UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

FCITEC

UNIDAD VALLE DE LAS PALMAS

BIOACTIVIDAD DE NANOFIBRAS DE ALGAS MARINAS PARA SU USO EN APLICACIONES BIOMÉDICAS

Estudiante: Lhia Daniela Martínez Rodríguez

Matrícula: 1245533

Carrera: Bioingeniería

Profesor: Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Tijuana, Baja California, México, mayo de 2021

DEDICATORIA

A mis padres Ángel y Mayra. A mis hermanos Christian, Argelia y Sophia.

Por su amor, apoyo, cariño y paciencia.

¡Ustedes son por mucho mi mayor inspiración y mis personas favoritas en la vida!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis padres porque sin ellos nada de esto sería posible, por apoyarme en mis decisiones y locuras ciegamente, por darme su amor incondicional a pesar de la distancia. Gracias papá por tus mensajes de motivación todos los días que despertaba para irme a la escuela, gracias mamá por escuchar mis frustraciones y brindarme tus consejos.

A mis hermanos por escucharme, reír y llorar a mi lado e inclusive por aguantarme en los momentos más frustrantes de la carrera, gracias por ponerme atención cuando hablo de esto, se perfectamente que a veces no me entendieron ninguna una palabra, pero siempre han estado ahí y eso es mucho para mí.

A mis amigos, les agradezco mucho su paciencia, sus consejos y esa motivación que de principio a fin me han brindado. Gracias por estar en cada momento importante y por creer en mí, más de lo que yo he creído, han sido parte de una de las etapas más significativas de mi vida y por siempre lo recordare.

Por otro lado, agradezco a Erick Torres y Daniella Pompa por ser tan lindos y unas personas admirables, sin sus consejos y ayuda jamás hubiera pensando en escribir una tesis, han sido parte de mi formación tanto académica como personal durante mis últimos semestres en la universidad y eso siempre lo guardare en mi corazón.

Agradezco a mis compañeras tesistas, Paulina y Viridiana, gracias por acompañarme en esta travesía, ha sido un placer compartir el laboratorio y pelear con ustedes por el electrohilado.

A mi director de tesis: Dr. Luis Villarreal por confiar en mi al realizar este proyecto, por aconsejarme y alentarme a cumplir mis metas y sueños. Ha sido un placer poder haberlo conocido no tan sólo como profesor sino como un amigo. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de algo en lo que de principio a fin sentí que encajaba conmigo a la perfección. Descubrir en su laboratorio y mediante la investigación lo maravilloso que es la naturaleza de este mundo ha sido fascinante.

A todos ustedes muchas gracias por ser parte de mi vida, por hacerme reír, por sus consejos, su confianza, su cariño y especialmente su tiempo. Nada de lo que soy ahora sería posible sin ustedes.

INDICE

BIOACTIVIDAD DE NANOFIBRAS DE ALGAS MARINAS PARA SU USO EN APLICACIONES BIOMÉDICAS

DEDICATORIA 2
AGRADECIMIENTOS 3
RESUMEN 7
I. INTRODUCCIÓN 8
II. MARCO TEÓRICO 11
2.1. Importancia de las algas marinas 11
2.2. Técnica de Electrohilado 17
2.2.1. Parámetros del electrohilado 23
III. OBJETIVOS 33
3.1. Objetivo general 33
3.2. Objetivos específicos 33
IV. HIPOTESIS 33
V. METODOLOGIA 34
5.1. Muestras 34
5.2. Preparación de extractos 35
5.3. Preparación de la muestra 36
5.4. Electrohilado 38
5.5. Análisis termogravimétrico 38
5.6. Análisis de calorimetría diferencial de barrido 39
5.7. Análisis antimicrobiano 39
5.7.1. Preparación de medio de cultivo 40

5.7.2. Preparación de cepas bacterianas 41
5.7.3. Colocación de nanofibras en placas 41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES 42
6.1 Electrohilado 42
6.2. Fluorescencia de las nanofibras 44
6.3 Análisis termogravimétrico 47
6.4 Análisis de calorimetría diferencial de barrido 50
6.5. Actividad Antimicrobiana 52
6.5.1 Comparación antimicrobiana entre sistemas de compositos de PCL 55
VII. CONCLUSIONES 59
VIII. BIBLIOGRAFIA 60

RESUMEN

A lo largo de los años, las algas marinas han sido de interés biomédico gracias a su gran variedad de propiedades, las cuales principalmente poseen propiedades antibacterianas. En este estudio, se examina la viabilidad de utilizar fibras electrohiladas de las algas marinas *Colpomenia sinuosa* y *Egregia menziesii*, para ser utilizadas como sistemas antibacterianos para *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Las fibras fueron caracterizadas a través de análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido, con el fin de evaluar su comportamiento térmico. Las fibras fueron observadas a través del microscopio de fluorescencia, para observar su capacidad fluorescente y morfología y, finalmente, las fibras fueron expuestas a dichas bacterias por 24 y 48 hrs. Como resultado, se pueden observar fibras homogéneas fluorescentes, dichas fibras presentaron actividad bacteriana en las tres cepas evaluadas y poseen una estabilidad térmica correspondiente a la literatura. Los resultados de este estudio son la base para la fabricación de apósitos cutáneos para el tratamiento de heridas de piel y quemaduras.

Palabras clave: Actividad antibacteriana; *Colpomenia sinuosa*; *Egregia menziesii*; Electrohilado; Fibras fluorescentes.

I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado los productos de origen marino como alternativas terapéuticas para el tratamiento de numerosas patologías (Piggott, *et al*., 2005). El ambiente marino contiene especies y animales que han desarrollado distintas habilidades y capacidades adaptativas debido al estrés ambiental al que están sometidos constantemente (El Gamal, 2010). Por lo que los organismos marinos han formado parte de investigaciones para el desarrollo de agentes farmacéuticos alternativos.

En esta continua búsqueda, las algas marinas y su biodiversidad han constituido una fuente inagotable de exploración, convirtiéndolas en uno de los recursos potenciales de dichos compuestos farmacéuticos. En literatura científica, se encuentra que tanto las macroalgas, como las microalgas marinas son fuente de sustancias con estructuras novedosas y diferentes actividades biológicas (Menendez, *et al.,* 2010). Uno de los objetivos de la explotación de las algas marinas es diversificar su aplicación seleccionando diversos compuestos bioactivos, que permanecen inexplorados en las áreas nutraceútica y farmacéutica. El interés en utilizar algas como recurso natural ha aumentado recientemente debido a sus muchos ingredientes activos, particularmente aquellos que pueden usarse con fines médicos. Los polímeros de los carbohidratos de las algas marinas se han explotado recientemente para diversas aplicaciones y los polisacáridos de algas, han surgido como fuentes ricas e importantes de compuestos naturales bioactivos con una amplia gama de actividades filológicas y biológicas incluyendo inmunomodulación, antiinflamación, antioxidantes, anticoagulante y antitumoral (Wang, *et al.,*2014).

En el presente trabajo se enfatiza dos tipos de algas, las cuales han sido estudiadas con la finalidad de proporcionar apósitos cutáneos para el tratamiento de heridas en la piel y así como también quemaduras. Dichas algas poseen propiedades y distintas aplicaciones que han sido investigadas con el paso del tiempo.

Colpomenia sinuosa es un tipo de macroalga, utilizada generalmente para el tratamiento de inflamaciones ocasionados por golpes. Posee propiedades como antibacterianas, antioxidante, citotóxica, antibioincrustante e inhibitoria de los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos. Crecen en escasa profundidad, son fáciles de colectar y no son toxicas; además en muchas ocasiones se encuentran varadas en abundancia lo cual puede llegar a constituir una forma de contaminación ambiental de carácter orgánico (Dad, *et al.,* 2014).

Egregia menziesii es una especie de alga parda, funge como protector de los ecosistemas costeros; ya que debido a su longitud y grandes poblaciones se asemeja a un rompeolas natural, frenando así la fuerza con que llegan las olas, por ello existe un gran interés para su estudio en el área biomecánica (Colin, 2017). También se ha encontrado que dicho extracto de este tipo de alga es un excelente candidato para la búsqueda de compuestos con actividad anti- hiperglicémiante (Gutiérrez, 2018). Cabe mencionar que este tipo de alga también ha sido estudiada para comprobar su actividad anticancerígena y antibacteriana lo cual es un hallazgo interesante para la ecología y bioactivo en compuestos químicos (Villarreal *et al.,* 2010).

La creación de nanofibras fue desarrollada con la técnica de electrohilado. La cual tiene como objeto crear fibras en escala micro y nanométrica para una gran variedad de aplicaciones biomédicas, esta técnica aporta a los elementos desarrollados diversas características como: amplia superficie por unidad de área, porosidad y una serie de propiedades mecánicas (Velasco Barraza, 2016).

