva cuenta la muestra fue sonicada por 30 segundos y vaciada en un tubo de rosca para observar su gelación, en un periodo de 1 hora. En el caso del hidrogel sin queratina (0:1) únicamente se preparó la solución de TEOS agregando 300 µL de TEOS y 1.7 mL de agua destilada, fue sonicada por 30 segundos y acto seguido fue vertida en un tubo de rosca, hasta observar gelación, alrededor de 48 horas.

Tabla 5. Diseño de experimentos relación hidrogeles queratina-sílice. A continuación se explica a detalle la cantidad de reactivo que se usó para la elaboración de cada uno de los hidrogeles.

Reactivos	1:1	1:4	1:7	0:1
Queratina (2 ml PBS 1X)	40 mg	40 mg	40 mg	0mg
Solución TEOS (2 ml H <sub>2</sub> O Destilada)	40 mg	160 mg	280 mg	280mg

### 4.1.3 CARACTERIZACIÓN HIDROGELES QUERATINA-SÍLICE

Para su caracterización en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), previamente se tomó una porción de cada uno de los hidrogeles de queratina-sílice, se guardaron en vasos de precipitado de 10mL y se congelaron por 24 Hrs a -20°C. Posteriormente, para retirar el contenido de agua en el material, y que el gel conserve su microestructura porosa se procederá a liofilizarlas a -85°C y a una presión de 0.175mbar durante 4 horas. Acto seguido, los geles 0:1, 1:4, 1:7, liofilizados fueron colocados en portamuestras especiales para SEM, en una cinta de carbono de doble vista, las muestras fueron trabajadas en alto vacío y con un voltaje de aceleración de 20 Kv. Para la caracterización de los hidrogeles mediante la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Se colocó una pequeña fracción de cada los hidrogeles queratina-sílice en relación 0:1, 1:4 y 1:7, en la parte central de cristal, cada uno de los espectros fueron obtenidos en un rango de 4000 cm<sup>-1</sup> a 500cm<sup>-1</sup>, con un número de 128 escaneos.

### 4.1.4 PRUEBA DE HINCHAMIENTO

La evaluación de la pérdida de agua en los hidrogeles de queratina- sílice, se realizó de manera reversa, debido a la naturaleza de estos geles en particular que nacen hinchados, esta prueba se realizó por triplicado. Primeramente se pesó cada uno de los geles en ambas relaciones (1:4 y 1:7) antes de iniciar con el estudio, después cada dos horas se fue tomando el peso de cada una de las muestras. Este procedimiento se siguió repitiendo hasta observar que la medición peso de las muestras se mostrara constante. Los resultados obtenidos de esta prueba se analizaron con base en la siguiente ecuación (Ecuación 4):

$$\text{Grado de hinchamiento} = \frac{W_H - W_S}{W_H} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde **Ws** es el peso del hidrogel hinchado, **Wh** es el peso inicial del hidrogel.

#### 4.1.5 PRUEBAS DE DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA

Las pruebas de degradación hidrolítica fueron realizadas en una solución Buffer Salino de fosfato (PBS) con un pH de 7.4. Se preparó un litro de PBS, del cual separamos 300 ml de tal, para reducir el pH a 5.4 y otros 300 ml de PBS para reducir su pH a 6.8. Para reducir el pH del PBS de 7.4 a 5.4 se le agregaron 2.5 ml de ácido clorhídrico 1N, y para reducirlo de 7.4 a 6.8 se le agregaron 1.5 ml de ácido clorhídrico 1N. Se prosiguió a cortar muestras de hidrogel de queratina-sílice con una medida aproximada de 0.5 x 0.5 cm<sup>2</sup>, se pesaron y fueron expuestas a las soluciones de PBS con pH de 5.4 y 6.8. Se mantuvieron en degradación en una microplaca, a diferentes periodos de tiempo: 1 día, 2 días, 4 días, 8 días y 16 días, tal y como se muestra en la Figura 17. Al término de cada tiempo de degradación se pesó cada muestra para determinar la pérdida de peso en cada una, posterior a esto fueron caracterizadas.

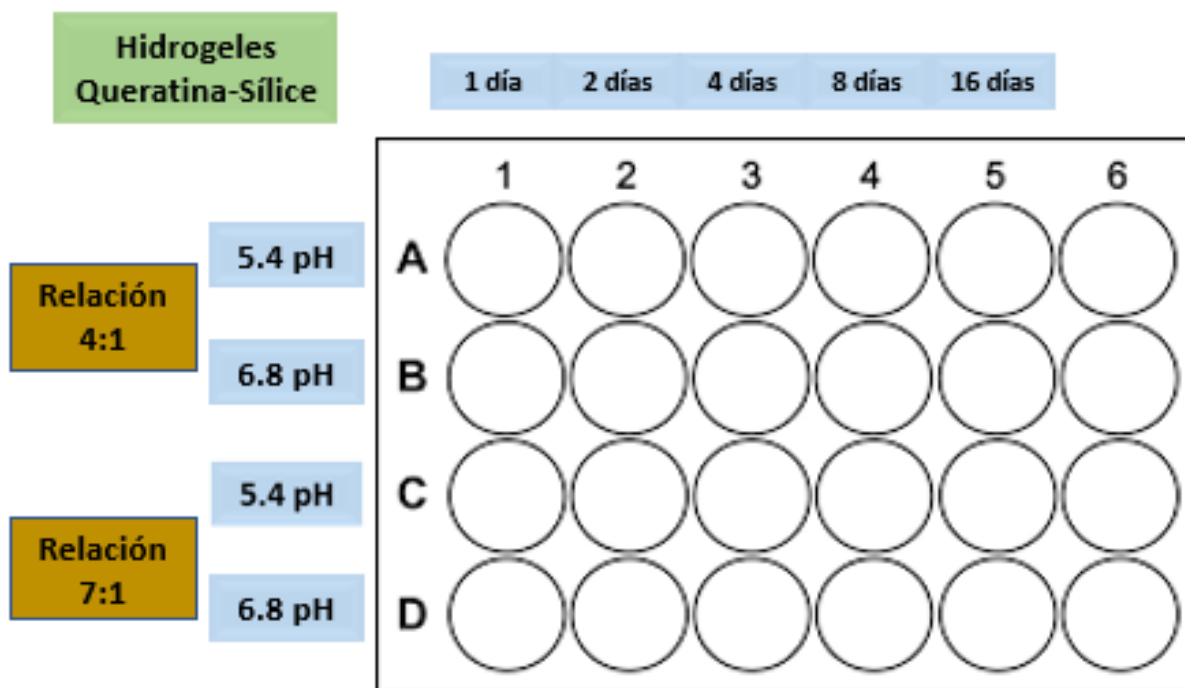


Figura 17 Esquema general de prueba de degradación hidrolítica a hidrogeles de queratina-sílice con relaciones de 1:4 y 1:7. Se empleó una microplaca de 24 pozos, utilizando dos tipos de pH (5.4 y 6.8) durante un lapso de 1, 2, 4, 8 y 16 días.

#### 4.1.5.1 CARACTERIZACIÓN MUESTRAS CON DEGRADACIÓN

Se colocó una pequeña fracción de cada uno de los hidrogeles queratina-sílice en relación 1:4 y 1:7, en la parte central de cristal, cada uno de los espectros fueron obtenidos en un rango de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 500 $\text{cm}^{-1}$ , usando un número de 128 escaneos, a una resolución de 4 $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.1.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

A continuación se presenta el diseño de experimentos que se usará para evaluar si alguno de los factores es significativo en el proceso, para ello se hará uso de un diseño factorial (Tabla 6).

Tabla 6 Diseño experimental pruebas de degradación hidrogeles queratina-sílice.

Proceso	Relación Queratina/Sílice	pH	Tiempo de degradación
Hidrogeles Queratina-Sílice	1:1	5.4	1 día
			2 días
	1:4	6.8	4 días
			8 días
	1:7		16 días

#### 4.1.7 ENSAYO DE HEMOLISIS

Previamente se preparó 100mL solución Alsever a un pH de 6.4 usando los componentes descritos en la Tabla 7, acto seguido se sacó 2mL de una muestra de sangre de un paciente sano, se colectó en un tubo para muestras de sangre con EDTA (anticoagulante natural), posteriormente se pasó a un tubo falcon de 15 mL, acto seguido se centrifugó la sangre a 3000 rpm por un tiempo de 3 minutos, esto con el objetivo de separar la sangre y obtener los glóbulos rojos. Después usando una pipeta Pasteur se retiró el sobrenadante con residuos de plasma, glóbulos

blancos. Luego se realizaron 3 lavados agregando al paquete de glóbulos rojos 10 mL de solución Alsever, se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos. Una vez finalizados los lavados, se prepararon las muestras para el ensayo de hemólisis en un microtubo de 2ml, añadiendo 990 µl de solución Alsever, 10 µl de glóbulos rojos µl y 2mg de hidrogel en las relaciones 1:4 y 1:7, así mismo se preparó un control positivo con 990 µl de agua y 10 µl de glóbulos rojos y un control negativo con 990 µl de solución Alsever y 10 µl de glóbulos rojos, realizándose por triplicado (Figura 18). Posteriormente se dejó incubando en baño maría a 37 °C a 200 rpm por 30 min, después se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos. Por último se llevó a leer las muestras a un espectrofotómetro UV-Vis *Nanodrop 2000 Thermo Scientific* usando 5 µl a una longitud de onda de 415nm.

Tabla 7 Lista de reactivos para preparación solución Alsever.

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidades</b>
<b>Dextrosa (0.166M)</b>	2.9906 g
<b>NaCl (0.071M)</b>	0.4149 g
<b>Citrato de sodio (0.027M)</b>	0.7941 g
<b>Ácido cítrico (0.002M)</b>	0.0384 g

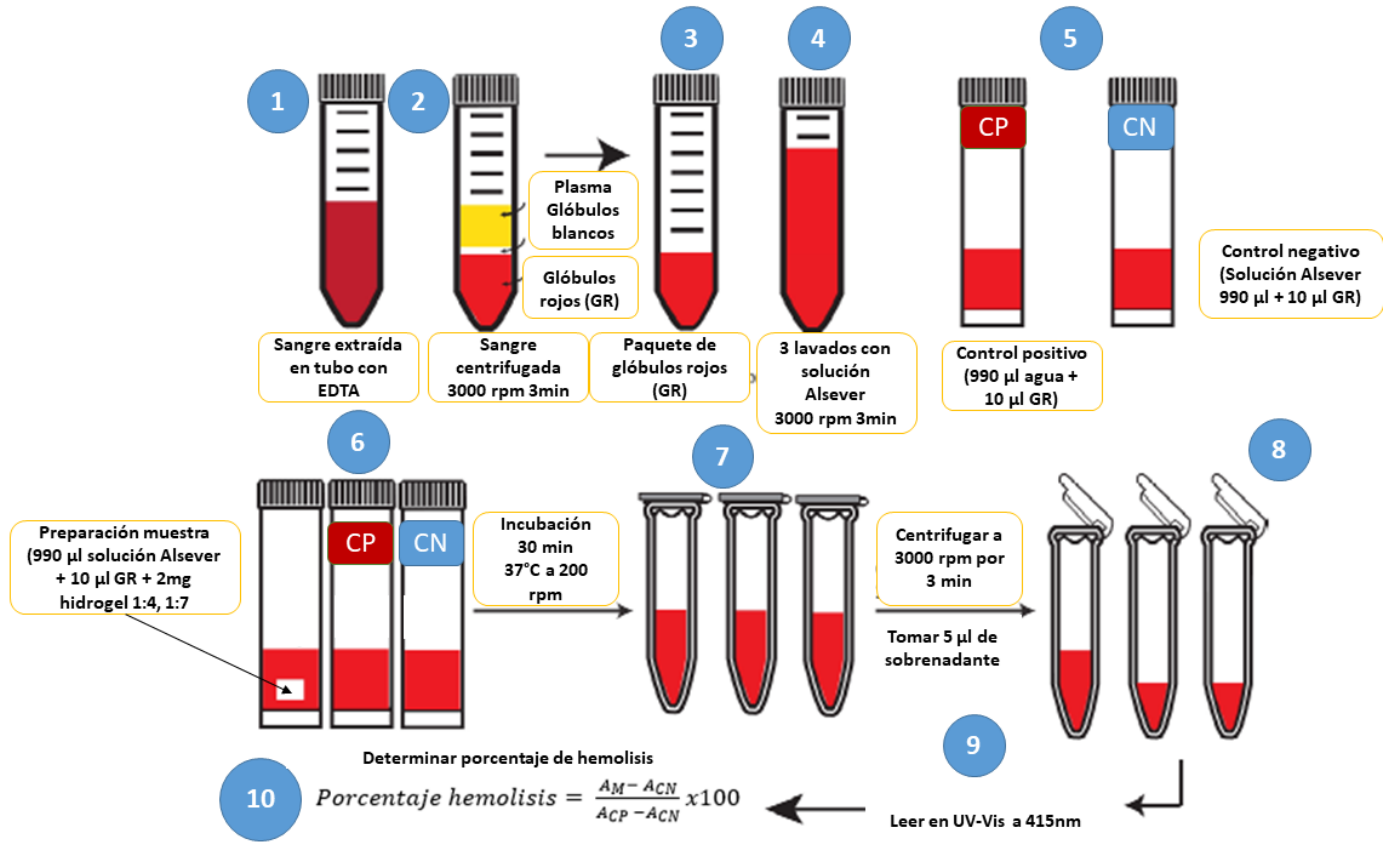


Figura 18. Esquema general de ensayos de hemolisis

#### 4.1.8 ENSAYO DE HEMOLISIS EXTENDIDO

Nuevamente se preparó 100mL de solución Alsever a un pH de 6.4 usando los componentes descritos en la Tabla 8, posteriormente se sacó 4ml de una muestra de sangre de un paciente sano, se colecto en un tubo para muestras de sangre con EDTA (anticoagulante natural), acto seguido se pasó a un tubo falcon de 15 ml, y se centrifugo a 3000 rpm durante 3 minutos, Después se retiró el sobrenadante y luego se realizaron 3 lavados agregando al paquete de glóbulos rojos 10 mL de solución Alsever, y se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos. Una vez finalizados los lavados, se prepararon las muestras para el ensayo de hemolisis en un microtubo de 2ml, se añadió 990 µl de solución Alsever, 10 µl de glóbulos rojos µl y 2mg de hidrogel en las relaciones 0:1, 1:4 y 1:7, así mismo se preparó un control positivo con 990 µl de agua y 10 µl de glóbulos rojos y un control negativo con 990 µl de solución Alsever y 10 µl de glóbulos rojos, realizándose por triplicado (Figura 18). Después se dejó incubando en baño maría a 37 °C a 200 rpm por 30 min, luego se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos. Por último se llevó a leer las muestras a un espectrofotómetro UV-Vis *Nanodrop 2000 Thermo Scientific* usando 5 µl a una longitud de onda de 415nm. Dado que la prueba tuvo una duración de 8 días, los microtubos fueron almacenados a 4°C y se realizó cada lectura en un intervalo de 24 horas, dado como resultado un total de 5 mediciones.

## CAPÍTULO V

### 5.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1.1 EXTRACTO DE QUERATINA Y BIOFIBRA

##### 5.1.1.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

En la Figura 19 se observan los espectros resultantes la biofibra pluma de gallo así como del extracto de queratina. La Figura 19A corresponde al espectro FTIR de la biofibra, en donde se encontraron diferentes bandas relativas a grupos funcionales atribuidos a la proteína queratina: la banda  $3288\text{ cm}^{-1}$  está relacionada con el estiramiento de enlaces  $\nu(\text{NH})$ , también denominada Amida A [96]. Las bandas a  $2921\text{ cm}^{-1}$  y  $2857\text{ cm}^{-1}$ , ambas están asociadas a vibraciones asimétricas del metilo  $\nu(\text{CH}_3)$  y vibraciones asimétricas del metileno  $\nu(\text{CH}_2)$  [97], por otro lado las bandas encontradas en  $1635\text{ cm}^{-1}$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a estiramiento del enlace  $\nu(\text{C}=\text{O})$  y es asignada a la Amida I [96][98], en particular la intensidad de la banda de  $1650\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con respecto a una predominante conformación de  $\alpha$ -hélice [97], así mismo se observa una banda  $1538\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la Amida II [96] la cual está directamente relacionada con una conformación  $\beta$ -laminar; los péptidos y las proteínas con una estructura anti paralela  $\beta$ -laminar presentan fuertes bandas en este rango [97], en  $1391\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda relacionada con las vibraciones fuera del plano de  $\delta(\text{CH}_3)$  y  $\delta(\text{CH}_2)$  [97]. La banda identificada en  $1235\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la Amida III, principalmente a las vibraciones de estiramiento de  $\nu(\text{CN})$ ,  $\nu(\text{NH})$  y  $\delta(\text{C-O})$  [96].

Por otro parte en la Figura 19B se observa el espectro FTIR del extracto de la queratina, cuyas bandas mostraron una gran similitud con las del espectro de la biofibra, sin embargo, realizando un análisis más detallado se encontraron algunas diferencias que están directamente relacionadas con el proceso de extracción. Se

observa que se encuentra presentes: la banda  $3292\text{ cm}^{-1}$  (Amida A),  $2921\text{ cm}^{-1}$  y  $2852\text{ cm}^{-1}$  (correspondientes a  $\nu(\text{CH}_2)$  y  $\nu(\text{CH}_3)$ ) las cuales en comparación con el espectro A muestra un aumento de intensidad presente en ambas bandas.  $1654\text{ cm}^{-1}$  y  $1645\text{ cm}^{-1}$  (Amida I) con una conformación predominante de  $\alpha$ -hélice.  $1546\text{ cm}^{-1}$  y  $1538\text{ cm}^{-1}$  (Amida II) que están relacionadas a una estructura anti-paralela de  $\beta$ -laminar, por lo que ambas conformaciones no se vieron afectadas por el proceso de extracción.  $1388\text{ cm}^{-1}$  (relacionadas a vibraciones de  $\delta(\text{CH}_3)$  y  $\delta(\text{CH}_2)$ ), la transmitancia de esta banda es mucho mayor en el espectro de la biofibra, esto se debe a que la intensidad de esta banda está vinculada a la cercanía de enlaces C-O[97]. Así mismo las bandas  $1243\text{ cm}^{-1}$  y  $1213\text{ cm}^{-1}$  (Amida III) mostrando un incremento en el tamaño de la banda con respecto al espectro anterior observándose, por lo que dicho incremento explica el tamaño de la banda  $1388\text{ cm}^{-1}$ .