La técnica de electrohilado ha sido utilizada como un método eficiente y accesible para la fabricación de nanofibras con una gran variedad de aplicaciones como lo son los campos de la farmacéutica y medicina, con más razón en la regeneración de tejidos. Tales aplicaciones podrían ser: apósito para heridas, filtración, sistema de administración de fármacos o andamios de ingeniería de tejidos (Villarreal, *et al.*, 2016; Sajeev, *et al.,* 2008)

Regularmente los polímeros utilizados en la técnica de electrohilado suelen ser biodegradables y biológicamente compatibles, con la finalidad de no ocasionar algún daño cuando se encuentran en contacto con un medio fisiológico. En este proyecto se utilizó PCL (*poli-caprolactona*), el cual es un polímero sintético, semicristalino, con buenas propiedades mecánicas, fácil de procesar, compatible tanto con tejidos duros como blandos y aceptado por la FDA. Utilizado en la técnica de electrohilado para aplicaciones médicas, debido al gran interés que existe por su no toxicidad, compatibilidad con otros biopolímeros, la adhesión celular y la proliferación. Las fibras electrohiladas de PCL son estudiadas para la ingeniería de tejidos por ser ventajosas, ya que el tamaño del poro se puede controlar fácilmente cambiando la densidad de la fibra en la unidad de área (Sánchez Cepeda, 2016).

Finalmente, el objetivo de este trabajo consiste en la creación de nanofibras a partir de extractos de alga marina mediante la técnica de electrohilado, con el fin de que dichas fibras puedan ser utilizadas como un método terapéutico en lesiones cutáneas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Importancia de las algas marinas

Actualmente la mayoría de las algas que se encuentran en las costas son consideradas como plagas, en estudios anteriores se demostró la gran bioactividad que estas poseen, como es la actividad antioxidante, antiviral y la antimicrobiana por mencionar algunas (Chojnacka, 2012). Haciendo énfasis en lo mencionado anteriormente en la tabla 1 se describe la actividad biológica que ejercen algunas sustancias y en la tabla 2 algunas aplicaciones destacadas de algas utilizadas en estudios anteriores.

Tabla 1. Sustancias biológicamente activas en extractos de alga

Sustancia Biológicamente Activo	**Actividad**	**Referencia**
Polisacáridos	Prebióticos, actividad antimicrobiana, actividad promotora del crecimiento, la actividad de mejora de la salud, actividad antiviral, actividad anti-tumor, actividad antiinflamatoria, fuente de fibras dietéticas solubles, antioxidantes, actividad antitrombótica, actividad anticoagulante.	(Ale *et al.,* 2011)
Proteínas	Fuente de aminoácidos esenciales, elementos de la comunicación intercelular, actividad antiviral, actividad	(Cabra *et al.,* 2008)

	antimicrobiana, actividad anti-inflamatoria, antioxidantes	
Grasos poliinsaturados ácidos	Actividad mejora de la salud, actividad antibiótica, actividad antifúngica	(Lozano, 2013; Molinar, 2015)
Pigmentos	Antioxidantes, actividad antiinflamatoria, actividad antiviral, actividad neuroprotectora, actividad anti-obesidad, actividad anti-angiogénica, actividad contra el cáncer	(Gimenez *et al.,* 2013)
Los polifenoles	El anfitrión de la actividad de defensa, antioxidantes fuertes, actividad antimicrobiana, actividad antiviral, anti-foto actividad envejecimiento, actividad anti-obesidad, actividad antialérgica, Actividad contra el cáncer	(Molinar, 2015)
Minerales	Crecimiento y salud, la mejora de la actividad	(Nazrul, 2013)
Hormonas de crecimiento vegetal	Estimulantes del crecimiento, actividades de protección, controladores de la división celular, estimulantes formación de raíces, anfitrión de la actividad de defensa, fuente de nitrógeno para las plantas.	(Camelo *et al.,* 2011)

Tabla 2. Aplicaciones industriales de algunas algas marinas utilizadas en estudios previos.

Alga	Aplicación	Referencia
Baby pondweed	-Al crecer en abundancia puede ser utilizada como biorreactor.	(Jackson, 2008)
Colpomenia sinuosa	-Utilizada en forma de emplastos, en el tratamiento de inflamaciones ocasionados por golpes.	(Kanagasabhapath y *et al.,* 2009)
Egregia menziesii	-Fertilizante hortícola, en forma de extracto aplicado sobre cultivos de calabacita.	(Hernández *et al.,* 2018)
Sargassum muticum	-Capaces de modificar positivamente los niveles de colesterol total, triglicéridos, colesterol ligado a las HDL y colesterol ligado a las LDL en el plasma de ratas. -Estimular la actividad de la LPL, que es la principal enzima implicada en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas, de una manera similar a como lo hace la heparina, que es su activador exógeno más importante.	(Gonzalez *et al.,* 2012)
Gelidium robustum	-Producción de agar alimenticio y bacteriológico. Industria bacteriológica y alimenticia.	(Hurtado *et al.*, 2011)

Bajo el nombre de alga marina se agrupa una gran variedad de organismos, tanto pluricelulares como unicelulares, de ambientes acuáticos o húmedos que tienen en

común ser fotosintéticos, y a diferencia de las plantas no tienen verdaderos tejidos diferenciados tales como, raíz, tallo, hojas y no producen flores y semillas. Se trata de un grupo de organismos muy heterogéneo con distinta historia evolutiva, aunque con una función ecológica muy parecida (Aguilar *et al.,* 2010).

Las algas constituyen un grupo dentro de las Talofitas muy importante, no sólo desde el punto de vista científico, sino también desde el práctico y lo económico. Cuentan con una verdadera historia de su explotación, comenzada empíricamente en los tiempos más antiguos y continuada en la actualidad de modo más científico y racional (Aguilar *et al.,* 2010).

Hoy en día las algas son estudiadas con el fin de diversificar su aplicación en distintas áreas, principalmente en el área médica y ambiental, asuntos con mayor importancia en la actualidad.

Las algas verdes, pardas y rojas contienen varios compuestos orgánicos e inorgánicos que son benéficos para la salud humana (Kuda *et al.,* 2002) por su alto valor nutricional y sus propiedades curativas de muchas enfermedades (Frikha *et al*., 2011).

Egregia menziesii es un alga marina perenne, ubicada en la clasificación de algas pardas (*Phaeophyta*), perteneciente a la familia *Lessoniaceae*. Su estructura incluye ramificaciones adhesivas para mantenerse fijo al fondo rocoso (crampón). De estas salen sus frondas individuales, cada individuo puede tener varias frondas (hasta más de diez por alga) (Lydia *et al.,* 2013).

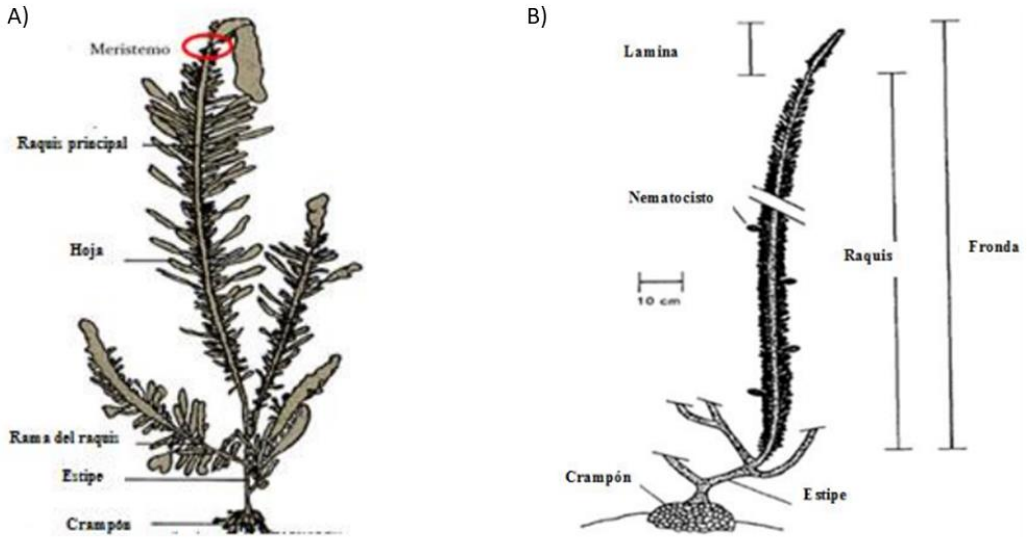

Figura 1. Morfología de *Egregia menziesii.* A) Individuo completo. B) Fronda principal (modificado de (Lydia *et al.,* 2013).

Se ha observado y estudiado que *Egregia* crece a un tamaño demasiado grande para el hábitat en el que se encuentra. Ha sido objeto de estudio en el área biomecánica debido a su gran longitud y grandes poblaciones por lo que realiza un trabajo semejante a un rompeolas natural (Colin, 2017; Lydia *et al.,* 2013)

Dentro de sus propiedades estudiadas se encuentran la anticancerígena, antibacteriana y anti-hiperglicemiante (Anllely *et al.,* 2018; Villarreal *et al.,* 2010).

Además, dentro de la literatura científica se demuestra su aplicación en el área de biomedicina al poseer metabolitos secundarios, también en el área ambiental al actuar como reactivo reductor de un precursor de oro, así como también en el área agrícola al funcionar como un fertilizante hortícola (Colin, 2017; Hernández *et al.*, 2018).

Colpomenia sinuosa es también un alga parda, perteneciente a la familia *Scytosiphonaceae*, es un alga marrón comestible (Cherry, *et al.,* 2019; El Asri *et al.,* 2017). Su morfología se describió hace décadas: lleva un talo sésil que está unido por una base ancha: eso es un coriáceo y huevo, globular, cuando es joven, se expande y dobla a medida que envejece (Parsons, 1982).