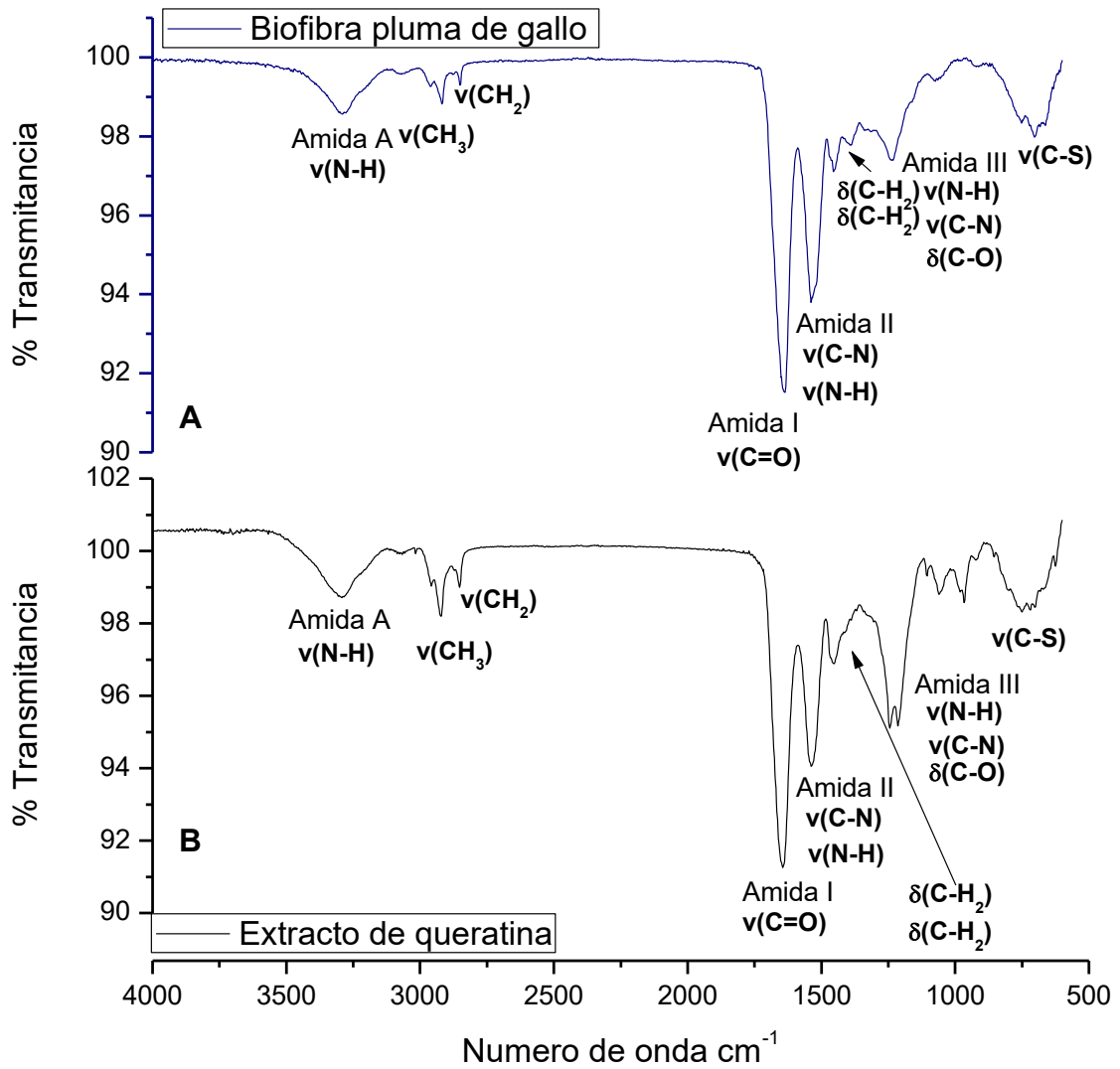


Figura 19 Espectros FTIR de la A) biofibra pluma de gallo y B) extracto de queratina. Ambos espectros muestran la presencia de bandas características de la proteína (Amida A, I, II y III).

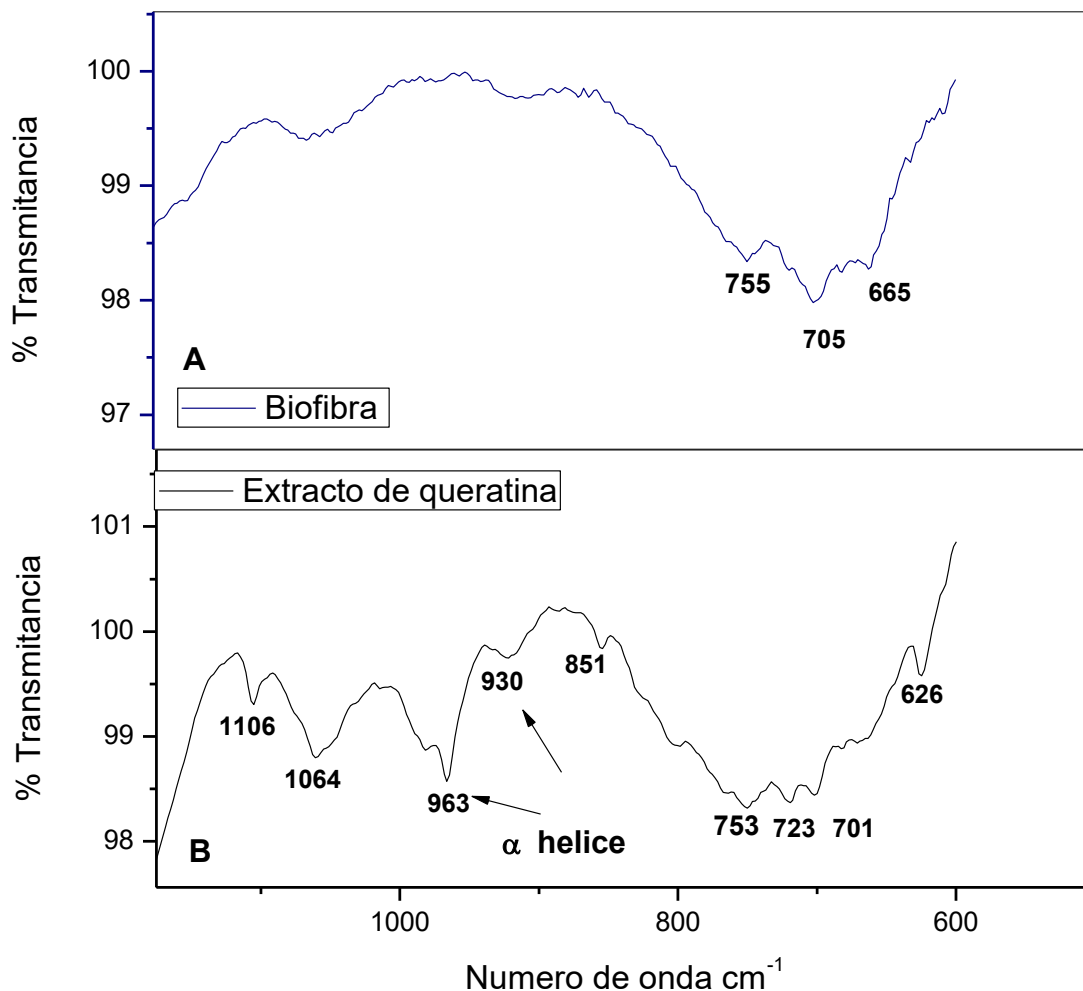


Figura 20 Espectros FTIR de la A) biofibra pluma de gallo y B) extracto de queratina analizados en la región de 1200 cm<sup>-1</sup> a 600 cm<sup>-1</sup>. Ambos espectros muestran una similitud en las bandas correspondientes a la metionina sin embargo el espectro del extracto se aprecian bandas que se relacionan con una conformación  $\alpha$ -hélice y con el proceso de extracción

En la Figura 20 se observa un análisis de los espectros de biofibra pluma de gallo y extracto de queratina en una región de 1200 – 600 cm<sup>-1</sup>, en la Figura 20A se observan tres bandas en específico 755 cm<sup>-1</sup>, 705 cm<sup>-1</sup> y 665 cm<sup>-1</sup>, las cuales corresponden a la vibración de estiramiento de enlaces  $\nu(\text{CS})$ [97]. En la Figura 20B en general se presenta un mayor número de bandas identificadas, primeramente las bandas 1106 cm<sup>-1</sup> y 1064 cm<sup>-1</sup> son atribuidas al monóxido y dióxido de ácido cisteico respectivamente, producto de la oxidación de los residuos de aminoácidos

de cisteína presentes en la biofibra al momento de la diálisis[97]. Las bandas  $963\text{ cm}^{-1}$  y  $930\text{ cm}^{-1}$  se relacionan directamente con la conformación característica de la queratina en  $\alpha$ -hélice. Por último el conjunto de bandas  $753\text{ cm}^{-1}$ ,  $723\text{ cm}^{-1}$ ,  $701\text{ cm}^{-1}$  y  $626\text{ cm}^{-1}$  de igual manera se relacionan con la vibración de estiramiento de enlaces  $\nu(\text{CS})$ [97].

#### **5.1.1.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)**

En la Figura 21 se puede apreciar las diferentes micrografías obtenidas de la biofibra de pluma de gallo y el extracto de queratina a diferentes magnificaciones. La Figura 21A, se muestra una micrografía de la biofibra de pluma de gallo a una magnificación de 80X, donde se observa una morfología en forma de fibras con diferentes tamaños y grosores, así mismo en la Figura 21B con una magnificación de 500X se aprecia que estas fibras están conformadas por un conjunto de fibras con mucho menor tamaño, las cuales se van uniendo unas con otras hasta formar una más grande. Por otro lado la Figura 21C corresponde al extracto de queratina a una magnificación de 80X, se observa un cambio importante en la morfología de la muestra, a comparación de la biofibra (Figura 21A), presentándose una morfología amorfa en forma de láminas, de igual manera en la Figura 21D, misma microestructura se observa a una magnificación de 600X, esto se atribuye a desnaturalización de la proteína, y principalmente a la liofilización realizada al final proceso de extracción, debido que al momento en que se retira el solvente, este tipo de muestra adopta dicha morfología[99].

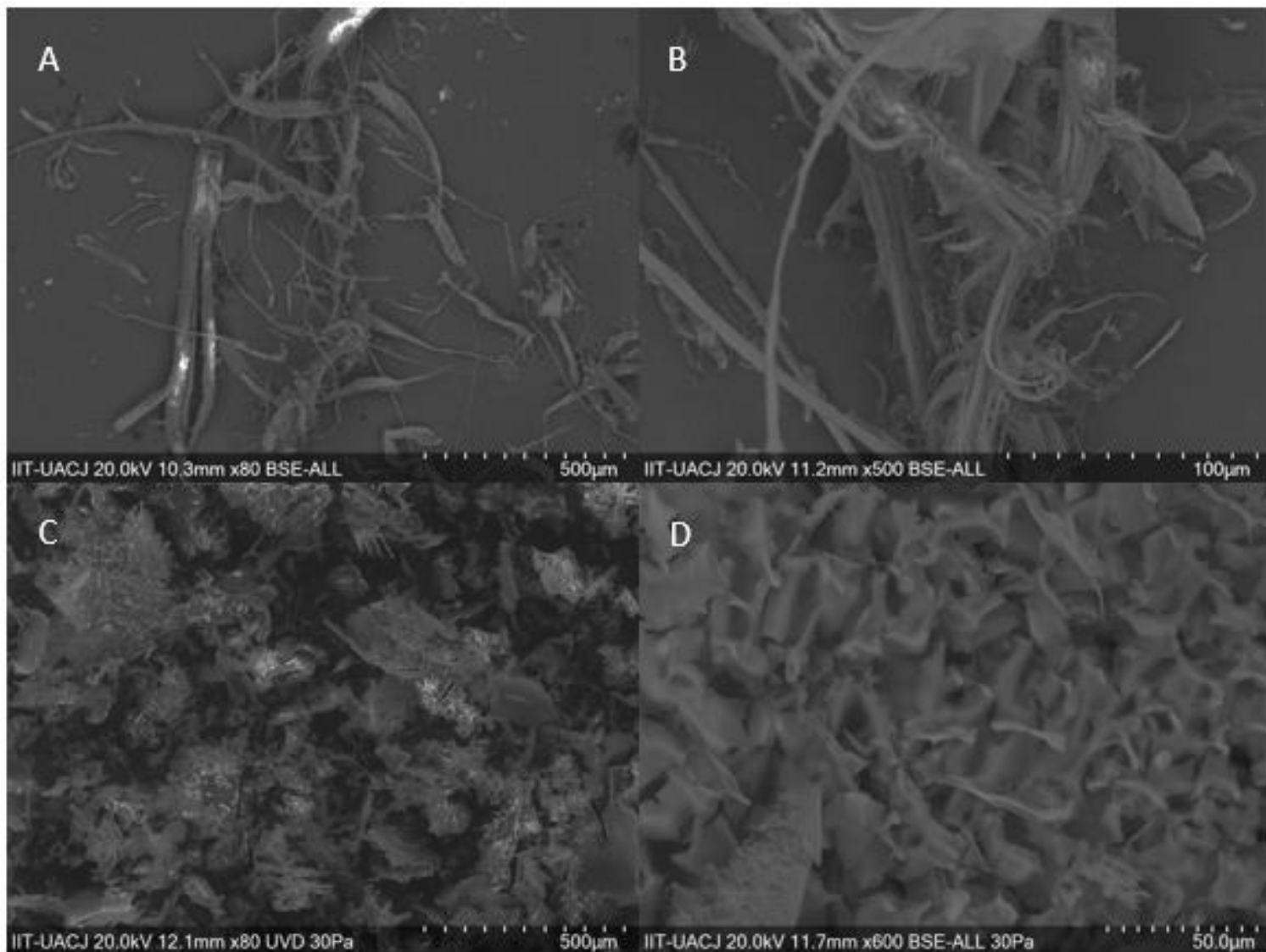


Figura. 21 Micrografías de biofibra pluma de gallo y extracto de queratina. A) Biofibra pluma de gallo magnificación 80X, se observa una morfología en forma de fibras. B) Biofibra pluma de gallo magnificación 500X, es posible apreciar que la conformación de cada una de estas fibras reside en la unión de fibras mucho más pequeñas. C) Extracto de queratina magnificación de 80X, a diferencia de la biofibra no se observan fibras definidas, si no con una morfología en forma de láminas producto de la liofilización D) Extracto de queratina magnificación de 600X.

#### 10.1.4 EDS

En la Figura 22 se observa un análisis de EDS realizado a la biofibra pluma de pollo, con los diferentes elementos presentes en la muestra: carbono(C) 72%, nitrógeno(N) 9%, oxígeno(O) 18% y azufre(S) 1%, todos los elementos presentes se encuentran en la mayoría de las biomoléculas y en particular los aminoácidos, unidades estructurales de las proteínas, además la presencia de azufre corresponde a los residuos de cisteína, uno de los aminoácidos con mayor presencia dentro de la secuencia polipeptídica de la queratina. Así mismo en la Figura 23 se muestra el análisis al extracto de queratina dando como resultado los siguientes elementos: carbono(C) 73%, nitrógeno(N) 6%, oxígeno(O) 18% azufre(S) 2% y calcio (Ca) 0.68%. El calcio presente en el EDS del extracto (Figura 23) se atribuye principalmente al agua empleada en la diálisis para la extracción de la queratina. Ambas muestras presentan una distribución similar de composición elemental, no obstante se observa una pequeña diferencia entre el porcentaje de nitrógeno y azufre, de ambas muestras, esto debido a la ruptura de enlaces intermoleculares en la desnaturalización de la queratina.

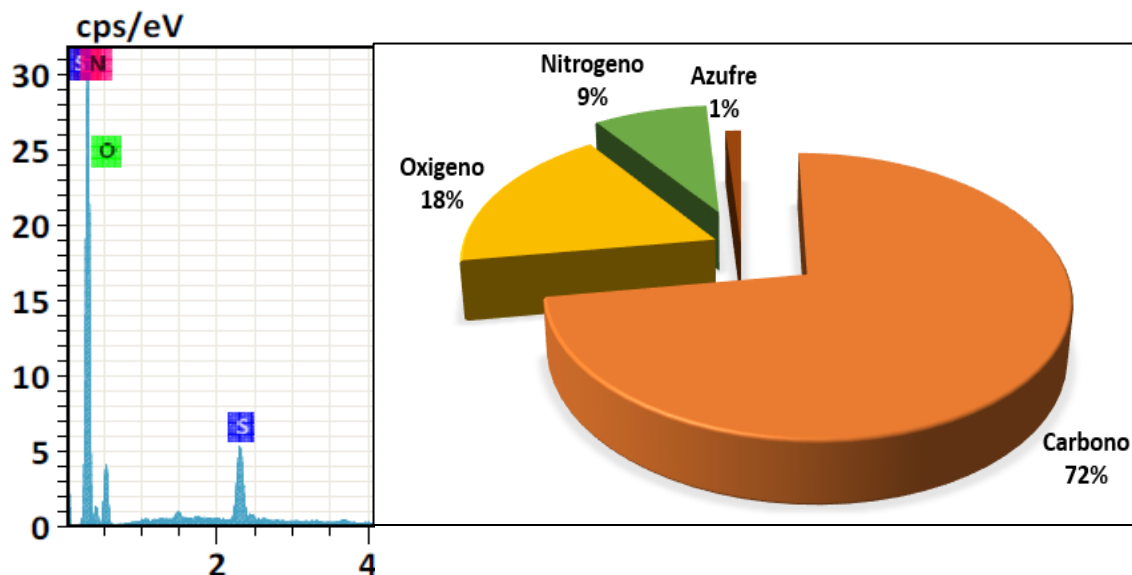


Figura 22 EDS de biofibra de pluma de gallo. El EDS realizado indicó la presencia de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre en la biofibra de pluma de pollo.

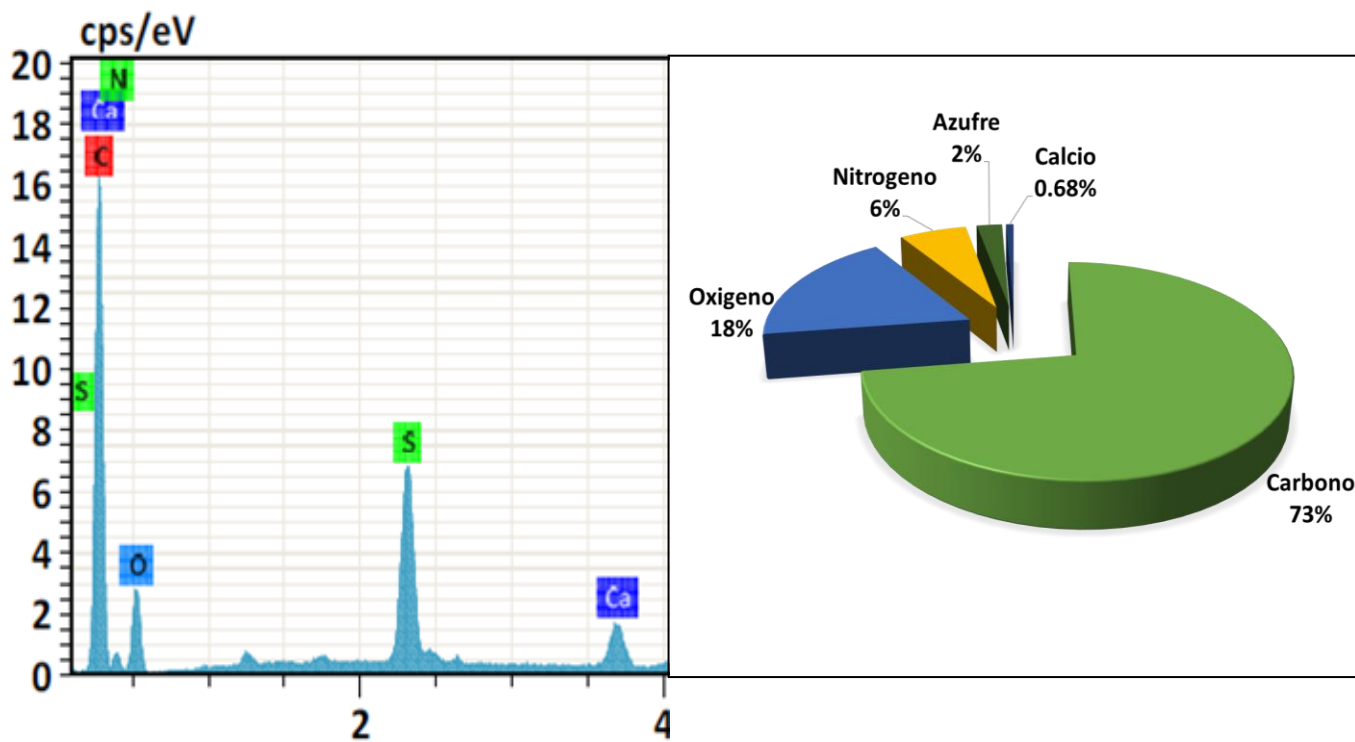


Figura 23 EDS de extracto de queratina. Las pruebas de espectroscopía de rayos X de energía dispersa demostraron la presencia de carbono, nitrógeno, azufre y calcio en extracto de queratina.

## 5.1.2 GELES QUERATINA SÍLICE 1:4 Y 1:7

### 5.1.2.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

La Figura 24 muestra los espectros FTIR resultantes de los hidrogeles de queratina-sílice con relación 1:4 y 1:7. El espectro de la relación 1:7 (Figura 24A) presenta las siguientes bandas:  $1641\text{ cm}^{-1}$ , asociada con el estiramiento de  $\nu(\text{C}=\text{O})$  en correlación Amida I [29][96].  $1553\text{ cm}^{-1}$  atribuida principalmente la Amida II [97].  $1083\text{ cm}^{-1}$  y  $986\text{ cm}^{-1}$  relacionados con enlaces (Si-O) y (Si-O-Si) con vibraciones asimétricas y simétricas respectivamente [100][101]. Estas bandas corroboran la formación de la matriz de sílice en la estructura del hidrogel [29]. Así mismo en la Figura 24B el espectro de la relación 1:4 presenta las siguientes bandas:  $1647\text{ cm}^{-1}$  (Amida I),  $1541\text{ cm}^{-1}$ , (Amida II)  $1086\text{ cm}^{-1}$  (Si-O) y  $980\text{ cm}^{-1}$  (Si-O-Si), presentándose una similitud entre ambos espectros debido a que solo se cambió la relación.

Sin embargo las bandas de la Amida I, Amida II el espectro de la relación 1:4 (Figura 24B) se observan con una mayor transmitancia con respecto al espectro de la relación 1:7 (Figura 24A), así mismo las bandas relacionadas a enlaces Si-O y Si-O-Si presentan una menor transmitancia con respecto relación 1:7 (Figura 24A), esto se atribuye principalmente a la cantidad de entrecruzante presente en los hidrogeles. Los espectros no muestran un tipo de banda relacionada a algún enlace formado entre la queratina y la matriz de sílice por lo que se infiere que la interacción entre los dos materiales está dado por interacciones físicas. La Figura 25 muestra el espectro de la relación 0:1, donde se aprecia a mayor detalle, las bandas características de la sílice:  $1083\text{ cm}^{-1}$  atribuida a estiramientos simétricos de los enlaces Si-O, de doble degeneración [102],  $959\text{ cm}^{-1}$  y  $789\text{ cm}^{-1}$  asociados a estiramientos simétricos de los enlaces Si-O-Si presentes en la microestructura [102].

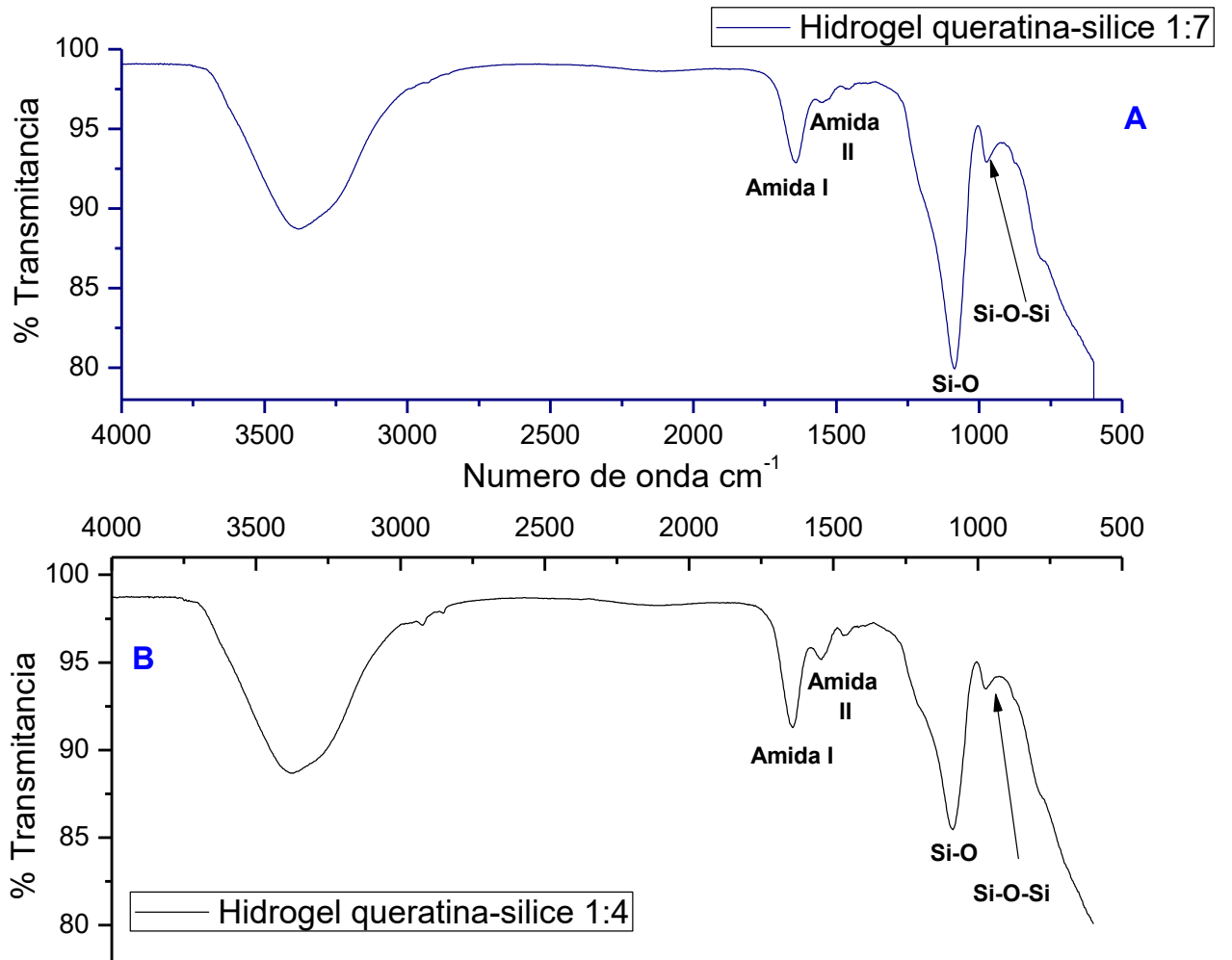


Figura 24 Espectros FTIR del A) Hidrogel queratina-silice 1:7 y B) Hidrogel queratina-silice 1:4. La relación de entrecruzante influye en la intensidad de las bandas concernientes a la queratina.

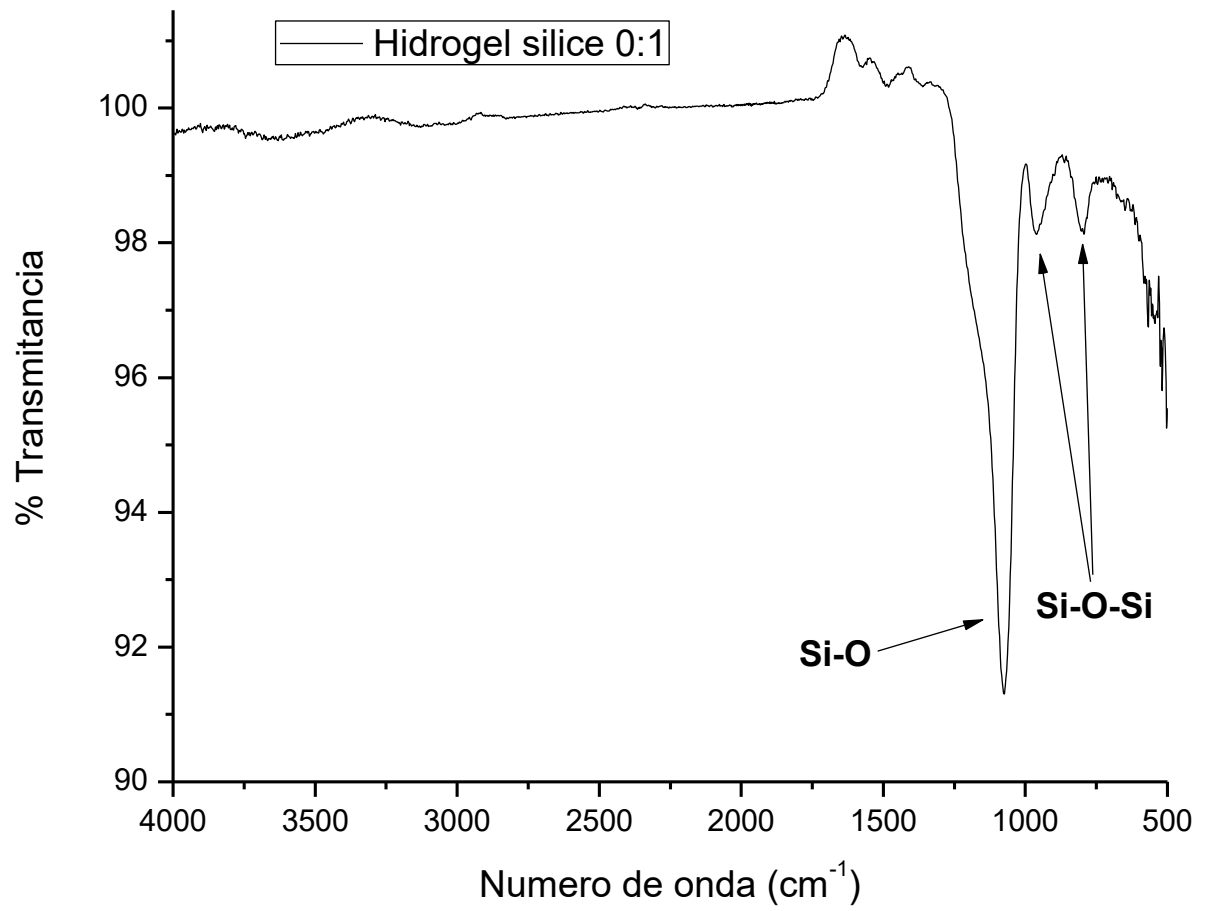


Figura 25 Espectro FTIR del hidrogel sílice 0:1. Se aprecia las dos bandas características de la sílice

### 5.1.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

En la Figura 26 se presentan las diferentes micrografías realizadas a los hidrogeles con relaciones de 1:4 y 1:7, la Figura 26A muestra una microestructura homogénea y porosa del hidrogel queratina-sílice con relación 1:7 a una magnificación de 130X, sin embargo a una magnificación de 350X (Figura 26B) se observa que el tamaño de estos poros es reducido y no tiene un tamaño uniforme. Por otro lado, en la microestructura de la relación 1:4 (Figura 26C) a una magnificación de 130X, y a una magnificación de 250X se aprecia una microestructura homogénea y más porosa a diferencia de la relación 1:7 (Figura 26A), aunque sin tener un tamaño de poros definido, además los puntos blancos que se aprecian a lo largo de toda la imagen corresponden a cristales de sales asociadas al PBS en el que fue preparada la solución stock de queratina, empleada para la elaboración del hidrogel.

Con base en la información obtenida en las micrografías de los hidrogeles en ambas relaciones (1:4 y 1:7), la distribución en la que los poros se encuentran presentes corresponde a una porosidad del tipo fractura[103], entre cada uno de las láminas del extracto de queratina y sílice. El cambio en la porosidad entre la relación 1:4 y 1:7 está relacionado con la cantidad de entrecruzante presente en el material, entre mayor sea la cantidad de entrecruzante, el tamaño de este poro se verá disminuido. La Figura 27 muestra micrografía tomada al hidrogel 0:1 a una magnificación de 200X, se observa que presenta una morfología porosa y con mayor homogeneidad a diferencia de los hidrogeles de relación 1:4 y 1:7, esto se atribuye principalmente al proceso de síntesis, ya que en la relación 0:1 no usa HCl y NaCl para catalizar la reacción, se ha reportado que un mayor tiempo de gelación permite una estructura más homogénea y porosa [104]

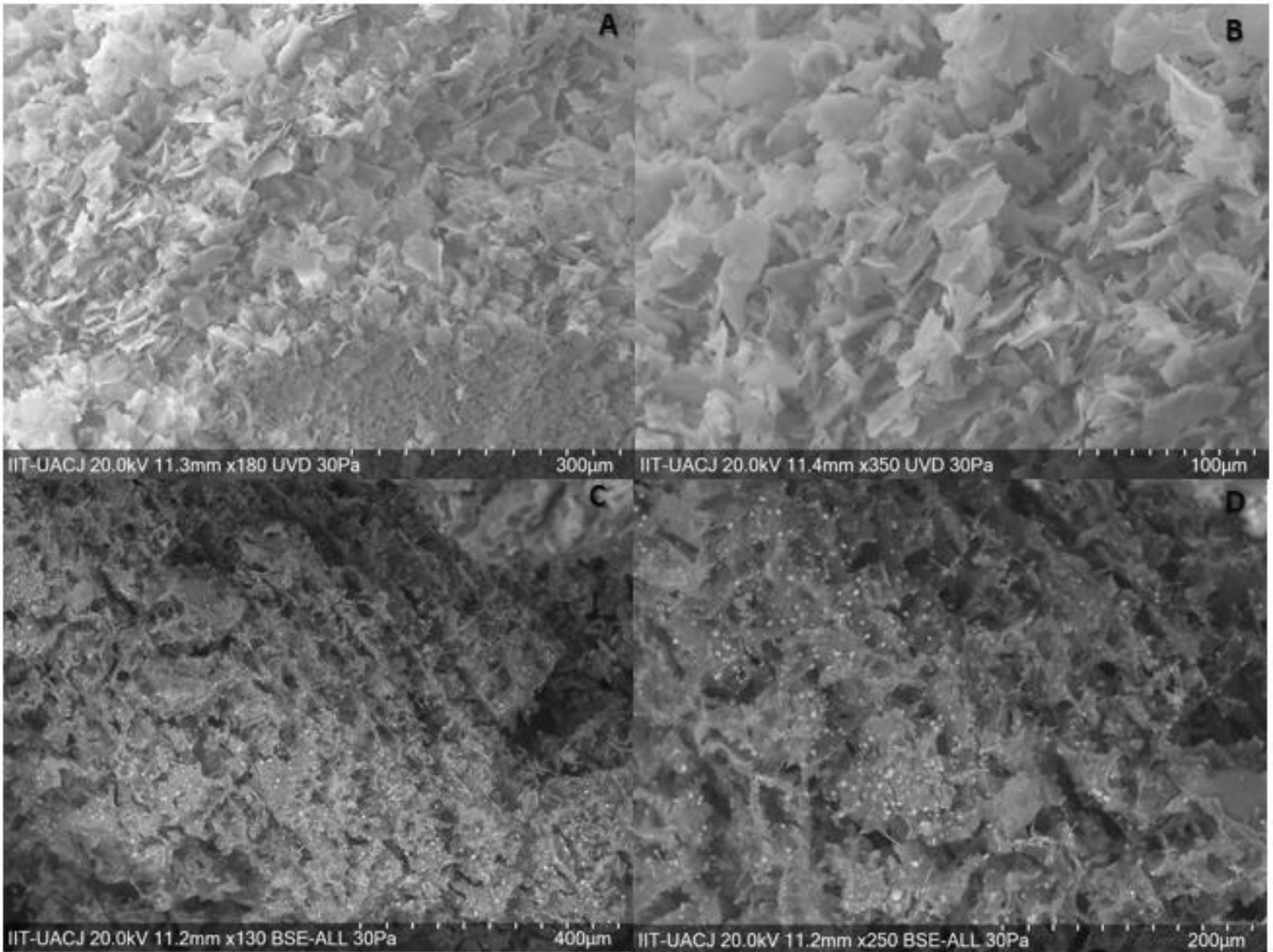


Figura 26 Micrografías Hidrogeles queratina-sílice relación 1:7 y 1:4. A) Hidrogel queratina-sílice 1:7 130X, se observa una morfología homogénea y porosa B) Hidrogel queratina-sílice 1:7 350X, aunque la morfología presenta porosidad, no se puede determinar un tamaño de poro en específico. C) Hidrogel queratina-sílice 1:4 130X se aprecia una morfología con mayor presencia de porosidad con respecto al hidrogel de relación 1:7 D) Hidrogel queratina-sílice 1:4 250X, se observa con más detalle que dicha microestructura no presenta también poros bien definidos, además de la presencia de sales distribuidas de manera homogénea en la muestra.