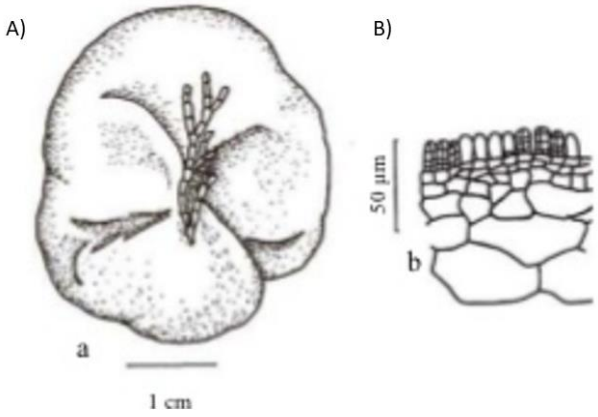

Figura 2. Morfología de *Colpomenia sinuosa.* A) Aspecto del talo. B) Corte con órganos pluriloculares (Parsons, 1982).

Posee propiedades como antibacterianas, antioxidante, citotóxica, antibioincrustante e inhibitoria de los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos (Dad *et al.,* 2014).

Se usa como alimento humano, debido a la presencia de propiedades antioxidantes, una buena fuente de fenoles, vitaminas, ácido fólico y aminoácidos (Khin Khin Gyi, 2010). Es rica en ácidos grados insaturados, fucolesteroles, acido palmítico y el aminoácido lisina (Parsons, 1982; Tabarsa *et al.,* 2012). También es utilizada para el tratamiento de inflamaciones provocadas por golpes (Kanagasabhapathy *et al.*, 2009).

Colpomenia sinuosa es la primera especie marina donde el colpol citotóxico, un dibromuro de fenilbutano metabolito, fue encontrado y descubierto. Previamente se ha reportado que dicho metabolito presenta actividad inhibitoria de la enzima Acetilcolinesterasa (degrada la acetilcolina en la sinapsis neuronal) siendo la carencia de acetilcolina una de las señales de alarma características de la enfermedad de Alzheimer, de tal manera que es considerado para convertirse en un medicamento contra dicha enfermedad (Mendoza, 2017).

Esta especie al ser estudiada de diferentes zonas geográficas ha dado como resultado que no poseen citotoxicidad contra una variedad de líneas celulares de cáncer, por otro lado, en otro estudio indujo la apoptosis en células de leucemia humana a través de la generación ROS (especies reactivas de oxígeno), radicales libres que tienen la capacidad de producir daños oxidativos (Monla *et al*., 2020).

2.2. Técnica de Electrohilado

La técnica de electrohilado ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años gracias a la posibilidad de crear fibras en escala micro y nanométrica para una gran variedad de aplicaciones biomédicas, esta técnica aporta a los elementos desarrollados diversas características como: amplia superficie por unidad de área, porosidad y una serie de propiedades mecánicas (Velasco Barraza, 2016), siendo atractiva a nivel biotecnológico.

La técnica consiste en hacer girar soluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, se basa en aplicar suficientes fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado, de esta forma a un voltaje determinado, finos chorros de solución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector. Posteriormente el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, elongándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad en algunas ocasiones (Greiner *et al.,* 2007). El disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados al azar en un sustrato.

En la figura 3 se muestra el aparato utilizado para la realización de este trabajo, el cuál funciona con un voltaje de 20 kV (fuente de alto voltaje) dentro del sistema de inyección se coloca la aguja correspondiente (en este caso 22G x 40 mm), en el mismo sistema se programa el flujo constante y aproximadamente el tiempo (esto depende bastante del tipo de solución), dentro de la caja aislante protectora se sitúa el colector en donde se coloca papel alumnio con medidas 15 cm x 15 cm en donde nuestras fibras caen y obtenemos el producto. Es importante destacar que dentro de la caja aislante

puede haber muchos factores que favorezcan o no a nuestras fibras, es decir, si dentro de ella no tenemos la temperatura y humedad adecuada el tiempo de electrohilado puede resultar mayor o simplemente no obtenemos lo que deseamos.

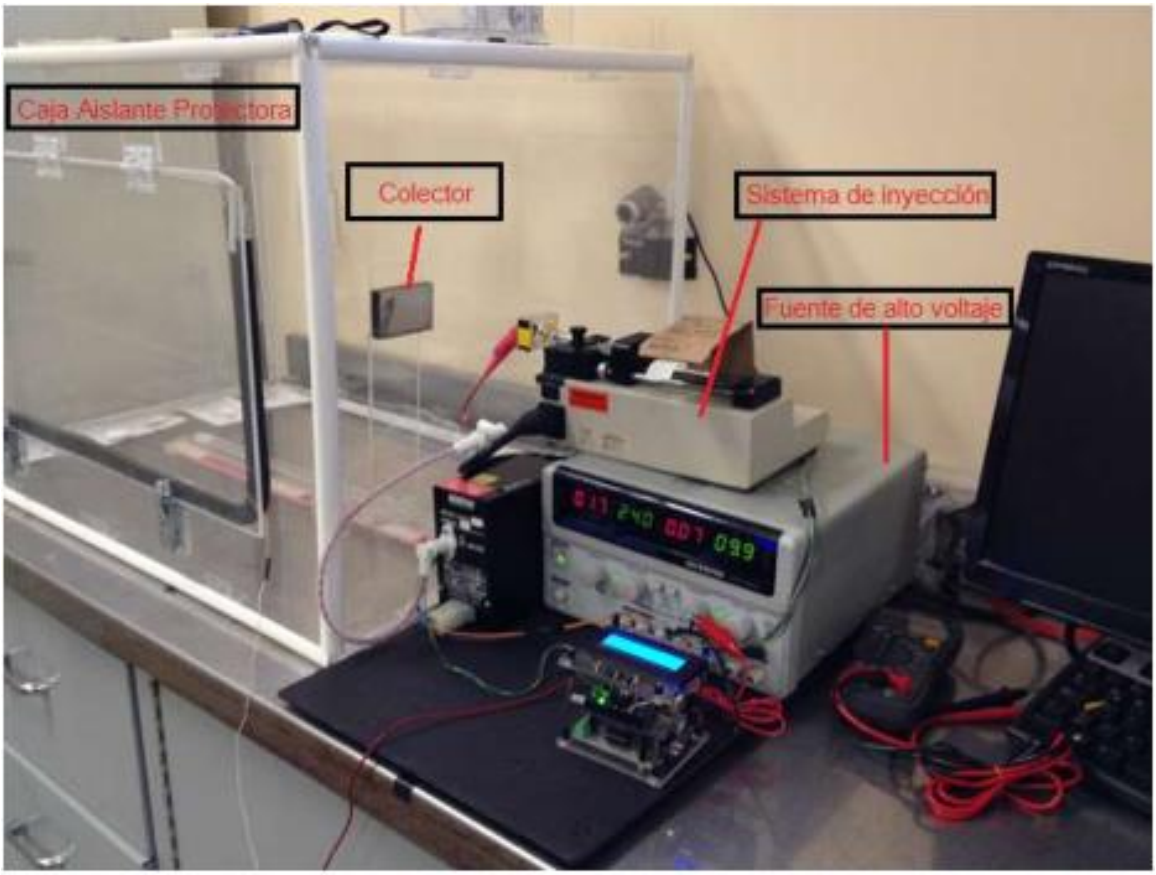

Figura 3. Componentes a utilizar en el proceso de electrohilado (Velasco Barraza, 2016)

La finalidad del proyecto consistió en crear nanofibras a partir del polímero poli (Ɛ-caprolactona) (PCL), usando como solvente una mezcla de tetrahidrofurano (THF) y metanol, en una proporción de 3:1 y diferentes extractos de algas, que fueron obtenidas de las costas de Baja California, usualmente son consideradas como plaga. Con el propósito de crear nanofibras que puedan servir como andamios para heridas, gracias a las características antimicrobianas que estas poseen.

Aproximadamente desde hace 100 años la técnica de electrohilado fue creada y ha generado enorme atención en los últimos años, debido a la posibilidad de las

diversas aplicaciones biomédicas que se podrían implementar. En el año 2012 según Tucker *et al.,* afirmaron que las fibras electrohiladas con un área de alta relación de superficie a volumen y las estructuras que imitan la matriz extracelular (ECM) que componen dichas fibras han presentado gran potencial en la ingeniería de tejidos y la administración de fármacos.

Es de suma importancia destacar que dicha técnica ha sido utilizada como un método competente y accesible para la fabricación de nanofibras dando como resultado diversas aplicaciones que desde hace algunos años se han podido encontrar en la literatura científica. Ciertas aplicaciones que destacan por algunos autores como Sajeev, *et al.,* en el año 2008 y Villarreal *et al.,* en 2016 son: apósitos para heridas, filtración, sistema de administración de fármacos y andamios de ingeniería de tejidos.

Es un proceso muy simple y versátil por el cual nanofibras de polímeros con diámetros que van desde unos pocos nanómetros a varios micrómetros se pueden producir impulsando una solución polimérica o una fusión y cargando electrostáticamente a esta. Se han hecho progresos significativos en este proceso a lo largo de los últimos años y el electrohilado ha avanzado en sus aplicaciones en muchos campos, incluyendo la farmacéutica. Las nanofibras electrohiladas muestran un gran potencial para el desarrollo de muchos tipos de sistemas de administración de fármacos nuevos (SAF o DDS por sus siglas en inglés), debido a sus características especiales, su utilidad y eficacia. El estado actual de las nanofibras electrohiladas basadas en sistemas de administración de fármacos se centra en la preparación las nanofibras cargadas con el fármaco de polímeros farmacéuticos y biodegradables, y diferentes tipos de sistemas de administración de fármacos. Sin embargo, hay más oportunidades para ser explotadas en el proceso de electrohilado (Yu *et al.,* 2009; Velasco Barraza, 2016).