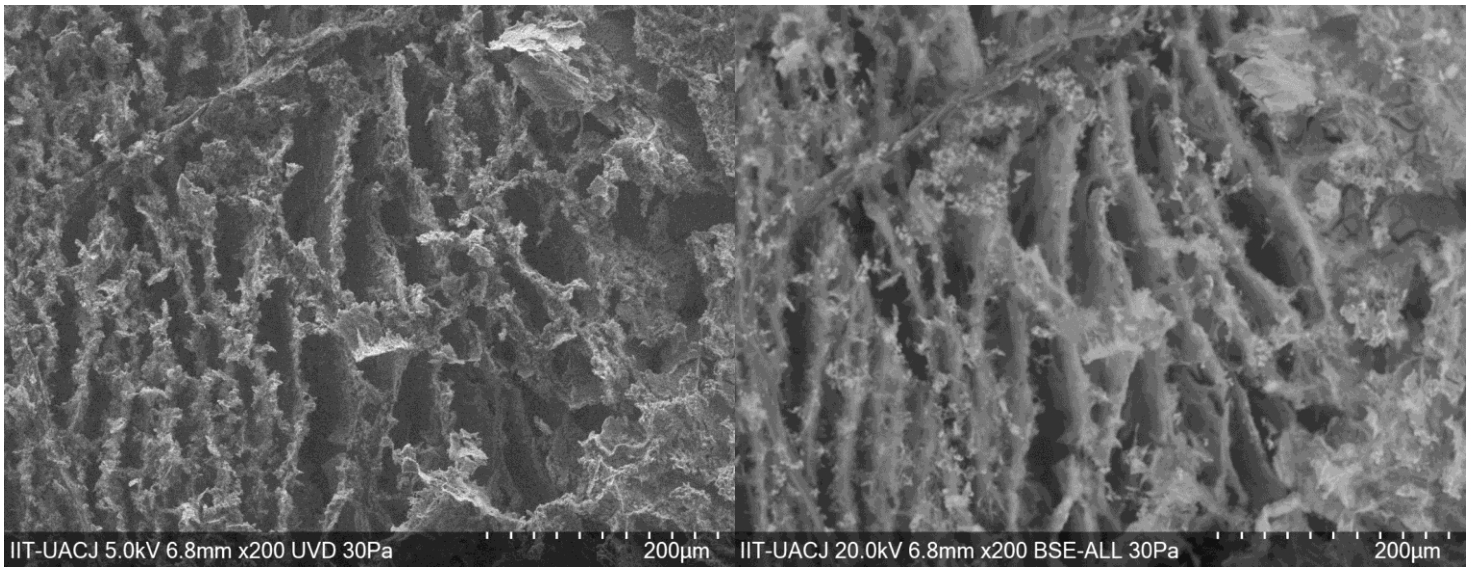


Figura 27 Micrografías Hidrogel -sílice relación 0:1.

### 5.2.1.3 EDS

En la Figura 28 se presenta el análisis EDS realizado al hidrogel de queratina-sílice con relación 1:7 mostrando la presencia de los siguientes elementos: carbono (C) 36%, oxígeno (O) 39%, silicio (Si) 16%, nitrógeno (N) 4%, cloro (Cl) 2% sodio (Na) 2%, azufre (S) 1%, calcio (Ca) 0.36% y potasio (P) 0.28%. La presencia de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre al igual que en la Figura 22 y 23 corresponde a las cadenas polipeptídicas que conforman la proteína, no obstante es de resaltar la presencia considerable de silicio, que en conjunto con la cantidad de oxígeno presente se asocia a la matriz de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) que conforma al hidrogel. Además el cloro observado en el análisis se atribuye a remantes de cloro producto del HCl empleado para la fabricación del hidrogel. Así mismo la presencia de sodio, potasio y calcio está relacionada con el PBS en el cual se disolvió la queratina, aunque debido a que los porcentajes del potasio y del calcio son menor a 0.5%, de acuerdo a la literatura no son representativos en el análisis[105].

Por otra parte en la Figura 29 se observa la composición elemental del hidrogel queratina-sílice con una relación 1:4, mostrando los siguientes elementos: carbono (C) 45%, oxígeno (O) 34%, silicio (Si) 9%, nitrógeno (N) 5%, cloro (Cl) 3%, sodio (Na) 3% azufre (S) 1% y calcio (Ca) 0.2%, exponiendo una composición y distribución similar con base a la relación 1:7. Sin embargo, hay una menor cantidad de silicio presente al igual que de oxígeno, esto atribuido directamente a una menor proporción de sílice en el hidrogel. De igual manera tanto el cloro como el sodio presentes se relacionan con el proceso de fabricación del material. La Figura 30 muestra el análisis EDS realizado a la relación 0:1, siendo silicio (Si) con 46% y oxígeno (O) 43% los que se encuentran principalmente, asociado directamente a la estructura de la sílice, no obstante cabe resaltar que hay carbono (C) con 11% presente, posiblemente sea algunos  $\text{CH}_3$  restantes del TEOS, que quedaron posterior a la reacción de hidrólisis.

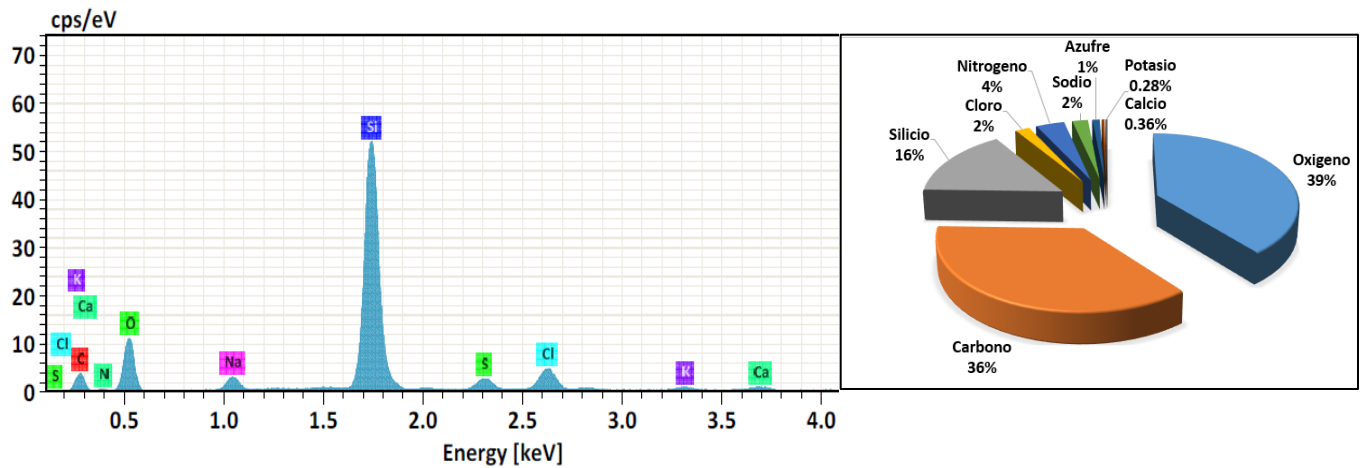


Figura 28. EDS de Hidrogel de sílice-queratina a relación de 1:7. Se observa la presencia de carbono (C), oxígeno (O), silicio (Si), nitrógeno (N), cloro (Cl), sodio (Na), azufre (S).

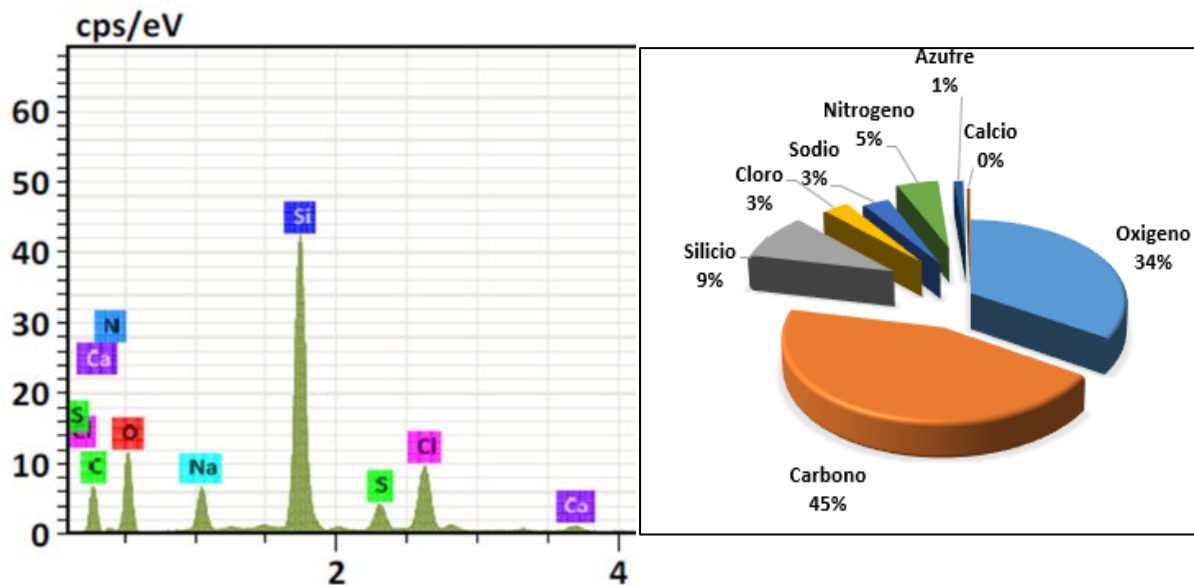


Figura 29. EDS de Hidrogel de sílice-queratina a relación de 1:4. Se observa la presencia de carbono (C), oxígeno (O), silicio (Si), nitrógeno (N), cloro (Cl), sodio (Na), azufre (S). A diferencia de la relación 1:7, el porcentaje de silicio disminuyó a prácticamente la mitad, de la misma manera un aumento en la cantidad de carbono y nitrógeno presente, relacionado con una menor cantidad de entrecruzante y una mejor distribución de la queratina en la estructura.

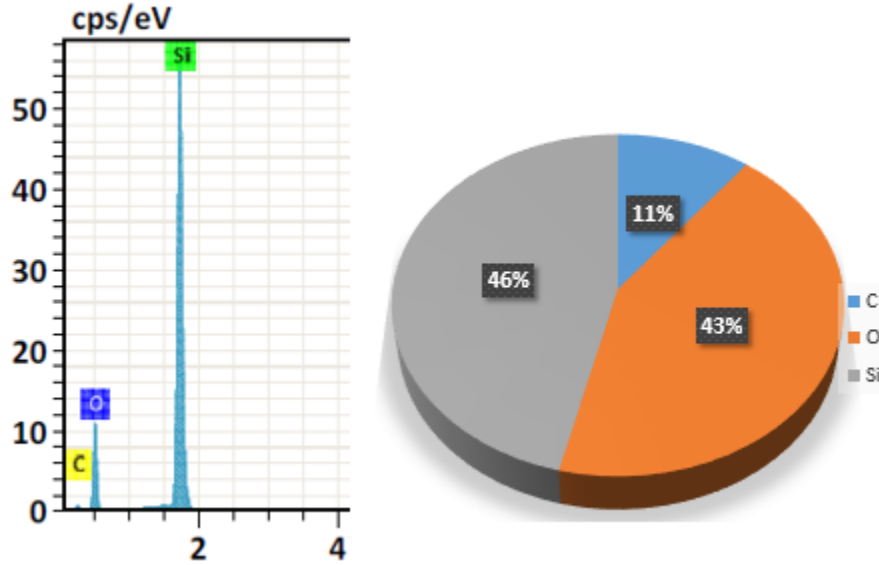


Figura 30. EDS de Hidrogel de sílice-queratina a relación de 1:4. Se observa la presencia de carbono (C), oxígeno (O), silicio (Si), nitrógeno (N), cloro (Cl), sodio (Na), azufre (S).

#### 5.2.1.4 PRUEBAS DE HINCHAMIENTO

En la Figura 31, se observan las gráficas resultantes de las pruebas de hinchamiento, realizadas a los hidrogeles de queratina-sílice, a relaciones de 1:4 y 1:7. Ambos hidrogeles dejaron de mostrar una variación en el peso al cabo de 10 horas, dando como resultado un porcentaje de hinchamiento de 125.96% para el hidrogel queratina-sílice con relación 1:4 y 113.38% para la relación 1:7, aunque la diferencia entre ambos porcentajes no es amplia, la cantidad de sílice presente está relacionada con la porosidad del hidrogel, tal y como se observa en la Figura 26, al ser más porosa la microestructura de la relación 1:4 esta permite absorber una mayor cantidad de agua en comparación a la relación 1:7.

Así mismo en la Figura 32 se observa el porcentaje de pérdida de agua con respecto un tiempo siendo un total de 10 horas, observando que la relación de entrecruzante no influye en el tiempo en que el material libera el agua. Sin embargo dicha relación si influye en el lapso en que transcurren las etapas de la degradación, para un análisis más detallado se graficó la primera derivada de ambas graficas como se aprecia en la Figura 33. Los dos gráficos muestran tres etapas de degradación, en

la relación 1:4 (Figura 33A) se observa que la primera etapa comienza a partir de la hora cero y se extiende hasta la hora cuatro, la segunda etapa abarca hasta la hora seis, y por último la tercera etapa concluye hasta la hora diez.

Mismo comportamiento se observa en la relación 1:7 (Figura 33B) con tres etapas de degradación pero con diferente duración. La primera etapa ocurren entre la hora cero y hora cuatro, la segunda etapa se extiende hasta la hora 8 y por último la tercera etapa concluye hasta la hora 10. Haciendo uso de la ecuación de la recta se obtuvo la velocidad de pérdida en cada etapa correspondiente a cada una de las relaciones: relación 1:4 (Etapa I -32.16 %, Etapa II -5.57% y Etapa III -3.65%) y relación 1:7 (Etapa I -34.06, Etapa II -5.32% y Etapa III -5.50%).

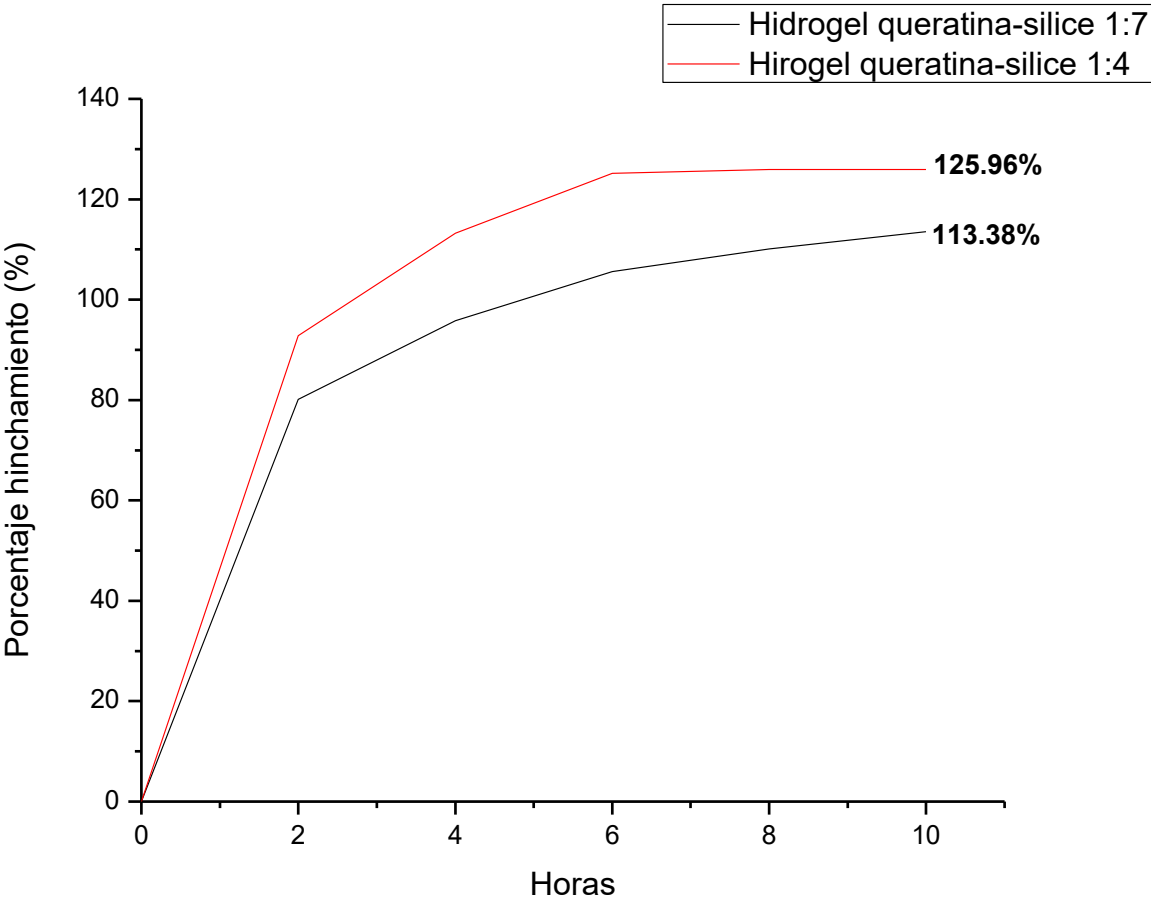


Figura 31. Graficas de hinchamiento hidrogeles queratina-silíce (1:4 y 1:7) con respecto al tiempo.

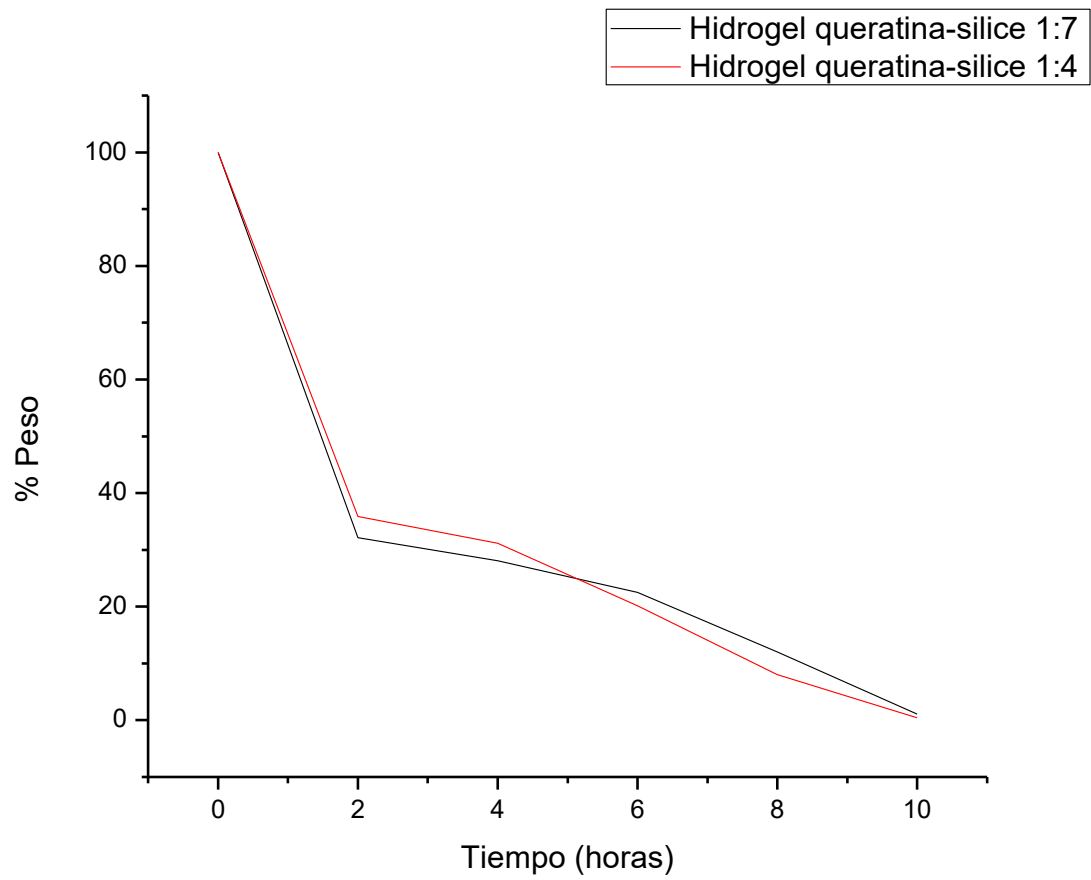


Figura 32. Graficas de pérdida de peso hidrogeles queratina-silíce (1:4 y 1:7) con respecto al tiempo.