Con el objeto de desarrollar fibras electrohiladas para estas aplicaciones, se han utilizado diferentes materiales biocompatibles para fabricar fibras con diferentes estructuras y morfologías, tales como fibras individuales con diferente composición y estructura (mezclado de fibras y fibras compuestas de núcleo-corteza) y conjuntos de fibras (haces de fibras, membranas y andamios) (Cui *et al.,* 2010).

La base fundamental del electrohilado es la aplicación de un campo eléctrico fuerte (alrededor de los kilovoltios). Una solución de polímero o una solución fundida, es alojada en una jeringa y esta a su vez en una bomba de infusión. Cuando se aplica un alto voltaje, la gota que cuelga de la solución polimérica se tornará altamente electrificada y las cargas inducidas se distribuirán uniformemente sobre la superficie. La gota líquida se deformará en un objeto cónico conocido como el “cono de Taylor”, esto es debido al campo electrostático presente (Velasco Barraza, 2016) (Figura 2).

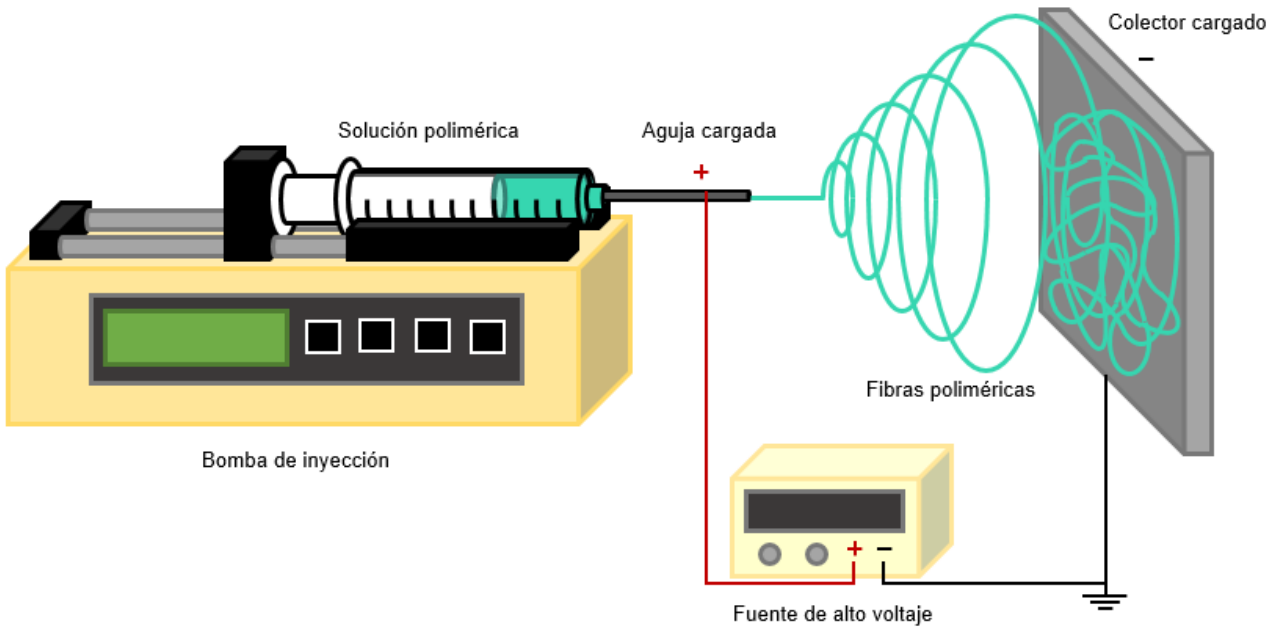

Figura 4. Esquema general de la disposición y procesos de electrohilado convencional.

Dentro de la literatura científica podemos encontrar como con la técnica de electrohilado se crean nanofibras mediante parámetros que han sido estudiados previamente. Pérez González *et al., (2019)* explican que, cuando el voltaje sobrepasa un valor umbral establecido, la fuerza electrica supera la tensión superficial de la gota de tal manera que uno o varios chorros cargados de la solucion utilizada son expulsados desde

la punta de la jeringa, dependiendo de la intensidad del campo eléctrico presente. Una vez que el chorro se desplaza hacia un colector de metal (regularmente en aluminio), el disolvente se evapora y se produce un andamio polimérico no tejido sobre el colector, mejor conocido como nanofibras (Pérez *et al.,* 2019).

Harmanpreet Singh *et al., (2015)* en su investigación ‘‘T*ransmucosal delivery of Docetaxel by mucoadhesive polymeric nanofibers* ’’, mencionan que los efectos de varios parámetros del proceso, tales como: la intensidad del campo eléctrico aplicada, el caudal, las propiedades de la solución (concentración, viscosidad, conductividad, tensión superficial, homogeneidad), la distancia entre la jeringa y el colector, los parámetros ambientales (temperatura, humedad y flujo de aire) se han explorado con gran detalle para diferentes materiales poliméricos (Singh *et al.,* 2015).

Básicamente la instalación del equipo de electrohilado es tan simple que se ha establecido en muchos laboratorios de investigación. La implementación de esta técnica se ha dado principalmente en arreglos donde sólo se utilizó una solución de polímero. Sin embargo, una cantidad de polímeros existentes no pueden ser electrohilados en fibras usando una configuración básica, debido a las propiedades que los constituyen. Con la finalidad de expandir el conocimiento de dicha técnica y adaptar la estructura de las fibras resultantes, se han modificado con el paso de los años los diseños de estos equipos. Según la literatura científica las modificaciones realizadas han estado basadas en la jeringa y colector.

En el año 2016 Cornejo Bravo *et al.,* destacan en su investigación ‘‘*Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques’’* que existen distintos tipos de electrohilado, incluyendo co-electrohilado, electrohilado lado a lado, electrohilado multi-canal, electrohilado coaxial, electrohilado de emulsión y métodos que no utilizan o requieren de agujas o jeringas (rodillos, reservorios, placas, cilindros, esferas rotatorias). Así como también mencionan que, existiendo diferentes técnicas, abre las posibilidades de incorporar moléculas bioactivas tales como fármacos, proteínas y ADN. El método principal que se utilizará en el trabajo, será de una sola solución de polímero (Cornejo *et al.,* 2016).

Hadipour *et al., (2014)* en su trabajo de investigación mencionan que las nanofibras poliméricas poseen propiedades únicas tales como área superficial alta en relación al volumen y una alta porosidad con diversos tamaños de poro. De tal manera que muchos polímeros naturales y sintéticos han sido electrohilados para aplicaciones biomédicas tales como el colágeno, quitosano, fibroína de seda, poli (ácido láctico), entre otros.

El avance reciente de la nanotecnología ha dado la oportunidad de desarrollar diversas aplicaciones con nanomateriales. Ellis *et al.,* (2010) explican que al hacer contacto las nanoparticulas en las superficies de otros materiales puede presentarse modificaciones en las propiedades del material, dando como resultado la posibilidad de diversas aplicaciones, como por ejemplo: cambiar su comportamiento hidrófilo o hidrofóbuco, su rendimiento anti-reflectante o su actividad catalítica. Dichas particulas depositadas en superficies pueden establecer puntos de contacto químicos funcionales. Obteniendo como resultado de toda una serie de investigaciones, el interes de la industria farmacéutica hacia materiales nanoactivos que interactúen con sistemas biológicos (Ellis *et al.,*2010).

Ramier *et al.,* (2014) en su trabajo de investigación para *Materials Science and Engineering* enfatiza que la técnica de electrohilado proporciona un enfoque sencillo y versátil para la fabricación de nuevos andamios de biocompuestos nanofibrosos con propiedades estructurales, mecánicas y biológicas aptas para la regeneración de tejido óseo, al igual que la administración de fármacos de rápida disolución. Mediante una cuidadosa selección de los materiales y sus condiciones de preparación, la eficiencia de la encapsulación que uno desea, así como la conservación de la bioactividad de los agentes terapéuticos pueden ser obtenibles (Ramier *et al.,* 2014).

Diversas nanoestructuras elaboras que al momento de ser creadas fueron cargadas con fármacos, pueden ser utilizadas mediante distintos métodos, tales como, implantación, inyección y la administración tópica u oral para una amplia gama del tratamiento de múltiples enfermedades. Seeram *et al., (2013)* destacaron que el aprovechamiento reciente de las distintas investigaciones respecto al desarrollo de las

tecnicas electrohidrodinamicas pueden entregar de manera controlada e individual una gran variedad de medicamentos (Seeram *et al.,* 2013).

2.2.1. Parámetros del electrohilado

Los parámetros de trabajo son muy importantes para entender la naturaleza del electrohilado, así como también la conversión de soluciones de polímeros en nanofibras a través de esta técnica. A continuación, se presentan algunos factores que pueden afectar al electrohilado.

Tabla 3. Parámetros de la solución

Parámetros	**Descripción**	**Referencia**
Concentración	Las concentraciones de solución del polímero utilizado en la técnica electrohilado juegan un papel importante en la formación de la fibra durante el proceso. Para esto en el año 2013 y mas adelante en 2016 se establecen cuatro concentraciones que deben tomarse en cuenta: • Concentración muy baja se obtienen microparticulas poliméricas. En este momento se produce ionización electrospray en lugar de electrohilado, debido a la baja viscosidad y las tensiones superficiales altas de la solución. • Concentración un poco más alta, se obtiene una mezcla de los granos y fibras. • Concentración adecuada, se obtienen nanofibras lisas.	(Li *et al.,* 2013; Villarreal *et al.,* 2016)

	• Concentración muy alta, se pueden observar micro cintas en forma de hélice.	
Peso Molecular	El peso molecular del polímero también tiene un efecto importante en las morfologías de fibras electrohiladas. Los autores también destacan los aspectos a tomar en cuenta respecto al peso molecular. • Concentración fija: reducir el peso molecular del polímero tiende a formar perlas en lugar de una fibra lisa. • Aumento de peso molecular: obtención de fibra lisa. • Aumentado el peso molecular aún más: se pueden obtener micro cintas. • Exceso de aumento de peso molecular: favorece la formación de micro cintas incluso en una baja concentración y existe la posibilidad de que algunas fibras puedan también obtenerse a baja concentración. Es importante señalar que el peso molecular no siempre es esencial para dicha técnica, siempre y cuando existan suficientes interacciones intermoleculares de los oligómeros.	(Li *et al.,* 2013; Villarreal *et al.,* 2016)
Viscosidad	La viscosidad de la solución es la base fundamental para la determinación de la morfología de la fibra.	(Li *et al.,* 2013; Villarreal *et al.,* 2016)

	• Viscosidad baja: no se pueden fibras continuas y lisas. • Viscosidad muy elevada: da como resultado el endurecimiento de expulsión de chorros de la solución. Generalmente, la viscosidad se puede ajustar mediante la adaptación de la concentración del polímero de la solución. De tal manera–, que existe la posibilidad de obtener distintos productos.	
Tensión superficial	La tensión superficial, así como la composición del disolvente de la solución, es un factor importante en el electrohilado. • Con una concentración fija y reduciendo la tensión superficial de la solución, las fibras abultadas pueden ser convertidas en fibras lisas. • La tensión superficial y la viscosidad de la solución pueden ser ajustadas cambiando la relación de la masa de la mezcla de disolventes. • La tensión superficial determina los limites superior e inferior del electrohilado si se establecen las condiciones anteriores.	(Li *et al.,* 2013; Villarreal *et al.,* 2016)
Conductividad /Superficie densidad de carga	La conductividad de la solución se determina principalmente por el tipo de polímero, tipo de disolvente y una sal opcional. Dentro de las	(Li *et al.,* 2013; Villarreal *et al.,* 2016)

	recomendaciones se pueden acentuar las siguientes: • Los polímeros naturales son generalmente polielectrolícos en la naturaleza. Aumentando la carga de la capacidad de expulsion del polímero que lleva y someterlos a una mayor tension en el campo eléctrico, da como resultado una formación de fibras escaza en contraste con su homólogo sintético. • La conductividad eléctrica de la solución puede ser adecuada mediante la adición de sales iónicas tales como KH_2PO_4 y NaCl (se pueden obtener nanofibras con un pequeño diámetro). • Una alta conductividad de la solución se puede lograr con el uso de ácido orgánico como disolvente.	

Tabla 4. Parámetros en el proceso

Parámetro	Descripción	Referencia
Voltaje	Dentro del proceso de electrohilado, el voltaje aplicado es el factor crucial. Dependiendo la aplicación del voltaje se puede obtener una fibra. • Voltaje alto aplicado: mayor es la tensión umbral, chorros cargados pueden ser expulsados del cono de Taylor.	(Li *et al.,* 2013; Villarreal *et al.,* 2016)

	• Voltajes muy altos: pueden facilitar la formación de fibras de gran diámetro. Así como también pueden aumentar la fuerza de repulsión electroestática cargada en el chorro (favorece el estrechamiento del diámetro de la fibra), además de que este tipo de sucesos favorece en la probabilidad de formación de perlas. Entonces finalmente se puede decir que el voltaje influye en el diámetro de la fibra, pero esto puede variar según la concentración de la solución del polímero y de la distancia entre el colector y punta.	
Velocidad de flujo	La velocidad del flujo también es un parámetro importante en el proceso. • Menor velocidad de flujo: es recomendable para que la solución del polímero tenga suficiente tiempo para su polarización. • Mayor velocidad de flujo: se formarán fibras abultadas con un diámetro grueso, debido a que existe un tiempo de secado corto antes de llegar al colector y reducidas fuerzas de estiramiento.	(Li *et al.,* 2013; Villarreal *et al.,* 2016)
Colectores	En la figura 5 se puede observar la variedad de colectores que han sido creados para su uso, con la necesidad de transferir las fibras. Algunos	(Li *et al.,* 2013; Villarreal *et al.,* 2016)

	ejemplos son: colectores de cilindro giratorio, de disco o un electrodo /campo eléctrico auxiliar. Regularmente el papel aluminio es utilizado como un colector pero tiene como desventaja la dificultad de transferir las nanofibras recogidas a otros sustratos para diversas aplicaciones.	
Distancia (H) entre el colector y la punta de la jeringa	Se ha demostrado que la distancia (H) entre el colector y la punta de la jeringa también pueden afectar el diámetro y la morfología de la fibra. • Distancia demasiado corta: la fibra no tiene mucho tiempo de solidificación antes de llegar al colector. • Distancia demasiado larga: se pueden obtener fibras abultadas. Si la distancia entre la punta la placa colectora está aumentando el diámetro de la fibra es descendente, sin embargo, cuando la distancia es excesiva las fibras tienden a romperse debido a su peso.	(Pérez *et al.*, 2019)

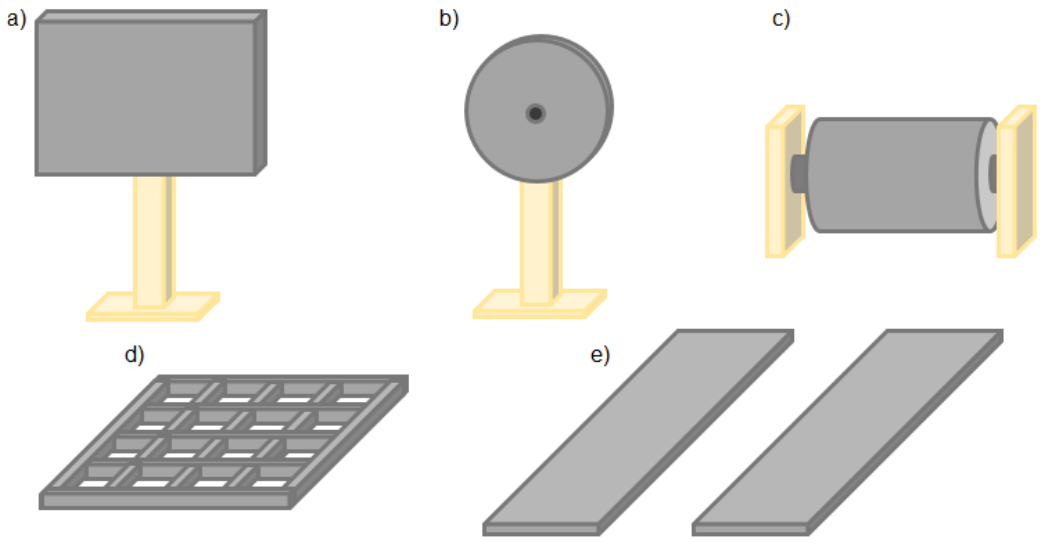

Figura 5. Algunos tipos de colectores utilizados en la técnica de electrohilado: a) Colector de placa; b) Colector de disco; c) Colector rotatorio; d) Colector de rejilla; e) Colector de un electrodo más / Campo eléctrico auxiliar.

Hay parámetros ambientales que también pueden afectar a los diámetros de las fibras y morfologías, tales como la humedad y la temperatura, esto es conocido debido a las diversas experimentaciones realizadas con el paso de los años.

Tabla 5. Parámetros ambientales

Parámetro	Descripción	Referencia
Humedad	• Aumentar la temperatura favorece a las fibras con un diámetro más delgado, por lo que existe una relación inversa entre la viscosidad de la solución y la temperatura. • Una baja temperatura aumenta la viscosidad, lo que provoca un flujo lento y una obstrucción de la aguja.	(Li, *et al.,* 2013; Pérez *et al.,* 2019; Villarreal *et al.,* 2016)

Temperatura	• Baja humedad: puede secar el disolvente totalmente y aumentar la velocidad de la evaporación del disolvente. • Alta humedad: dará lugar al engrosamiento del diámetro de la fibra debido a que las cargas en el chorro pueden ser neutralizadas y las fuerzas de estiramiento se vuelven pequeñas.	