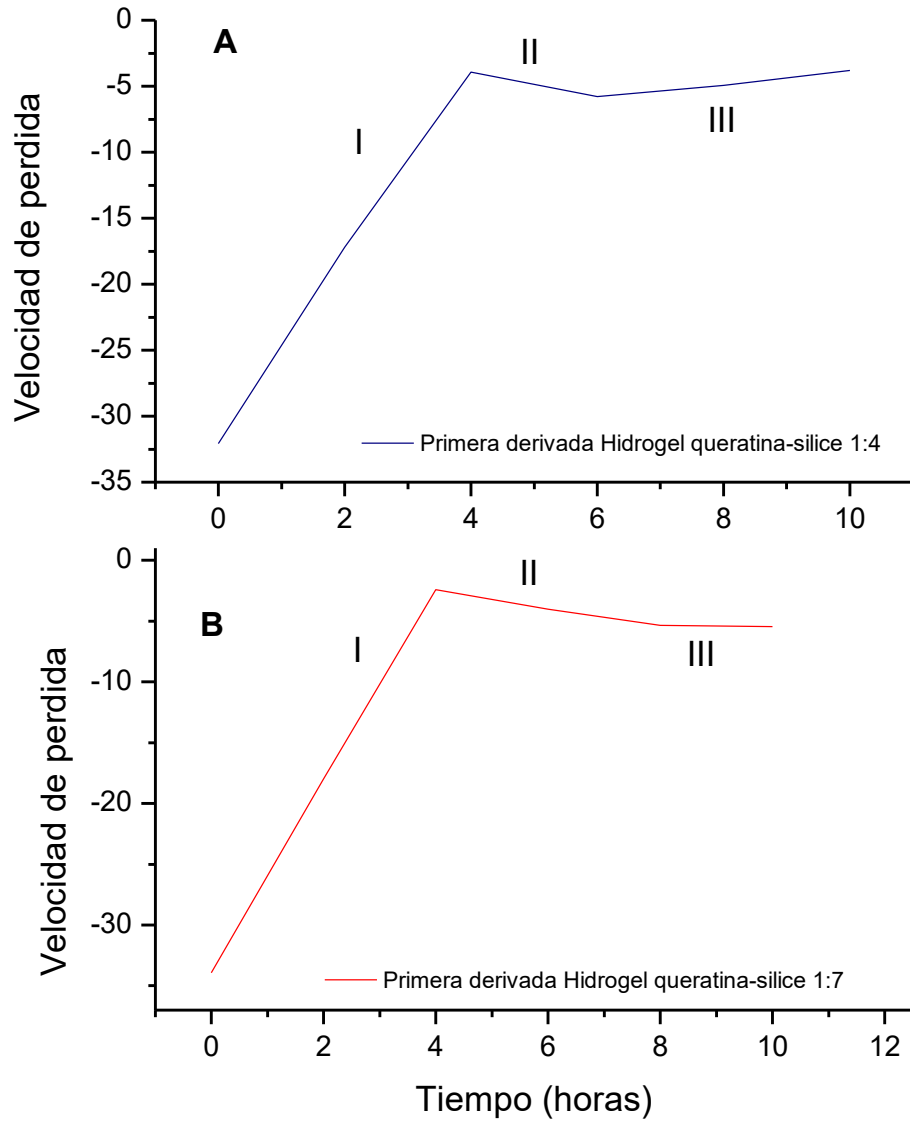


Figura 33. Primera derivada de graficas resultantes pérdida de peso hidrogeles queratina-silíce A) 1:4 y B) 1:7 con respecto al tiempo.

### 5.2.1.5 PRUEBAS DE DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA

La Tabla 8 muestra los resultados de la prueba de degradación hidrolítica realizadas a los hidrogeles queratina-sílice en relaciones 1:4 y 1:7 a diferentes pH, en cada columna se tabulan los diferentes porcentajes de degradación por el tiempo de duración de la prueba. Se aprecia un incremento en la degradación a medida que avanzan los días de la prueba, en cada una cuatro muestras que se analizaron. Observándose que al finalizar los 16 días la muestra que presento mayor degradación es el hidrogel con relación 1:4 bajo un pH de 6.8 con un 59.55%, y el que presentó menor degradación fue el hidrogel con relación 1:7 sometido a un pH de 6.8 con 35.84%.

Tabla 8. Porcentaje de degradación de los hidrogeles queratina-sílice a relaciones de 1:4 y 1:7.

Muestra/Tiempo	% Porcentaje de degradación				
	1 día	2 días	4 días	8 días	16 días
<b>Hidrogel queratina sílice 1:4 pH 6.8</b>	35.2319436	42.7174472	41.1188811	55.3448276	59.5578674
<b>Hidrogel queratina sílice 1:4 pH 5.4</b>	36.0510261	39.3187067	42.781457	43.019943	45.6217163
<b>Hidrogel queratina sílice 1:7 pH 6.8</b>	11.8003026	17.9966044	30.3030303	31.5104167	35.8440171
<b>Hidrogel queratina sílice 1:7 pH 5.4</b>	9.18293565	36.8582375	37.84237	45.9081836	47.3130194

Por otro lado en la Figura 34, se observa una gráfica con los diferentes porcentajes de pérdida de peso de los hidrogeles con relaciones 1:4 y 1:7 sometidos a pH de 6.8 y 5.4. Destaca la degradación que presenta el hidrogel con relación 1:4 a un pH de 6.8, perdiendo casi el 60% de su peso en el día 16, caso contrario, a la relación 1:7 en contacto con el mismo pH, que fue el hidrogel que menos se degrado de los cuatro en total que fueron analizados con un perdida de 35.8%, por lo que esto se asocia principalmente a la cantidad de entrecruzante presente.

La degradación a un pH de 5.4 en ambas relaciones la degradación no presenta una gran diferencia entre ellas (relación 1:4 45.62%, relación 1:7 47.31%), por lo cual se infiere que independientemente de la cantidad de entrecruzante, el ambiente ácido en el medio, propicia la degradación de la matriz de sílice, esto debido esencialmente a los iones hidronio ( $H^+$ ) que se encuentran presentes, estos iones van a romper los enlaces siloxanos del hidrogel. Además se realizó un análisis estadístico mediante un diseño factorial para determinar cuál de los tres factores representa un factor significativo en el experimento, con un factor de significancia de 0.05, resultado que el tiempo de degradación y principalmente el pH fueron factores estadísticamente significativos en la degradación hidrolítica del material.

Tabla 9 Análisis de varianza (ANOVA) de las pruebas de degradación hidrolítica

**Análisis de varianza para % Degradación, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec	SC Ajust	CM Ajust	F	P = (0.05)
<b>Concentración</b>	1	927.59	927.59	927.59	16.82	0.001
<b>pH</b>	1	25.25	25.25	25.25	0.46	<b>0.511</b>
<b>Días</b>	4	1409.83	1409.83	352.46	6.39	<b>0.005</b>
<b>Error</b>	13	717.07	717.07	55.16		
<b>Total</b>	19	3079.74				

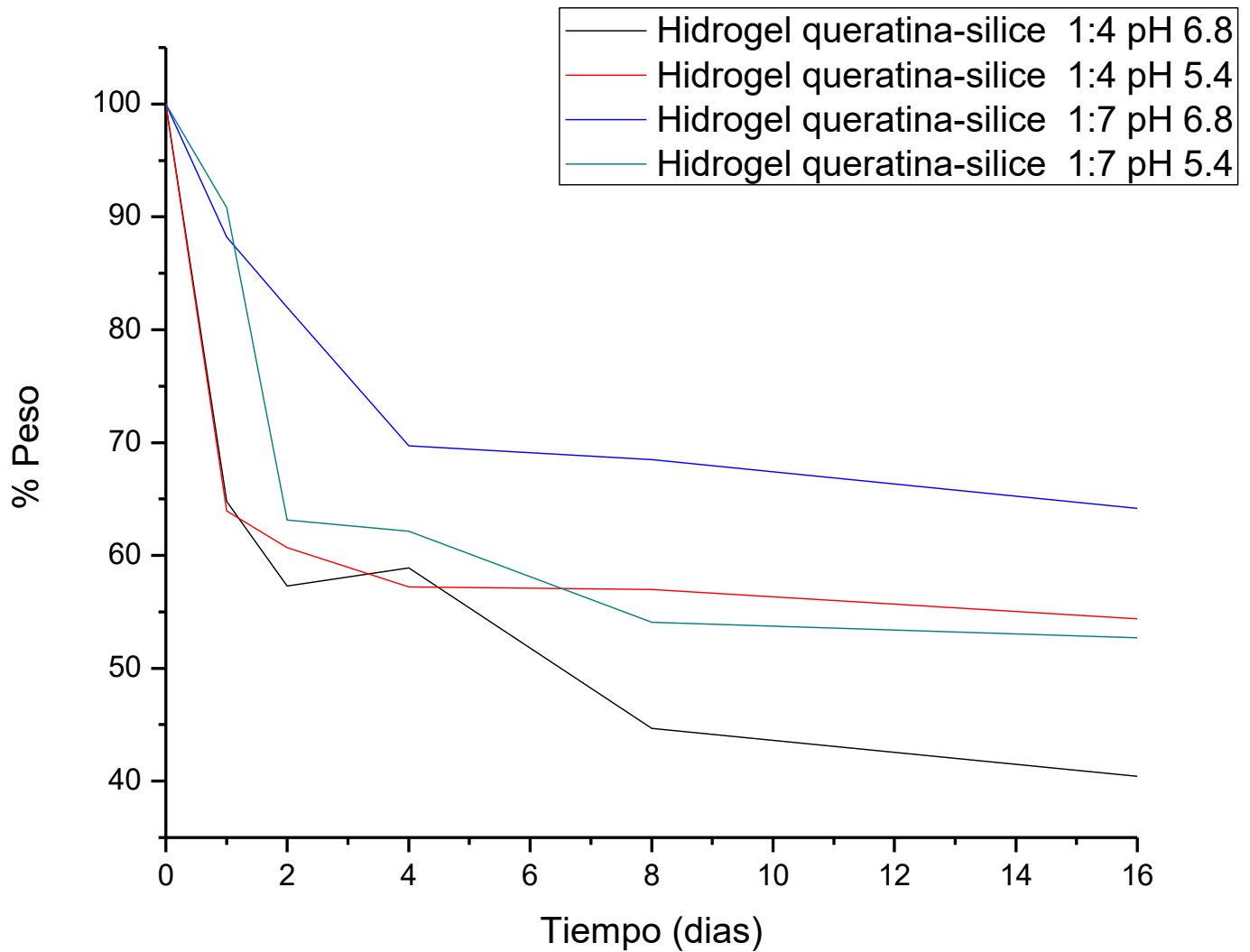


Figura 34 Grafica pérdida de peso a lo largo de la prueba de degradación hidrolítica.

En la figura 35 se observa la degradación hidrolítica del hidrogel queratina-sílice 1:4, a un pH de 6.8, donde claramente se observa las diferentes etapas a las que transcurre dicha degradación, la etapa I comienza cuando el material entra en primer contacto con el medio, por lo que ocurre difusión del medio a través de la microestructura del hidrogel, dando inicio a la degradación del material, concretamente mediante un ataque nucleofílico ( $\text{OH}^-$ ) a los enlaces siloxano ( $\text{Si-O-Si}$ ) presentes, provocando su ruptura [106][107], esta etapa se tiene una duración

de 0 a 2 días, posteriormente la etapa II que ocurre entre los días 2 y 8; la ruptura de enlaces da pie a la difusión en el medio de oligómeros de grupos silanol (Si-OH) y ácido silícico ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ), los cuales auto catalizan la reacción y dan pie a una degradación más profunda.[107], por último en la etapa III a partir de los 8 días, la matriz polimérica se convierte más porosa, aunado a que el medio llega a un punto de saturación en la cantidad de oligómeros, da como resultado un proceso de degradación lento y homogéneo[106].

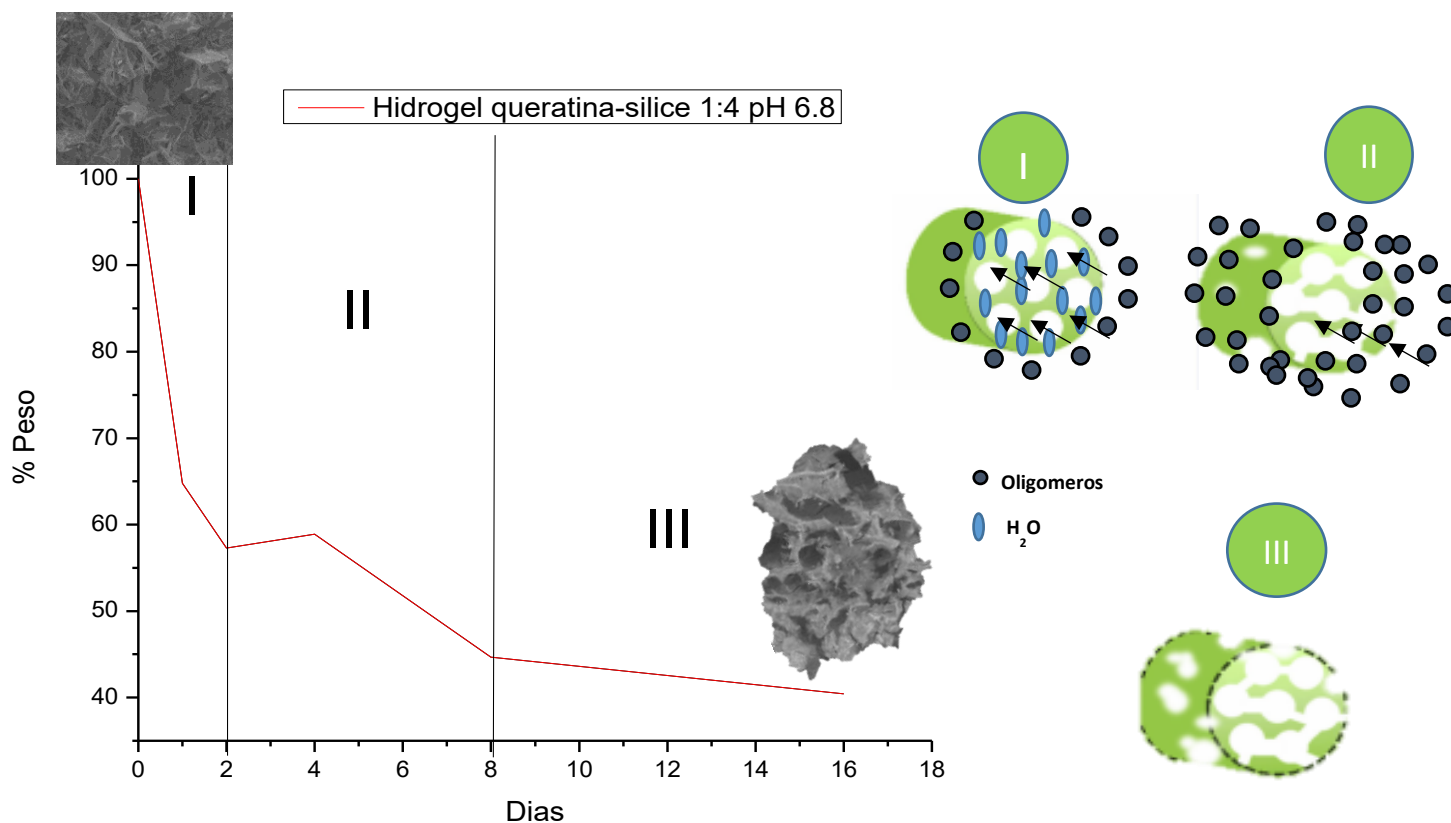


Figura 35. a) Gráfica degradación hidrolítica hidrogel queratina-silice 1:4 a un pH 6.8 b) Esquema tres etapas degradación hidrolítica [106]

### 5.2.1.6 ANALISIS ESPECTROSCOPIA INFRARROJA A HIDROGELES QUERATINA-SÍLICE.

Las Figuras 36 y 37 se observan los espectros correspondientes realizados a cada una de las muestras analizadas para monitorear cambios en alguna de sus bandas a medida que transcurrían las pruebas de degradación. Las cuatro muestras analizadas (Figura 36 y 37) en el día cero presentan las mismas cuatro bandas:  $1641\text{ cm}^{-1}$ (Amida I),  $1553\text{ cm}^{-1}$ (Amida II),  $1086\text{ cm}^{-1}$ (Si-O), y  $980\text{ cm}^{-1}$  (Si-O-Si). Así mismo se observa en la totalidad de los espectros que al transcurrir el día 1, la banda correspondiente a la Amida II desaparece y que. Además se observa que la principal banda que se ve afectada por la degradación es la correspondiente a los enlaces (Si-O-Si), relacionados a la matriz de sílice que conforma el hidrogel.

Por otro lado la Figura 36 muestra una comparación entre los hidrogeles a una relación de 1:4 sometidos a pH de 5.4 y 6.8 respectivamente. A un pH de 5.4 (Figura 33 I) se observa que el tamaño de esta banda va disminuyendo considerablemente a partir del día 4, siendo que el día 16, que la banda en cuestión prácticamente no se observa en el espectro, así mismo la banda asociada a enlaces Si-O también presenta un menor tamaño con respecto al día 8. En comparación con el comportamiento presentado a un pH 6.8, se aprecia una degradación más rápida de la matriz sílice, tal que la banda Si-O-Si, disminuye a partir del primer día, a medida que transcurre la prueba, esta banda no se logra divisar con facilidad, para el día 8 esa banda ya desapareció del espectro, por lo que este comportamiento se asocia directamente a lo observado en la Tabla 8, siendo este hidrogel fue el que presentó la mayor degradación.