2.2.1.4 Polímeros

Dentro de la técnica de electrohilado se han utilizado distintos materiales, incluyendo polímeros naturales, sintéticos (biodegradables y no degradables) e inclusive una mezcla de ambos, es por ello que existe bastante interés de investigación para la administración de fármacos, ya sea de manera inmediata o controlada. Greiner *et al., (2017)* hablan acerca de ello, y mencionan que la técnica de electrohilado se utiliza para controlar el estado de distribución del fármaco en las fibras y de esta manera mejorar la cinética de liberación del fármaco (Greiner *et al.,* 2007).

Los polímeros biodegradables, son atractivos en la administración de fármacos mediante la técnica de electrohilado, debido a la facilidad con la que se podrían administrar ciertos fármacos. Una variedad de polímeros tanto naturales como sintéticos han sido estudiados durante muchos años para ser utilizados en la fabricación de fibras que cuenten con las propiedades deseadas que requiere la ingeniería de tejidos y aplicaciones de administración de fármacos. Algunos de estos polímeros son: poli (ε-caprolactona) (PCL), poli (vinil alcohol) (PVAL), poli (vinil pirrolidona) (PVP) y co-polímeros tales como el quitosano.

En el presente trabajo hemos utilizado poli (*ε-caprolactona*) (PCL), el cual es un polímero sintético semicristalino biodegradable, es útil en la producción de fibras

electrohiladas que simulan la matriz extracelular. La *ε-caprolactona* se mezcla con polímeros hidrofílicos y materiales naturales que facilitan la adhesión celular, el incremento en las propiedades mecánicas y térmicas de las membranas basados en PCL con la finalidad de modificar sus propiedades superficiales (Sánchez, 2016). En la figura 6 se muestra la estructura tridimensional de *ε-caprolactona,* en donde de color rojo se indica el anillo abierto que la compone*,* de tal forma que por este medio comienza el proceso de polimerización.

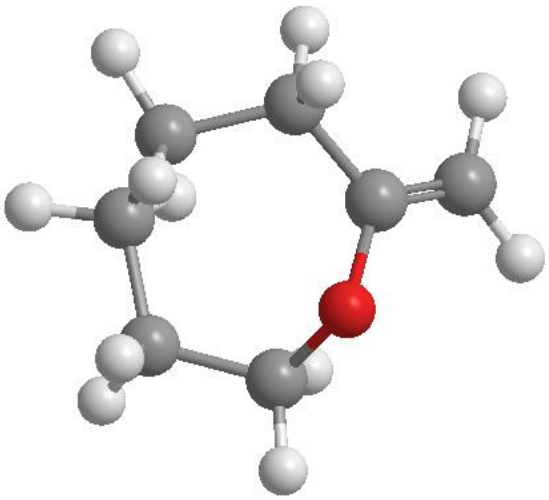

Figura 6. Estructura tridimensional de *ε-caprolactona*

PCL puede prepararse mediante la polimerización de anillo abierto de *ε-caprolactona*, usando un catalizador, proceso que se muestra en la figura 7. Este polímero posee propiedades semejantes a la del polietileno de menor densidad, permeabilidad al CO_2, agua y oxígeno. Entre sus aplicaciones primordiales están adhesivos, suturas, revestimientos superficiales, entre otros (Amaya, 2018).

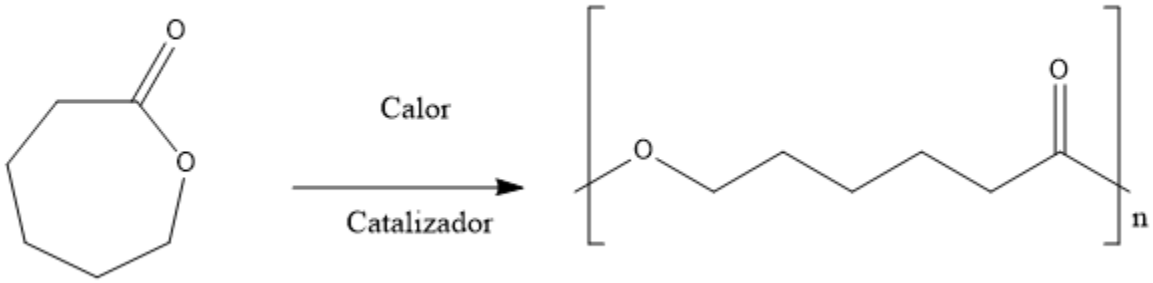

Figura 7. Polimerización de ***ε-caprolactona a*** poli (***ε-caprolactona***)

Mediante la experimentación y estudio de dicho polímero se sabe que puede ser biodegradado por organismos vivos al aire libre (bacterias y hongos) pero no son biodegradables en animales y cuerpos humanos debido a la falta de enzimas adecuadas (Vert, 2009). Esto no quiere decir que no son biorreabsorbibles, sino que el proceso lleva mucho más tiempo, propagándose en primer lugar a través de la degradación hidrolítica (Amaya, 2018).

Este polímero es aceptado por la degradación hidrolítica de los poli (α-hidroxi) ésteres que suelen proceder a través de vías de degradación a granel o en superficie. Lo que determina los medios por los cuales esta vía procede, es el fenómeno de difusión-reacción (Amaya, 2018).

Las fibras electrohiladas de PCL son estudiadas para la ingeniería de tejidos por ser ventajosos, ya que el tamaño del poro se puede controlar fácilmente cambiando la densidad de la fibra en la unidad de área (Dash *et al.,* 2012).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Fabricación de fibras a partir de extractos de alga marina para uso biomédico.

3.2. Objetivos específicos

- Elaborar extractos a partir de las algas *Egregia menziesii (Em) y Colpomenia sinuosa (Cs)*
- Fabricación de fibras de extractos de alga marina a partir de la técnica de electrohilado.
- Estandarizar los parámetros para lograr las nanofibras de los extractos.
- Realizar pruebas específicas que ayuden a comprobar la bioactividad de las respectivas algas para su potencial uso biomédico.

IV. HIPOTESIS

Las fibras electrohiladas de *Egregia menziesii (EM) y Colpomenia sinuosa (CS)* poseen propiedades antimicrobianas en contra de las bacterias *Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Pseudomona aeruginosa.*

V. METODOLOGÍA

5.1. Muestras

Las algas *Colpomenia sinuosa y Egregia menziesii* (figura 8A y 8B respectivamente) se obtuvieron de las costas del puerto de Ensenada. Posteriormente se guardaron a 4 ℃ por un tiempo de dos semanas para su utilización.

Después de las dos semanas se lavaron con agua corriente cada una de las algas marinas recolectadas, con el fin de clasificarlas y dar nombre, se dejaron en un recipiente con agua corriente.

Se lavó nuevamente cada una de las algas por separado para evitar su descomposición, se cortó en trozos pequeños y se lavó (figura 8C) para facilitar la trituración de las algas.

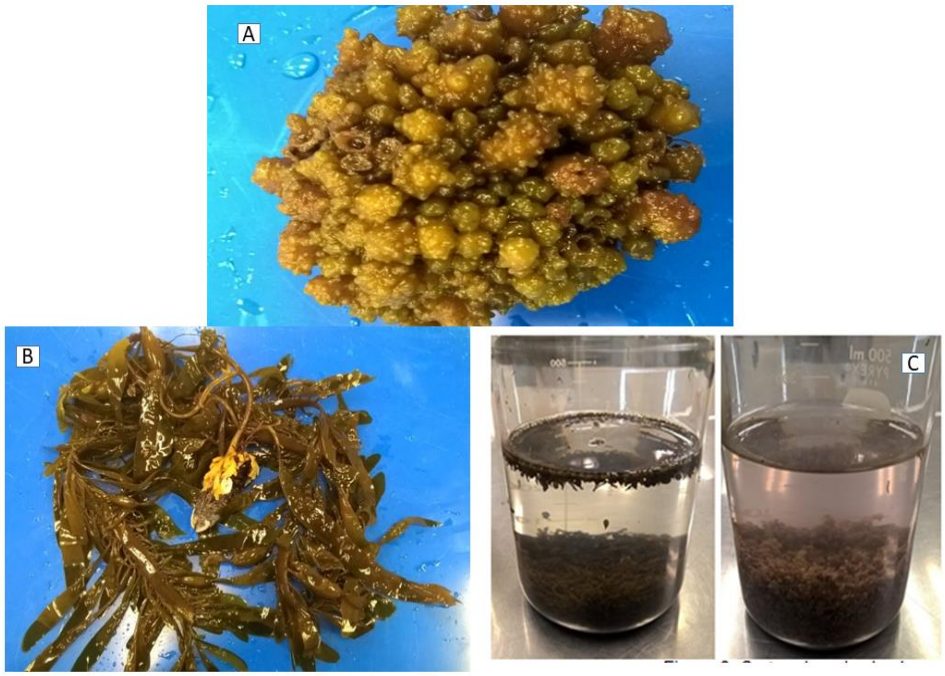

Figura 8. A) *Colpomenia sinuosa (Cs)* B) *Egregia menziesii (Em)* C) corte y lavado de algas.

5.2. Preparación de extractos

Se equilibraron los pesos de las algas pesando individualmente la cantidad de 10.677 g de cada distinto tipo de alga. Se agregó en un vaso de precipitado y se le añadió la cantidad de 100 ml de alcohol etílico 95 %.

Se dejó reposar alrededor de 15 min. Se procedió a triturar con ayuda de un triturador de tejidos. Se dejaron en agitación por dos días cada tipo de alga marina (sin aplicar calor).