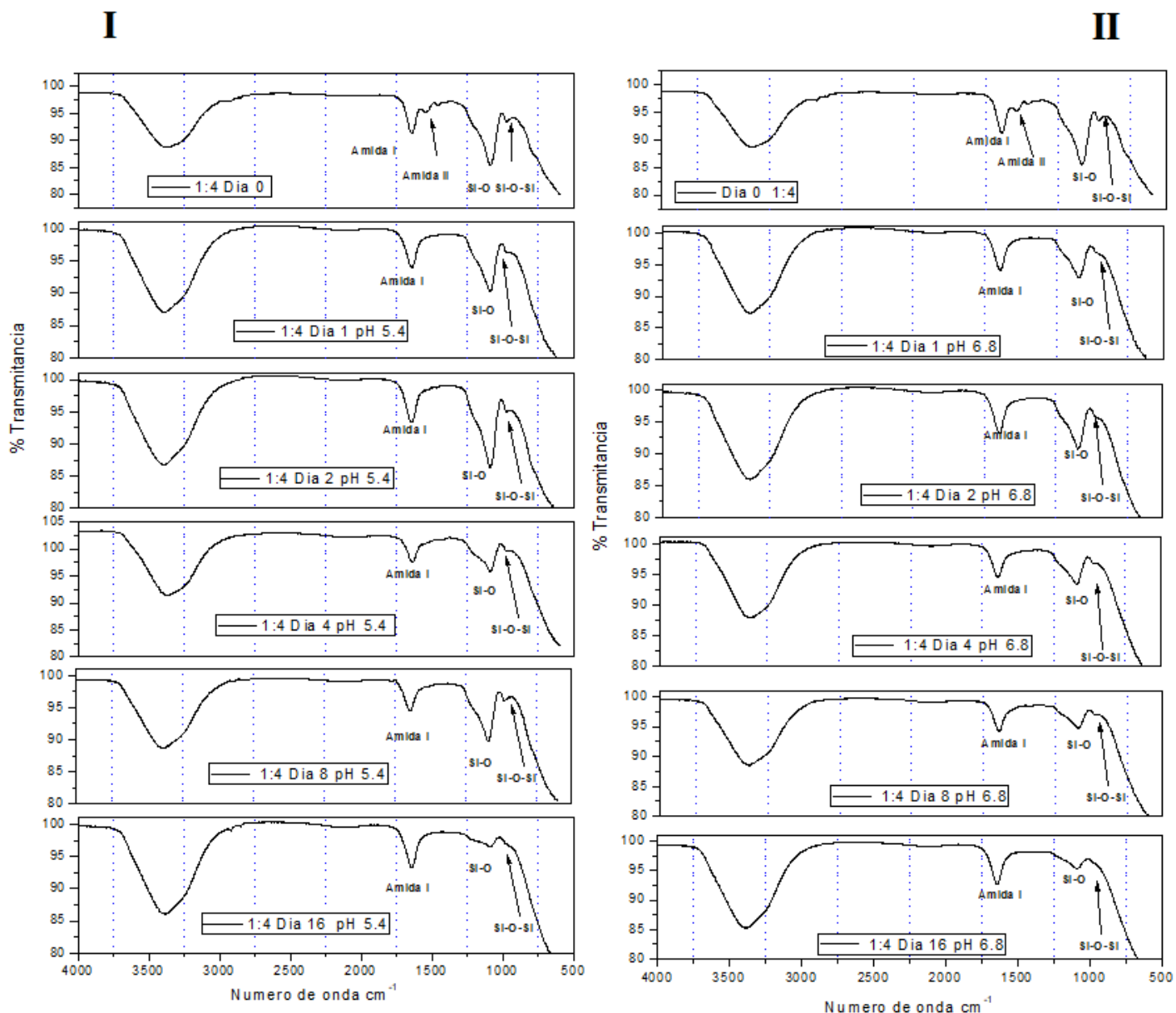
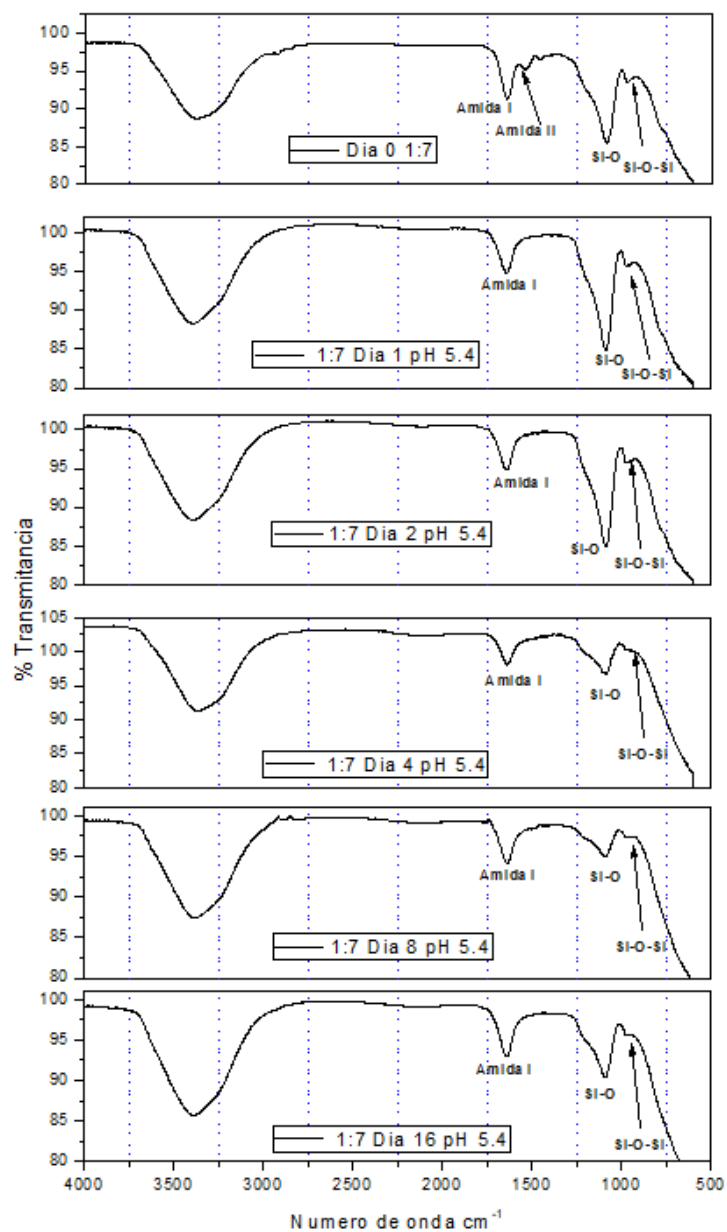


Figura 36. Espectros FTIR de los hidrogeles queratina-sílice 1:4 a pH de 5.4 y 6.8 I) Hidrogel queratina-sílice 1:4 sometido a un pH de 5.4 y II) Hidrogel queratina-sílice 1:4 sometido a un pH de 6.8.

En la Figura 37 III se observa que la relación 1:7 a un pH de 5.4, presenta un comportamiento similar con respecto a la relación 1:4 evaluada en el mismo pH (Figura 36 I) por lo que corresponde a lo observado en las gráficas de porcentaje de pérdida de peso (Figura 31). Por último los espectros de la relación 1:7 a un pH de 6.8 (Figura 37 IV) muestran que la banda relacionadas con la matriz del hidrogel no presenta un decrecimiento en comparación a la relación 1:4, mismo que se correlaciona con el porcentaje de degradación reportado (Tabla 8.)

### III



### IV

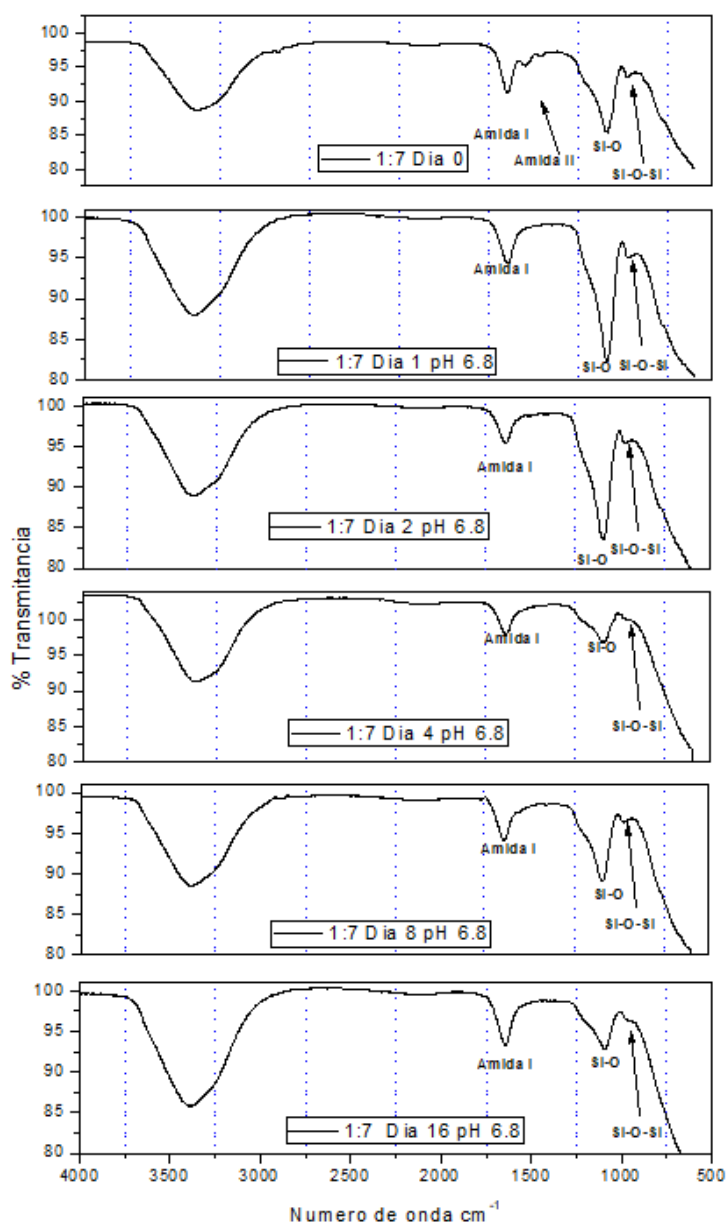


Figura 37. Espectros FTIR de los hidrogeles queratina-sílice 1:7 a pH de 5.4 y 6.8 III) Hidrogel queratina-sílice 1:4 sometido a un pH de 5.4 y IV) Hidrogel queratina-sílice 1:7 sometido a un pH de 6.8.

### 5.2.1.7 ENSAYOS DE HEMÓLISIS

Para este estudio se comparó dos tipos de morfología de los hidrogeles queratina-sílice con relaciones 1:4 y 1:7; la primera morfología en forma de polvo, producto de un proceso mayor de liofilización y la segunda morfología con su microestructura integra. En la primera morfología (Figura 38) se observa que el porcentaje de hemólisis obtenido en ambos geles es de 91.62% para la relación queratina-sílice 1:4 y 89.96% para la relación 1:7, representando un alto porcentaje de hemotoxicidad de acuerdo a la norma ASTM F756-17 que menciona que a partir de 5 % ya se considera un material hemotóxico (Tabla 3.)[86], este porcentaje se atribuye a la estructura amorfa de la muestra, esto debido a que existe una relación entre la cantidad de grupos silanol (Si-OH) presentes en la superficie y toxicidad en glóbulos rojos[108][109], los grupos silanol interactúan y se ionizan con grupos de fosfatidilcolina presentes en las membranas de los eritrocitos dando pie eventualmente a un rompimiento en la membrana[110], aunado a esto, los hidroxilo (Si-OH) tienden a realizar puentes de hidrogeno con las moléculas presentes en la membrana, incrementando y flujo y la permeabilidad dentro y fuera de ella[108].

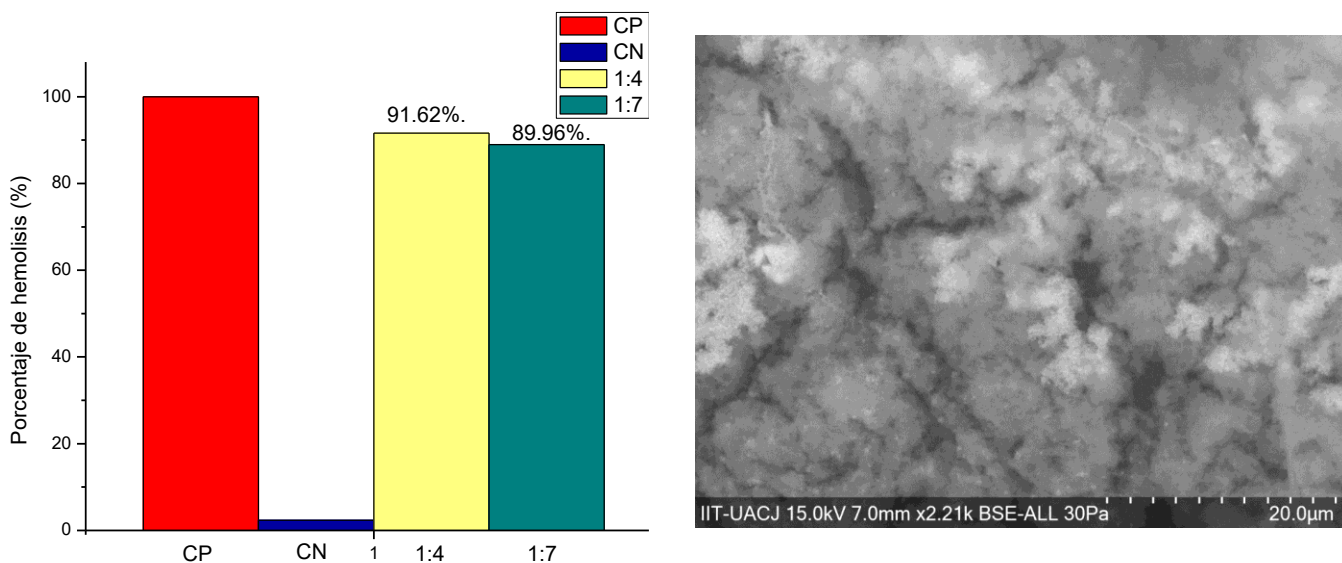


Figura 38. Resultados de las pruebas de hemólisis a lo hidrogeles 1:4 y 1:7

En la Figura 36 se observa los resultados de las pruebas de hemólisis a los hidrogeles 1:4 y 1:7 con su morfología completa, cabe resaltar que de igual manera se analizó el extracto que se usó para realizar los hidrogeles como queratina en grado reactivo, obteniendo los siguientes resultados: hidrogel queratina-sílice 1:4 (8.60%), hidrogel queratina-sílice 1:7 (9.36%), extracto de queratina (12.62%) y queratina grado reactivo (2.20%). En comparación con los porcentajes de hemólisis obtenidos previamente (Figura 33), se obtuvo un menor porcentaje de hemotoxicidad, esto corresponde principalmente con la morfología, debido a que la matriz de sílice de ambos hidrogeles (Si-O-Si) tiene muy pocos grupos silanol (Si-OH) aislados, a diferencia de una estructura de sílice amorfa, repercutiendo en la interacción con la membrana, así mismo esta característica se relaciona con el porcentaje de la relación 1:4 sea ligeramente menor a la relación 1:7. Otro factor a tomar en cuenta es la presencia de la queratina en la matriz del gel, ya que la presencia de proteínas es un factor para reducir la hemotoxicidad de los grupos silanol[110].

La diferencia entre el porcentaje de hemólisis que presentó la queratina grado reactivo, con respecto a la del extracto se debe principalmente a que el segundo tiene más impurezas como residuos de calcio (Figura 23). Aunque los valores obtenidos de hemólisis de los hidrogeles con morfología completa son menores con respecto a los de la morfología amorfa, siguen siendo valores por arriba del 5%. Sin embargo recientes investigaciones señalan que existe una diferencia entre el comportamiento de los materiales en ensayos *in vitro* como *in vivo*[111], se ha comprobado que en un rango del 5 al 25% no representa un peligro, sin embargo si este es mayor a 50%, muy posiblemente sea perjudicial en las pruebas *in vivo*[112][113]. Además, este material no estará en contacto interno con el organismo si no que su uso sería exterior por lo que no representaría un peligro a la salud.

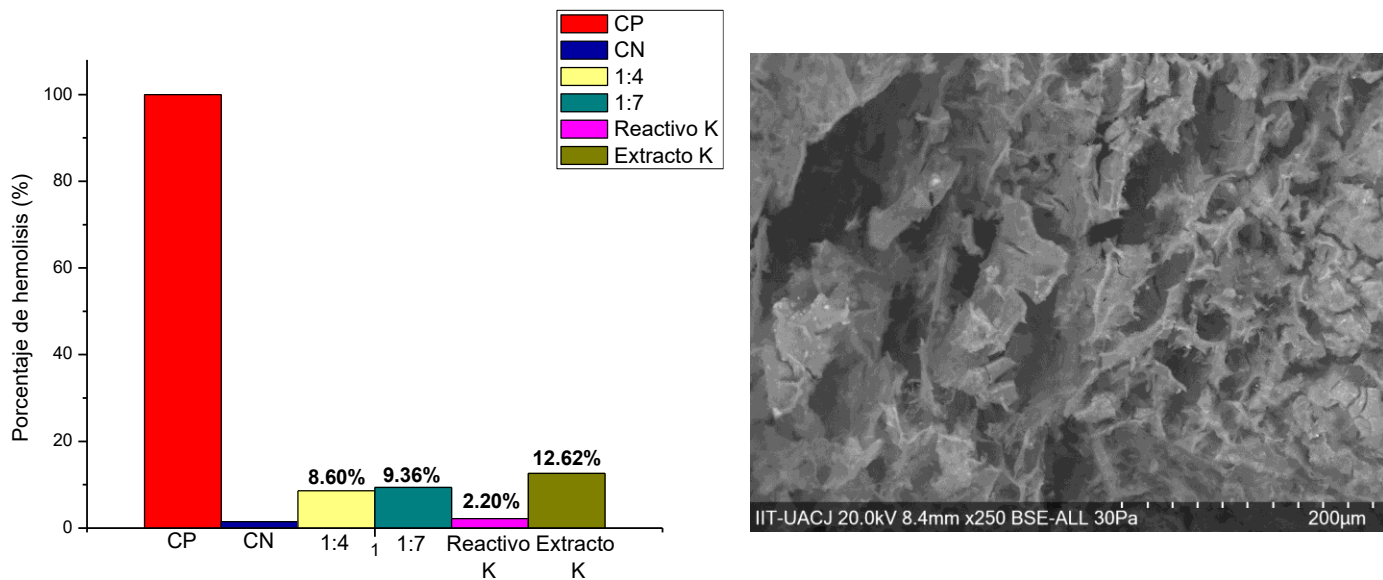


Figura 39. Resultados de las pruebas de hemolisis a los hidrogeles 1:4 y 1:7 con su morfología completa,

### 5.2.1.8 ENSAYOS DE HEMOLISIS EXTENDIDO

Este análisis se extendió con el objetivo de observar el comportamiento del porcentaje de hemolisis de los hidrogeles a relación 0:1, 1:4 y 1:7 con respecto al tiempo de duración del ensayo. La Tabla 10, muestra los diferentes porcentajes de hemolisis posterior a 8 días, siendo la relación 1:4 la que presentó mayor hemolisis con un 47.58%, esto contrasta directamente con el porcentaje de la relación 1:7 que fue de 16.69%, y la relación 0:1 con 7.89%.

Así mismo la Figura 37 se observa una pauta ascendente en el grado de hemolisis a medida que transcurre la duración de la prueba, este comportamiento lo comparten las tres relaciones y es indistinto de la cantidad de sílice presente. No obstante si existe una remarcada diferencia en el nivel de hemolisis de cada uno de los tipos de hidrogel, principalmente entre la relación 1:4 y 1:7. Esto se relaciona directamente con el pH de la solución Alsever que tiene un pH de 6.4, con el patrón de degradación observado en las pruebas de degradación hidrolítica a un pH de 6.8 (Figura 31), siendo la relación 1:4 la que resultó con una degradación de 55.34% en el día 8, a diferencia del 31.51% en la relación 1:7 (Tabla 8).

Por otro lado disimilitud del grado de hemolisis entre la relación 0:1 con respecto a la relación 1:4 y 1:7 radica en el proceso de síntesis, esto debido a que la relación 0:1 tiene un mayor tiempo de gelación además que no se usó HCl y NaOH para catalizar dicha reacción, produciendo un proceso de nucleación más retardado, esto de acorde a la reacción de per Stöber[67], esto produce un material con menor cantidad de impurezas, así mismo una estructura homogénea y polidispersa[114] reflejándose en una menor degradación del material y un bajo porcentaje de hemolisis.

Tabla 10. Porcentajes de hemolisis hidrogeles 0:1, 1:4 y 1:7

% Porcentaje de hemolisis					
Hidrogeles	Día 0	Día 1	Día 2	Día 4	Día 8
<b>0:1</b>	2.38	2.89	2.44	3.46	<b>7.89</b>
<b>1:4</b>	10.61	12.83	20.84	29.95	<b>47.58</b>
<b>1_7</b>	9.65	10.61	11.64	14.93	<b>16.69</b>

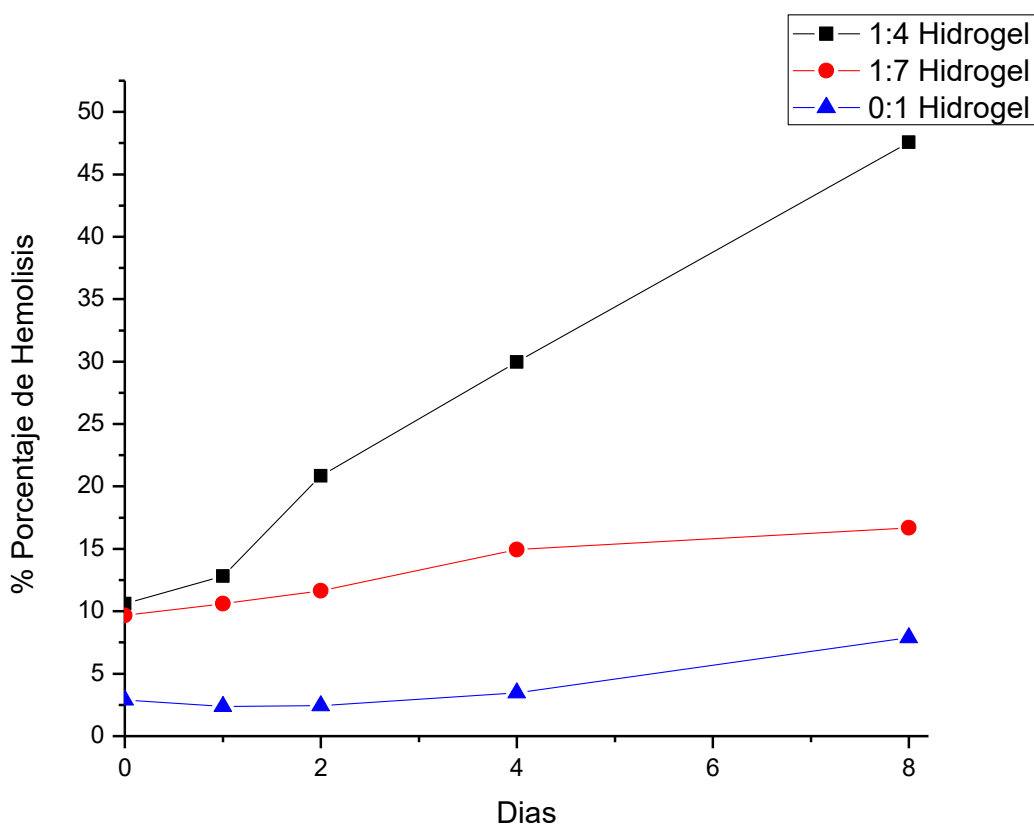


Figura 40 Grafica ensayo de hemolisis extendido hidrogeles 0:1, 1:4 y 1:7

### 5.2.1.9 CORRELACIÓN ENTRE PORCENTAJE HEMOLISIS Y DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA

La Figura 38 muestra el comportamiento de la degradación hidrolítica del hidrogel queratina-sílice relación 1:4 con respecto al porcentaje de hemolisis. Dada la duración del experimento, únicamente se están comparando dos etapas de la degradación (etapa I y etapa II). Dentro que la etapa I de degradación (0-2 días) se aprecia que el porcentaje de hemolisis únicamente incrementa un 10.23%, sin embargo en la etapa II (2-8 días) demostró un aumento de 26.74%, esto hilado a los oligómeros de grupos silanol (Si-OH), que están siendo liberados al medio[107]

Por lo cual principalmente los iones  $\text{OH}^-$  que interactúan con la membrana de los glóbulos rojos, generan dos fenómenos en concreto: a) amplían la permeabilidad mediante puentes de hidrogeno con las moléculas de la membrana; dicha permeabilidad hace que exista un mayor difusión entre el medio y el eritrocito, b) la ionización de grupos de fosfatidilcolina, que conlleva a la ruptura de la bicapa lipídica. Conduciendo a un incremento del grado de hemolisis a medida que la microestructura del hidrogel continúe degradándose, esto permite establecer una relación inversamente proporcional entre el peso producto de degradación y la hemolisis. A medida que aumente la cantidad de oligómeros en el medio, producto de la degeneración de la matriz polimérica, más eritrocitos serán lisados.

Aunque en esta investigación únicamente se está analizando la lisis de las membranas de los eritrocitos mediante un porcentaje de hemolisis, se remarca el hecho que la mayoría de las células de los organismos vivos constan de una membrana con bicapa lipídica, por lo que este comportamiento otorga una aproximación del comportamiento que tendría el material con otro tipo de células.

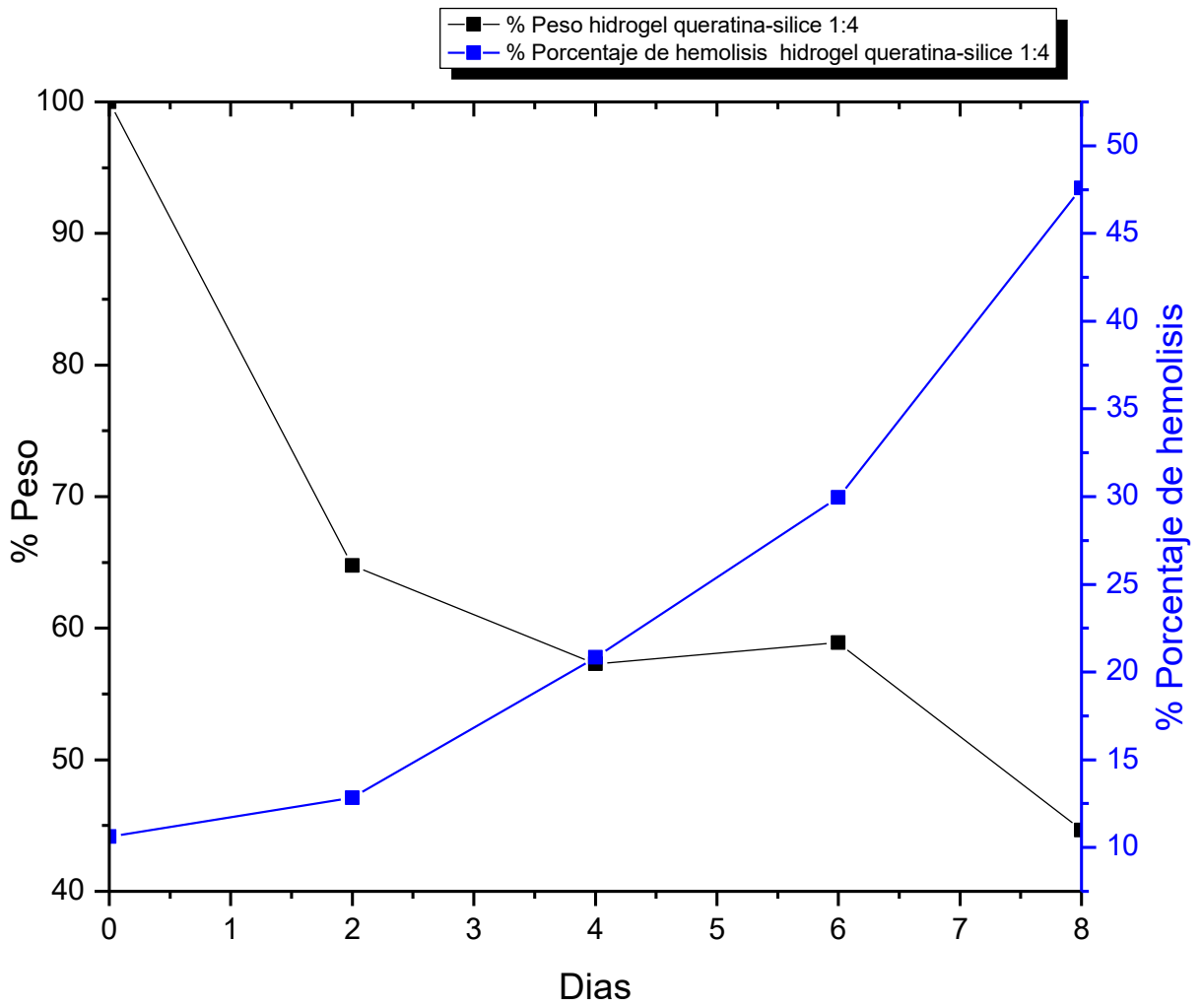


Figura 41 Grafica de correlación entre el porcentaje de hemolisis y el porcentaje de degradación del hidrogel queratina-silíce 1:4.

## CAPÍTULO VI

### 6.1 CONCLUSIONES

- 1) Se logró extraer extracto de queratina a partir de la pluma de *gallus gallus domesticus* mismo que corroborado mediante SEM, EDS, FTIR y
- 2) Se sintetizaron hidrogeles queratina-sílice usando el extracto de queratina extraído previamente con tres diferentes relaciones 1:1 1:4 y 1:7, donde únicamente 1:4 y 1:7 presentaron gelación, lo cual se verificó mediante SEM, EDS, FTIR.
- 3) Los hidrogeles queratina-sílice poseen una microestructura porosa, aunque sin poros definidos, siendo la relación 1:4 la que presenta una mayor porosidad a comparación de la relación 1:7, siendo la cantidad de sílice un factor.
- 4) El porcentaje de hinchamiento que presentaron los hidrogeles queratina-sílice fue de 125.96% para la relación 1:4 y para la relación 1:7 113.38%, dicha diferencia aunque no es muy amplia, se atribuye a que la relación 1:4 al ser más porosa, permite una mayor absorción de agua en su microestructura
- 5) Las pruebas de degradación hidrolítica muestran que el primer día, la degradación es más significativa, siendo las relaciones 1:4 las que presentaron mayor degradación a lo largo de 16 días, a un pH de 5.4 el porcentaje de degradación es de 45.62% y 6.8 el porcentaje de degradación es de 59.55%.

- 6) El análisis de varianza (ANOVA) usando un valor significancia ( $p < 0.05$ ) realizado a los datos obtenidos de la degradación hidrolítica, señala que el factor más significativo es el pH ( $p = 0.589$ ).
- 7) Las pruebas de hemolisis indican una relación entre la microestructura y el grado de hemotoxicidad que el material presente, una microestructura amorfa dio como resultado un alto porcentaje de hemolisis en contraste al hidrogel con su matriz integra.
- 8) El ensayo de hemolisis extendido mostró que el porcentaje de hemolisis aumenta a medida que incrementa la duración del experimento. Este comportamiento es indistinto en las diferentes relaciones de hidrogel sometidas a la prueba.
- 9) Se observa una relación inversamente proporcional entre el porcentaje de degradación y hemolisis, a medida que el hidrogel comienza a degradarse, los oligomeros resultantes de esta degradación, propiciarán la ruptura de las membranas en los eritrocitos incrementando así el grado de hemolisis.

## 6.2 RECOMENDACIONES

- 1) Se recomienda realizar pruebas de hinchamiento y degradación hidrolítica con fluido similar a las secreciones mamarias, para tener una aproximación del funcionamiento del hidrogel y como interaccionará con las secreciones mamarias.
- 2) Sintetizar los hidrogeles con queratina grado reactivo, así mismo realizar las pruebas de hemolisis y observar si ejerce un factor en la disminución del porcentaje de hemolisis.
- 3) Realizas pruebas de viabilidad celular, principalmente con células epiteliales, ya que el material interaccionará al exterior de la mama sería una aproximación de que comportamiento tendrá el hidrogel en su futura aplicación.
- 4) Pruebas de ángulo de contacto para tener en cuenta que tan hidrofílico es el material y un RMN para ver si es posible observar la interacción entre la queratina y la sílice.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Y. Rizzo, B. Theek, G. Storm, F. Kiessling, and T. Lammers, "Recent progress in nanomedicine: Therapeutic, diagnostic and theranostic applications," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 6, pp. 1159–1166, 2013.
- [2] J. L. Motellón and J. B. Roncero, *9a. edición del curso de biotecnología aplicada a la salud humana: programa preliminar : 3 al 5 de noviembre de 2010*, CIEMAT, Madrid. EdikaMed, 2010.
- [3] World Health Organization, "Cancer Fact Sheets," *Globocan 2012*, pp. 0–5, 2012.
- [4] GLOBOCAN, "Cancer Fact Sheets," 2012. [Online]. Available: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
- [5] Cancer Research UK, "Worldwide cancer statistics," 2012. [Online]. Available: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>.
- [6] SSA, "Cáncer de Mama. Introducción," 2015. [Online]. Available: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-mama-introduccion>.
- [7] American Society of Clinical Oncology, "Cáncer de mama: Síntomas y signos," 2017. [Online]. Available: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/sintomas-y-signos>.
- [8] National Breast Cancer Foundation, "Breast Anatomy," 2016. [Online]. Available: <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>.
- [9] S. J. de Jong, S. C. De Smedt, M. W. C. Wahls, J. Demeester, J. J. Kettenes-van den Bosch, and W. E. Hennink, "Novel Self-assembled Hydrogels by Stereocomplex Formation in Aqueous Solution of Enantiomeric Lactic Acid Oligomers Grafted To Dextran," *Macromolecules*, vol. 33, no. 10, pp. 3680–3686, May 2000.
- [10] Y. Chavarri-Guerra *et al.*, "Access to care issues adversely affect breast cancer patients in Mexico: Oncologists' perspective," *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–8, 2014.
- [11] Lh. Yahia, "History and Applications of Hydrogels," *J. Biomed. Sci.*, vol. 04, no. 02, pp. 1–23, 2015.
- [12] A. M. Jonker, D. W. P. M. Löwik, and J. C. M. Van Hest, "Peptide- and protein-based hydrogels," *Chem. Mater.*, vol. 24, no. 5, pp. 759–773, 2012.
- [13] S. J. Buwalda, K. W. M. Boere, P. J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, and W. E. Hennink, "Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials," *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 254–273, 2014.

- [14] A. Danno, "Gel Formation of Aqueous Solution of Polyvinyl Alcohol Irradiated by Gamma Rays from Cobalt-60," *J. Phys. Soc. Japan*, vol. 13, no. 7, pp. 722–727, Jul. 1958.
- [15] P. A. King and J. A. Ward, "Radiation chemistry of aqueous poly(ethylene oxide) solutions. I," *J. Polym. Sci. Part A-1 Polym. Chem.*, vol. 8, no. 1, pp. 253–262, Jan. 1970.
- [16] K. Otake, H. Inomata, M. Konno, and S. Saito, "Thermal analysis of the volume phase transition with N-isopropylacrylamide gels," *Macromolecules*, vol. 23, no. 1, pp. 283–289, Jan. 1990.
- [17] A. S. Sawhney, C. P. Pathak, and J. A. Hubbell, "Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(.alpha.-hydroxy acid) diacrylate macromers," *Macromolecules*, vol. 26, no. 4, pp. 581–587, Feb. 1993.
- [18] M. G. Cascone, B. Sim, and S. Downes, "Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone.," *Biomaterials*, vol. 16, no. 7, pp. 569–74, 1995.
- [19] B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, and S. W. Kim, "Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems," *Nature*, vol. 388, p. 860, Aug. 1997.
- [20] W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, and D. A. Tirrell, "Reversible Hydrogels from Self-Assembling Artificial Proteins," *Science (80-)*, vol. 281, no. 5375, pp. 389 LP – 392, Jul. 1998.
- [21] D. L. Elbert, A. B. Pratt, M. P. Lutolf, S. Halstenberg, and J. A. Hubbell, "Protein delivery from materials formed by self-selective conjugate addition reactions," *J. Control. Release*, vol. 76, no. 1, pp. 11–25, 2001.
- [22] D. A. Ossipov and J. Hilborn, "Poly(vinyl alcohol)-Based Hydrogels Formed by 'Click Chemistry,'" *Macromolecules*, vol. 39, no. 5, pp. 1709–1718, Mar. 2006.
- [23] P. Sierpinski *et al.*, "The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves," *Biomaterials*, vol. 29, no. 1, pp. 118–128, 2008.
- [24] J. G. Rouse and M. E. Van Dyke, "A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications," *Materials (Basel)*, vol. 3, no. 2, pp. 999–1014, 2010.
- [25] M. Park, B. S. Kim, H. K. Shin, S. J. Park, and H. Y. Kim, "Preparation and characterization of keratin-based biocomposite hydrogels prepared by electron beam irradiation," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 8, pp. 5051–5057, 2013.
- [26] M. Park *et al.*, "Effect of discarded keratin-based biocomposite hydrogels on the wound healing process in vivo," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 88–94,

2015.