Dada la agitación de cada uno de los diferentes tipos de algas estos se procedieron a filtrar con ayuda de un embudo de vidrio, vaso de precipitado y papel Whatman, para después realizar la rotaevaporación. Se llevó acabo la rotaevaporación de cada una de las algas que previamente han sido filtradas, a una temperatura de 39.5 ℃ y una rotación de 100 RPM (Figura 9).

Posteriormente se pesaron las algas después del proceso de rotaevaporación (tabla 6), seguidamente fueron colocadas en la campana de extracción de gases, para eliminar el resto de alcohol etílico agregado y finalmente se volvieron a pesar (tabla 7).

Figura 9. Proceso de rotaevaporación.

Tabla 6. Peso obtenido después de la rotaevaporación.

Tipo de alga marina	Peso en [mg]
Colpomenia sinuosa	4638
Egregia menziesii	3083

Tabla 7. Peso obtenido después de permanecer en la cámara de extracción de gases.

Tipo de alga marina	Peso en [mg]
Colpomenia sinuosa	58
Egregia menziesii	47.5

5.3. Preparación de la muestra

Los extractos de alga se resuspendieron en una solución de THF y metanol en una proporción 3:1, se usó esa solución debido a que es el disolvente para el polímero.

A cada extracto se le añadió diferente cantidad de solución debido a que se tenían diferentes cantidades de cada uno, y así se igualó a un porcentaje de 4.6 % (p/v) en cada muestra (Tabla 8).

Tabla 8. Cantidad de solución en cada extracto.

Tipo de alga marina	Peso en [ml] solución THF y metanol.
Colpomenia sinuosa (Cs)	1.26
Egregia menziesii (Em)	1.04

La solución polimérica se elaboró mezclando metanol y THF, y se le añadió un 10 % de PCL. Se mezcló con ayuda de una placa de agitación a 600 rpm y 50 ℃.

Después se hicieron muestra de la suspensión de extracto con la solución polimérica, se hicieron en diferentes proporciones para observar cual era la cantidad máxima de extracto que se le podía añadir sin cambiar tanto la estructura de la fibra (Tabla 9).

Tabla 9. Cantidad de solución en cada extracto.

Tipo de alga marina y muestra de cada una	µl (%) de extracto	µl (%) de solución polimérica
CS100	4.60	90
CS200	9.20	80
CS300	13.8	70
EM100	4.57	90
EM200	9.13	80
EM300	13.7	70

5.4. Electrohilado

Primero se tomaron dos ml de la muestra con una jeringa con la punta plana, se recubrió el colector con papel aluminio y se colocó la muestra en su lugar, con un flujo de 3 ml/h y una distancia de 18 cm entre la punta de la ajuga de la jeringa y el colector (figura 10A). Se colocaron los caimanes en el colector y en la punta de la jeringa, se encendió la bomba de expulsión, hasta que salió la primera gota después de eso se aplicó una fuente de energía de 20 kV para todas las muestras, de tal manera que el resultado final se pudo observar dentro de una hora aproximadamente (figura 10B).

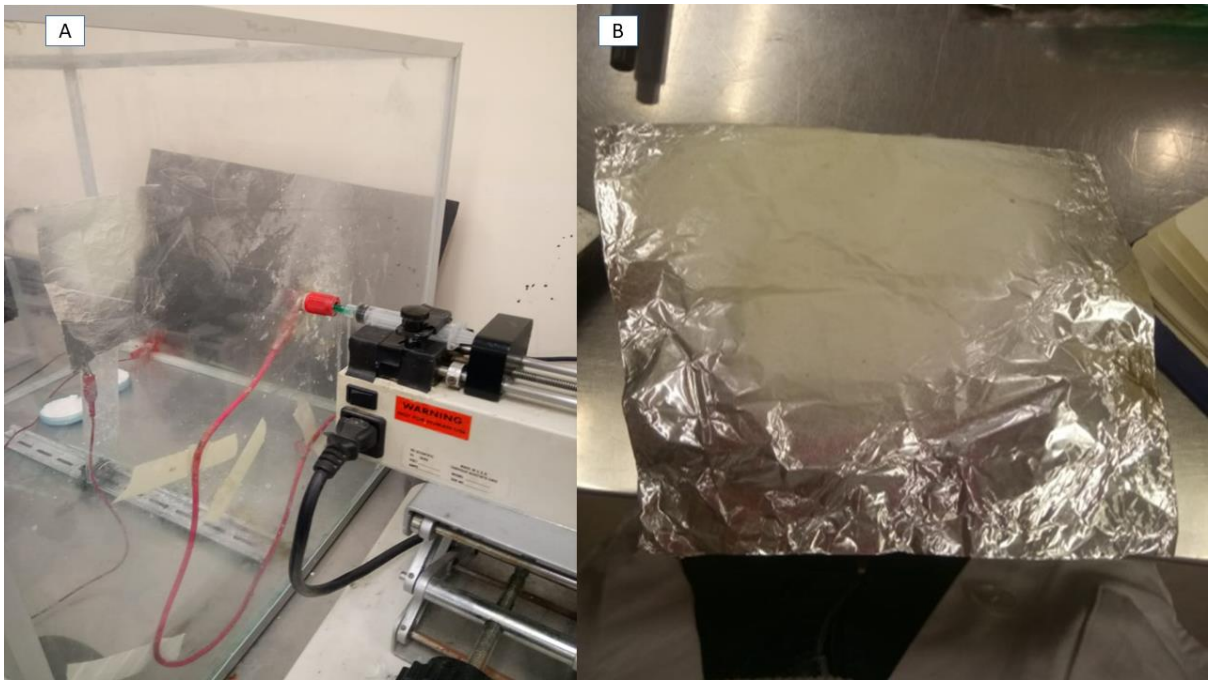

Figura 10. A) proceso de electrohilado. B) nanofibras de extractos.

5.5. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se utilizó para medir la variación del contenido de masa al incrementar la temperatura, esto nos permite identificar la estabilidad térmica y la temperatura de degradación de todas las muestras. El experimento se llevó a cabo

utilizando un rango de calentamiento de 10 °C/min desde temperatura ambiente (± 20 °C) a 500 °C en un matraz de platino sin sellar usando nitrógeno con un flujo de 20 ml/min. El equipo utilizado fue un modelo Shimadzu TGA-Q500. La masa de las muestras analizadas varió entre 5 y 10 mg. Esta técnica nos permitió determinar la temperatura a la que comienza la degradación térmica (T_{onset}) y el cambio de masa por aumento de temperatura. Se realizaron curvas termogravimetricas (DRTG) para identificar la temperatura de degradación máxima ($T_{deg\ max}$).

5.6. Análisis de calorimetría diferencial de barrido

En el caso de la calorimetría diferencial de barrido (DSC), las muestras se caracterizaron utilizando un equipo DSC Shimadzu modelo DSC-Q100 y se programó para calentar desde la temperatura ambiente (± 20 °C) hasta 200 °C durante un período de 10 °C/min. Posteriormente se utilizó un recipiente sin sellar con muestra de aluminio para el gas portador con un flujo de 20 ml/min. La masa de las muestras analizadas varió entre 5 y 10 mg. Después de la ejecución, el horno se enfrió con nitrógeno líquido para alcanzar una temperatura de -20 °C o -30 °C.

5.7. Análisis antimicrobiano

Las muestras se cortaron con un cortador especial a un diámetro de 0.5 cm, se esterilizaron en ambos lados con radiación con luz ultravioleta durante 15 minutos y se colocaron en el fondo de placas de 96 pocillos. Para los ensayos se utilizaron las cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, se cultivaron en un medio Mueller-Hinton estéril previamente durante 24 a 35 °C. Después de eso, las cepas bacterianas se estandarizó la absorbancia bacteriana a 0.5 McFarland en comparación con un tubo estándar (0.132 abs a 620 nm, $1.5x10^8$ CFU/mL) con solución salina. Una vez que los cultivos celulares estuvieron listos, se agregaron 150 µL de medio limpio a cada pocillo en el que se colocaron las fibras. Luego, se agregaron 50 µL de cada inóculo (*E. coli, S. aureus, P. aeruginosa* y medio limpio). Como

control negativo, se colocaron 150 µL de medio limpio y 50 µL de cada cepa, sin fibras. Todas las células bacterianas expuestas con fibra se incubaron durante 24 h, 35 °C. Como las fibras no se disuelven, con la ayuda de fórceps estériles, se extrajeron muestras y se colocaron en un nuevo pozo, se lavaron con 200 µL de medio limpio, se descartaron las fibras y se midió la solución en un lector de microplacas (Thermo Scientific) a 620 nm.

5.7.1. Preparación de medio de cultivo

La preparación de medio de cultivo consistió en el peso 2.3 g de agar nutritivo (dicha cantidad asignada para preparar una solución de 100 ml), se colocaron 100 ml de agua destilada en un matraz después en una plancha a temperatura de 85-100 ^{o}C, se colocó el matraz y poco a poco se fue colocando agar nutritivo en él. Un agitador magnético ayudo a que se mezclara perfectamente toda la sustancia. Dicha mezcla tenía que llegar a su punto de ebullición, para que quedara lista. Mientras la mezcla aún no estaba lista, se fue desinfectando y limpiando la campana de extracción. Al momento de estar lista la muestra, en la campana de extracción se colocó dentro de matraces de esterilización el agar nutritivo obtenido. Estos matraces mencionados, fueron colocados en la autoclave durante una hora. Después de retirarlos de la autoclave, durante un tiempo determinado se dejó enfriar la sustancia. Dentro de la campana de extracción, se colocaron cuatro cajas Petri, en las cuales se colocó 25 ml de agar nutritivo (figura 11). Durante 15 min dicho medio de cultivo quedo expuesto a luz ultravioleta. Los medios de cultivo obtenidos fueron guardados en el refrigerador para después utilizarlos en la preparación de cepas bacterianas.