- [27] R. Nakata, Y. Osumi, S. Miyagawa, A. Tachibana, and T. Tanabe, "Preparation of keratin and chemically modified keratin hydrogels and their evaluation as cell substrate with drug releasing ability," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 120, no. 1, pp. 111–116, 2015.
- [28] B. Ma, X. Qiao, X. Hou, and Y. Yang, "Pure keratin membrane and fibers from chicken feather," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 89, pp. 614–621, 2016.
- [29] P. Kakkar and B. Madhan, "Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications," *Materials Science and Engineering C*, vol. 66, pp. 178–184, 2016.
- [30] K. Xie, Y. Yu, and Y. Shi, "Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking," *Carbohydr. Polym.*, vol. 78, no. 4, pp. 799–805, 2009.
- [31] T. Pirzada, S. A. Arvidson, C. D. Saquing, S. S. Shah, and S. A. Khan, "Hybrid silica-PVA nanofibers via sol-gel electrospinning," *Langmuir*, vol. 28, no. 13, pp. 5834–5844, 2012.
- [32] J. Wang *et al.*, "Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 149, pp. 341–350, 2017.
- [33] M. L. Peralta Ramos, J. A. González, L. Fabian, C. J. Pérez, M. E. Villanueva, and G. J. Copello, "Sustainable and smart keratin hydrogel with pH-sensitive swelling and enhanced mechanical properties," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 619–626, 2017.
- [34] Y. Esparza, A. Ullah, and J. Wu, "Molecular mechanism and characterization of self-assembly of feather keratin gelation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 107, no. PartA, pp. 290–296, 2018.
- [35] Programa Sectorial de Salud, "Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013-2018," *Secr. Salud*, pp. 1–98, 2013.
- [36] American Cancer Society, "Comprensión de un diagnóstico de cáncer de seno," 2018. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno.html>.
- [37] INEGI, "Estadísticas a Propósito Del Día Mundial De La Lucha Contra El Cáncer De Mama (19 De Octubre)," *Inegi*, pp. 1–14, 2016.
- [38] D. F. Cópola, J. Nader, and R. Aguirre, "Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama," vol. 21, pp. 15–22, 2005.
- [39] J. D. Yager and N. E. Davidson, "Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 354, no. 3, pp. 270–282, Jan. 2006.
- [40] A.D.A.M., "Secreción del pezón," 2016. [Online]. Available:

<https://ssl.adam.com/content.aspx?productId=118&pid=5&gid=001515&site=adeslas.adam.com&login=ADES1378>.

- [41] S. Lee and D. Henthorn, *Materials in Biology and Medicine*. Taylor & Francis, 2012.
- [42] F. G. Bănică, *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. 2012.
- [43] I. Sánchez, Francisco J., Rosa M Novoa, Helena Díaz de Apodaca and A. Katime, "OBTENCION DE HIDROGELES DERIVADOS DEL ACIDO ITACONICO," in *Ingeniería e Investigación*, no. 33, 1996, pp. 106–113.
- [44] M. Bahram, N. Mohseni, and M. Moghtader, "An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications," S. B. B. T.-E. C. in A. and A. of H. Majee, Ed. Rijeka: InTech, 2016, p. Ch. 02.
- [45] C. E. Echeverri, C. Vallejo, and M. E. Londoño, "Síntesis Y Caracterización De Hidrogeles De Alcohol Polivinílico Por La Técnica De Congelamiento/Descongelamiento Para Aplicaciones Médicas (Synthesis and Characterization of Polyvinyl Alcohol Hydrogels By Freezing/Thawing Technique for Medical Applicati," *Rev. EIA*, vol. 6, no. 12, pp. 59–66, 2013.
- [46] M. Ramalingam, *Integrated biomaterials for biomedical technology*. Salem: Scrivener, 2012.
- [47] B. Basu, D. S. Katti, and A. Kumar, "Advanced Biomaterials : Fundamentals, Processing, and Applications." John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2010.
- [48] T. Trongsatitkul and B. M. Budhlall, "Microgels or microcapsules? Role of morphology on the release kinetics of thermoresponsive PNIPAm-co-PEGMA hydrogels," *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 5, pp. 1502–1516, 2013.
- [49] S. K. H. Gulrez, S. Al-Assaf, and G. O. Phillips, "Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications," A. B. T.-P. in M. and E. B.-F. A. and M. to T. A. Carpi, Ed. Rijeka: InTech, 2011, p. Ch. 05.
- [50] U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel, and H. P. Wiesmann, *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [51] U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel, and H. P. Wiesmann, *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009.
- [52] L. S. Liu, J. Kost, F. Yan, and R. C. Spiro, "Hydrogels from biopolymer hybrid for biomedical, food, and functional food applications," *Polymers (Basel)*, vol. 4, no. 2, pp. 997–1011, 2012.
- [53] S. Mohan, O. S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas, and S. P. Songca, "Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology," F. K. B. T.-R. A. in B. Perveen, Ed. Rijeka: InTech, 2016, p. Ch. 03.
- [54] N. Ni and M. J. Dumont, "Protein-Based Hydrogels Derived from Industrial

Byproducts Containing Collagen, Keratin, Zein and Soy,” *Waste and Biomass Valorization*, vol. 8, no. 2, pp. 285–300, 2017.

- [55] R. Karthikeyan, S. Balaji, and P. Sehgal, “Industrial applications of keratins-a review,” *J. Sci. Ind. Res. (India)*, vol. 66, no. September, pp. 710–715, 2007.
- [56] H. Lee *et al.*, “Human hair keratin and its-based biomaterials for biomedical applications,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 11, no. 4, pp. 255–265, 2014.
- [57] P. Hill, H. Brantley, and M. Van Dyke, “Some properties of keratin biomaterials: Kerateines,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 4, pp. 585–593, 2010.
- [58] K. Wrześniewska-Tosik and J. Adamiec, “Biocomposites with a content of keratin from chicken feathers,” *Fibres Text. East. Eur.*, vol. 15, no. 1, pp. 106–112, 2007.
- [59] J. R. Richter, R. C. De Guzman, O. K. Greengauz-Roberts, and M. Van Dyke, “Structure-property relationships of meta-kerateine biomaterials derived from human hair,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 1, pp. 274–281, 2012.
- [60] Wikipedia, “Queratina,” 2018. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Queratina>.
- [61] J. Maitra and V. K. Shukla, “Cross-linking in Hydrogels - A Review,” *Am. J. Polym. Sci.*, vol. 4, no. 2, pp. 25–31, 2014.
- [62] M. F. Akhtar, M. Hanif, and N. M. Ranjha, “Methods of synthesis of hydrogels ... A review,” *Saudi Pharm. J.*, vol. 24, no. 5, pp. 554–559, 2016.
- [63] F.-G. Banica and J. W. & Sons., *Chemical sensors and biosensors : fundamentals and applications*. Chichester: John Wiley & Sons, 2014.
- [64] M. H. Alves, B. E. B. Jensen, A. A. A. Smith, and A. N. Zelikin, “Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: New vista on a long serving biomaterial,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 11, no. 10. pp. 1293–1313, 2011.
- [65] R. parhi, “Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review,” *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 7, no. 4, pp. 515–530, 2017.
- [66] N. a Alcantar, E. S. Aydil, and J. N. Israelachvili, “Polyethylene glycol – coated biocompatible surfaces,” *J. Biomed. Mater. Res*, vol. 51, no. August 1999, pp. 343–351, 2000.
- [67] H. Zou, S. Wu, and J. Shen, “Polymer / Silica Nanocomposites : Preparation , Characterization , Properties , and,” pp. 3893–3957, 2008.
- [68] G. J. Owens *et al.*, “Sol-gel based materials for biomedical applications,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 77, no. January, pp. 1–79, 2016.
- [69] A. Ulatowska-Jarza, D. Andrzejewski, K. Maruszewski, H. Podbielska, and W. Strek, “Advantages of sol-gel technologies for biomedical applications,” 1999, vol. 3567, no., pp. 3567–3569.

- [70] M. Wang, X. Li, W. Hua, L. Shen, X. Yu, and X. Wang, "Electrospun Poly(acrylic acid)/Silica Hydrogel Nanofibers Scaffold for Highly Efficient Adsorption of Lanthanide Ions and Its Photoluminescence Performance," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 36, pp. 23995–24007, Sep. 2016.
- [71] M. Rahaman and M. N. Rahaman, *Ceramic Processing*. Taylor & Francis, 2006.
- [72] E. M. Figueira, "Degradación hidrolítica a diferentes pH de un material compuesto Poli(ácido láctico)/Quitano. Proyecto de Ingeniería de Materiales, Opción Polímeros, Venezuela," Universidad Simón Bolívar, 2008.
- [73] P. D. Calvert, "Polymer degradation and stabilisation. N. Grassie and G. Scott, Cambridge University Press, Cambridge, 1985. pp. 222, price £27.50, \$54.50. ISBN 0-521-24961-9," *Br. Polym. J.*, vol. 18, no. 4, p. 278, Jul. 1986.
- [74] C. Engineer, J. Parikh, and A. Raval, "Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System," *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 25, no. 2, pp. 79–85, 2011.
- [75] G. Alvarez Martínez, "Análisis de la degradación de ferrogel de alcohol polivinílico y nanopartículas de magnetita para su posible aplicación en regeneración tisular," Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, 2017.
- [76] A.D.A.M., "Secreción del pezón," 2018. [Online]. Available: <http://eclinicalworks.adam.com/content.aspx?productId=39&pid=5&gid=001515&print=1>.
- [77] Mayo Clinic, "Nipple discharge," 2018. [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/symptoms/nipple-discharge/basics/causes/sym-20050946>.
- [78] V. Parthasarathy and U. Rathnam, "Nipple Discharge: An Early Warning Sign of Breast Cancer," *Int. J. Prev. Med.*, vol. 3, no. 11, pp. 810–814, Nov. 2012.
- [79] L. Chen, W. Z. Yi, X. L. Qiang, D. X. Zha, and S. Wang, "Bloody nipple discharge is a predictor of breast cancer risk : A meta-analysis Bloody nipple discharge is a predictor of breast cancer risk : a meta-analysis," no. May, 2015.
- [80] Breast link, "Nipple Discharge," 2018. [Online]. Available: <http://www.breastlink.com/breast-cancer-101/common-breast-problems/nipple-discharge/>.
- [81] C. H. Martínez and F. Moreno, "Fundamentos en Biomateriales de uso Odontológico aplicaciones en Estética y Cosmética Dental: Biocompatibilidad," *Acta Odontol. Venez.*, vol. 49, pp. 1–5, 1987.
- [82] R. Kouser, A. Vashist, M. Zafaryab, M. A. Rizvi, and S. Ahmad, "Biocompatible and mechanically robust nanocomposite hydrogels for potential applications in tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 84, no. July 2017, pp. 168–179, 2018.

- [83] D. R. Rius, "Obtención de capas de nitruro de titanio mediante tratamiento termoquímico en titanio y Ti6Al4V y caracterización de sus propiedades para aplicaciones biomédicas," Universitat Politècnica de Catalunya, 1999.
- [84] M. Riós Hernández and J. Cepero Cañas, "Citotoxicidad in vitro: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba," *Rev. CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 37, no. 3, pp. 173–176, 2006.
- [85] ISO (International Organization for Standardization), "ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity," *Communication*, 2009.
- [86] J. M. Buchanan, P. J. Upman, and R. F. Wallin, *Practical guide to ISO 10993-4: hemocompatibility*, vol. 20. 1998.
- [87] Y. S. Kim *et al.*, "Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats," *Inhal. Toxicol.*, vol. 20, no. 6, pp. 575–583, Jan. 2008.
- [88] S. Krajewski *et al.*, "Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 7, pp. 7460–7468, 2013.
- [89] Shutterstock, "Hemolysis. Normal red blood cell, spherocyte, and rupturing of erythrocyte (release of contents into blood plasma). illustration for medical use - Ilustración," 2019. [Online]. Available: [https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/hemolysis-normal-red-blood-cell-spherocyte-1120741583?src=PHbcNUtVo4PiDFu4vtb\\_cQ-1-5](https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/hemolysis-normal-red-blood-cell-spherocyte-1120741583?src=PHbcNUtVo4PiDFu4vtb_cQ-1-5).
- [90] M. F. Elahi, G. Guan, and L. Wang, *Hemocompatibility of surface modified silk fibroin materials: A review*, vol. 38. 2014.
- [91] "Heating ability and hemolysis test of magnetite nanoparticles obtained by a simple co-precipitation method," *Rev. Mex. Trastor. Aliment.*, vol. 14, no. 4, pp. 239–244, 2016.
- [92] J. Choi, V. Reipa, V. M. Hitchins, P. L. Goering, and R. A. Malinauskas, "Physicochemical Characterization and In Vitro Hemolysis Evaluation of Silver Nanoparticles," *Toxicol. Sci.*, vol. 123, no. 1, pp. 133–143, Jun. 2011.
- [93] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, and M. C. M. Gómez, *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill, 2000.
- [94] Universidad Nacional de Educación a Distancia UNED, "MICROSCOPIA ELECTRÓNICA," 2007. [Online]. Available: [http://www2.uned.es/cristamine/mineral/metodos/micr\\_electr.htm](http://www2.uned.es/cristamine/mineral/metodos/micr_electr.htm).
- [95] M. A. Ganzoury, N. K. Allam, T. Nicolet, and C. All, "Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 50, pp. 1–8, 2015.
- [96] A. Jabs, "Determination of Secondary Structure in Proteins by Fourier

Transform Infrared Spectroscopy (FTIR),” 2014. [Online]. Available: [http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE\\_FTIR.html](http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html). [Accessed: 10-Nov-2018].

- [97] Y. Estévez-Martínez *et al.*, “Grafting of Multiwalled Carbon Nanotubes with Chicken Feather Keratin Grafting of Multiwalled Carbon Nanotubes with Chicken,” no. June 2014, 2013.
- [98] R. Schor and S. Krimm, “Studies on the Structure of Feather Keratin: I. X-Ray Diffraction Studies and Other Experimental Data,” *Biophys. J.*, vol. 1, no. 6, pp. 467–487, 1961.
- [99] K. E. Moore, D. N. Mangos, A. D. Slattery, C. L. Raston, and R. A. Boulos, “Wool deconstruction using a benign eutectic melt,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 24, pp. 20095–20101, 2016.
- [100] A. Ahmadi, B. Ramezanzadeh, and M. Mahdavian, “Hybrid silane coating reinforced with silanized graphene oxide nanosheets with improved corrosion protective performance,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 59, pp. 54102–54112, 2016.
- [101] F. Romero-Gavilán *et al.*, “Control of the degradation of silica sol-gel hybrid coatings for metal implants prepared by the triple combination of alkoxysilanes,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 453, pp. 66–73, 2016.
- [102] T. NASH, A. C. ALLISON, and J. S. HARINGTON, “Physico-Chemical Properties of Silica in Relation to its Toxicity,” *Nature*, vol. 210, no. 5033, pp. 259–261, 1966.
- [103] C. H. Moore and W. J. Wade, “Chapter 4 - The Nature and Classification of Carbonate Porosity,” in *Carbonate Reservoirs*, vol. 67, C. H. Moore and W. J. B. T.-D. in S. Wade, Eds. Elsevier, 2013, pp. 51–65.
- [104] M. Claudia, “Estudio de la transición SOL-GEL y de la estructura de geles de titanía con sondas fotofísicas TITANIA,” 2001.
- [105] B. Mirti, G. Survey, and N. Sciences, “Accuracy and precision of EDS analysis for identification of metal-bearing minerals in polished and rough particle samples,” pp. 5–17, 2013.
- [106] W. Ratirotjanakul, T. Suteewong, and D. Polpanich, “Microporous and Mesoporous Materials Amino acid as a biodegradation accelerator of mesoporous silica nanoparticles,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 282, no. February, pp. 243–251, 2019.
- [107] E. Choi and S. Kim, “Journal of Colloid and Interface Science Surface pH buffering to promote degradation of mesoporous silica nanoparticles under a physiological condition,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 533, pp. 463–470, 2019.
- [108] B. L. Razzaboni and P. Bolsaitis, “Evidence of an oxidative mechanism for the hemolytic activity of silica particles,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 87, pp. 337–341, Jul. 1990.

- [109] R. S. Pandurangi, M. S. Seehra, B. L. Razzaboni, and P. Bolsaitis, "Surface and bulk infrared modes of crystalline and amorphous silica particles: a study of the relation of surface structure to cytotoxicity of respirable silica," *Environ. Health Perspect.*, vol. 86, pp. 327–336, Jun. 1990.
- [110] A. J. Paula, D. S. T. Martinez, R. T. Araujo Júnior, A. G. Souza Filho, and O. L. Alves, "Suppression of the hemolytic effect of mesoporous silica nanoparticles after protein corona interaction: independence of the surface microchemical environment," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 23. scielo, pp. 1807–1814, 2012.
- [111] M. A. Dobrovolskaia, J. D. Clogston, B. W. Neun, J. B. Hall, A. K. Patri, and S. E. McNeil, "Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 8, pp. 2180–2187, Aug. 2008.
- [112] J. F. Krzyzaniak and S. H. Yalkowsky, "Lysis of Human Red Blood Cells 3: Effect of Contact Time on Surfactant-Induced Hemolysis," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 52, no. 2, pp. 66–69, Mar. 1998.
- [113] K. Amin and R.-M. Dannenfelser, "In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist," *J. Pharm. Sci.*, vol. 95, no. 6, pp. 1173–1176, 2006.
- [114] S. Iswar, W. J. Malfait, S. Balog, F. Winnefeld, M. Lattuada, and M. M. Koebel, "Effect of aging on silica aerogel properties," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 241, pp. 293–302, 2017.

## ANEXOS

### Carta de consentimiento informado

---

Se le está invitando a participar en el proyecto de investigación realizado por alumnos de la **Maestría en Ciencias de los Materiales** de la **Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ)** donde se desarrollará un hidrogel a base de sílice con queratina el cual tiene como objetivo **Elaborar un hidrogel a base de queratina-sílice biodegradable y evaluar el efecto de la degradación hidrolítica en el porcentaje de hemolisis**. Las propiedades estudiadas afectan la elaboración de este material compuesto, por lo que la meta es utilizar este estudio para observar el porcentaje de hemolisis que presenta el material y así seguir vías de desarrollo para optimizar sus propiedades.

Su participación consiste en una **toma de sangre para ser empleada en un ensayo de hemolisis**. No existe riesgos alguno que se pueden derivar de este procedimiento, sin embargo, la información recaba será incluida como parte de la discusión de una tesis de maestría.

Se me ha explicado que mi participación es voluntaria y que puedo abandonar el estudio en el momento que lo desee sin que esto afecte mi relación con la UACJ. Se me ha garantizado que mis datos personales permanecerán en el anonimato y no se utilizara ninguna fotografía o audio grabado por mi persona.

Declaro que todo lo que se ha mencionado en este documento me fue explicado verbalmente.

Con fecha 8 de mayo de 2019 y, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación, **(en caso de menores de edad, redactar en relación a "mi hijo(a) y/o tutorado legal")**, acepto participar en el estudio antes mencionado.

Víctor Gómez Flores



---

Nombre, firma y/o huella digital del paciente o responsable legal

Nombre y firma de participantes menores de edad de 8-17 años **en caso de que aplique**

---

Nota: En participantes menores de edad, menores de 8 años firma el padre o tutor legal, en edades de 8-17 años también firma el menor de edad.

**NOTA DISPENSA DE CONSENTIMIENTO:** En caso de no requerir el consentimiento fundamentar el hecho ya que puede ser un estudio por observación, retrospectivo o sin riesgo.

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador. Queda entendido que este documento estará disponible para su consulta y deberá ser conservado por el investigador responsable durante un mínimo de 5 años (NOM-004-SSA3-2012).

Para preguntas o comentarios comunicarse con la Dra. Perla E. García Casillas Responsable del Proyecto, al teléfono 656 688 4887 y correo electrónico pegarcia@uacj.mx.