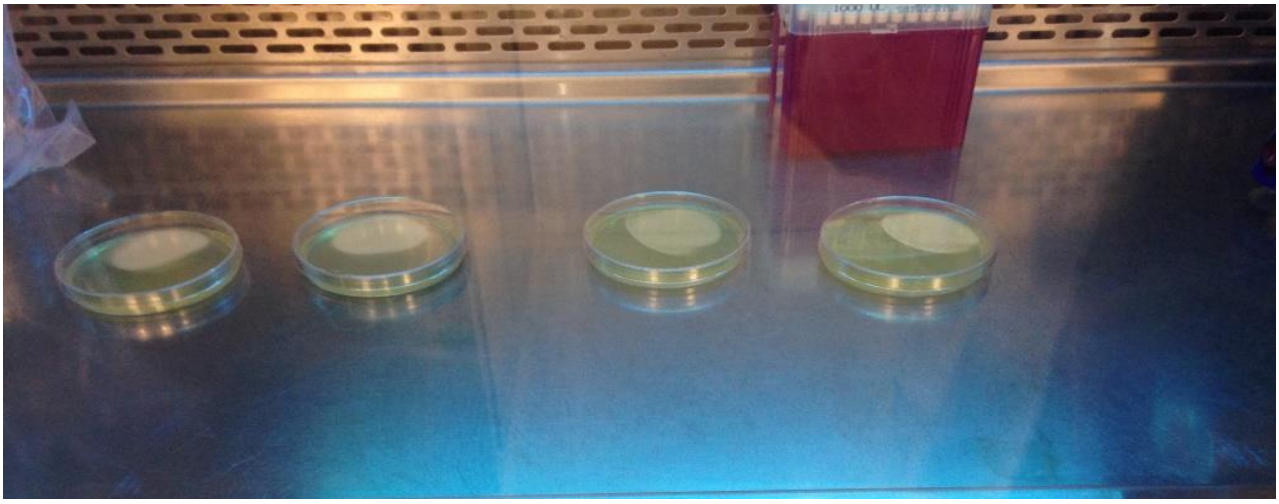

Figura 11. Medios de cultivo expuestos a luz ultravioleta.

5.7.2. Preparación de cepas bacterianas

Para llevar a cabo la preparación de las cepas bacterianas se colocaron las cuatro cajas Petri de medio de cultivo dentro de la campana de seguridad biológica tipo 2 junto con los instrumentos necesarios para preparar las cepas bacterianas. Con una micropipeta se obtuvo una muestra de la bacteria *Escherichia Coli*, *Estafilococos* y *Pseudonoma*. Dichas muestras fueron colocadas en el medio de cultivo. En un microincinerador se colocaron las asas correspondientes para poder sembrar dichas bacterias. Se sembraron cada una de ellas y al terminar, a las cajas Petri se les coloco parafilm para cubrirlas. Dentro de la incubadora se colocaron las 4 cajas Petri a una temperatura de 37 ^{o}C y durante algunos días se observaron los resultados de las respectivas cepas bacterianas.

5.7.3. Colocación de nanofibras en placas

Básicamente la colocación de las fibras en placas consistió en la obtención de fibras de algas (*Colpomenia sinuosa* y *Egregia menziessi*) las cuales fueron cortadas en forma de circulo (figura 12 A). Dichas nanofibras fueron colocadas en cajas Petri 100% esterilizadas. Al finalizar el corte de ellas, las cajas Petri fueron colocadas en la campana de seguridad biológica tipo 2, sometidas a luz ultravioleta para poder ser esterilizadas

completamente (figura 12B). Cabe destacar cada nanofibra fue volteada para que de ambos lados recibieran la luz. Después de tener todo listo, las nanofibras fueron colocadas en placas de 96 pocillos para su lectura. En cada placa fueron colocadas 3 muestras de todas las algas utilizadas (*Colpomenia sinuosa* y *Egregia menziessi*).

Figura 12. A) Corte y colocación de nanofibras en cajas Petri, B) Exposición de nanofibras a luz ultra violeta

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Electrohilado

Se lograron electrohilar los extractos de algas y los parámetros óptimos fueron un caudal de flujo de solución constante de 2.5 ml/h, una distancia de separación del colector a la punta de la jeringa de 18 cm, una humedad relativa de 24% y la temperatura en un rango de 20 a 24 ^{o}C. Se optó por usar PCL al 13% por que el de 10% quedaba demasiado líquido y resulto más difícil su electrohilado.

Diferentes parámetros del electrohilado fueron evaluados para determinar cuales son los óptimos para la formación de las fibras. Al final, las formación de las fibras fue

exitosa utilizando una potencia fija de 20 kV y una aguja 22G x 40 mm. Dichas condiciones fueron probadas en nuestro equipo de electrohilado previamente reportado en trabajos anteriores. (Velasco *et al.,* 2016)

Al igual que la hoja de seguridad del THF, se comprobó que el THF es muy volátil, a 21°c el porcentaje de volatilidad es 100%. Es por ello que se tuvo que colocar un flujo de 2.5 ml/h porque a un flujo menor la gota se secaba muy rápido y creaba un tapón que no dejaba continuar con el electrohilado.

De la misma manera que en la investigación de Siavash *en 2014* pudo disolver el PCL en THF y metanol con una solubilidad de 3:1 (Scott *et al.,* 2015).

La poli (caprolactona), es un polímero sintético de los más utilizados en las aplicaciones médicas gracias a su biocompatibilidad y lenta biodegradación. Combinando inherentes propiedades de la matriz de PCL con las características de las nanofibras resulta un material prometedor que puede ser adecuado para diferentes aplicaciones, incluyendo las aplicaciones biomédicas y celdas solares orgánicas (Mochane *et al.,* 2019).

Por otro lado, entre las ventajas de las estructuras nanofibrosas las cual las hacen interesantes para las celdas solares se incluyen: amplia área superficial, diámetro promedio de poro pequeño y alta porosidad (Villarreal *et al.,* 2016).

Con el objetivo de determinar el solvente óptimo que se va a utilizar la el electrohilado del PCL, se revisaron en la literatura diferentes solventes utilizados para la disolución del polímero, es necesario resaltar, que el objetivo principal es lograr una formación homogénea de las fibras sin la formación de bulbos, que disminuya la reproducibilidad de un futuro producto terminado.

Se ha reportado, que la morfología de las fibras electrohiladas de PCL depende del tipo de solvente utilizado, los parámetros del electrohilado, la concentración del solvente, la concentración del polímero y las diferentes proporciones de solventes utilizados para dicha disolución (Mochane *et al*., 2019).

Por mucho tiempo, el cloroformo ha sido el solvente más utilizado para el electrohilado de PCL, gracias a su solubilidad y la obtención de fibras con ausencia de bulbos (Enis *et al.,* 2016). En dicho estudio, compararon el efecto de diferentes solventes como el cloroformo, ácido fórmico y ácido acético y solventes binarios como ácido fórmico/etanol, ácido fórmico/metanol, ácido fórmico/cloroformo, ácido acético/cloroformo, ácido acético/etanol, ácido acético/metanol y ácido ácido fórmico/ácido acético. Entre todos los solventes y combinaciones evaluadas descubrieron que el uso del ácido acético conducia a la formación de bulbos solamente, el ácido formico promovia la formación de fibras con bulbos y por el contrario, el cloroformo permitia la formación de fibras homogéneas sin bulbos (Enis *et al*., 2016).

Con respecto a las mezclas estudiadas por el grupo de Enis (2016), el ácido fórmico/cloroformo mostró la efectividad para producir fibras pequeñas de aproximadamente 500 nm, sin embargo, estas fibras presentaron bulbos. El solvente binario óptimo encontrado fue ácido fórmico/ácido acético el cual ayudo a fabricar fibras a escalas nanométricas, sin embargo, se presentaron bulbos.

Gracias a estos reportes en nuestro estudio se determinó utilizar cloroformo como solvente utilizando una concentración de 10%, ya que en otros estudios de nuestro equipo de trabajo, esta concentración fue la adecuada para la formación de las fibras poliméricas (Alvarez *et al.,* 2020).

6.2. Fluorescencia de las nanofibras

Dentro de nuestros resultados se pudo obtener que nuestras fibras con extractos de algas poseen fluorescencia, dicho procedimiento se llevó a cabo con un microscopio de fluorescencia marca life technologies modelo EVOS FLc. Se utilizó como filtro de fluorescencia GFP (Proteína Verde Fluorescente), la cual es una proteína que actualmente es utilizada en biología molecular como marcador. En las figuras 13A y 13C se muestran las algas CS y EM respectivamente sin la aplicación del GFP y en las figuras 13B y 13D la aplicación de este, de tal manera que nuestras fibras poseen esta

característica particular, cuya aplicación puede ser estudiada en una investigación a futuro.

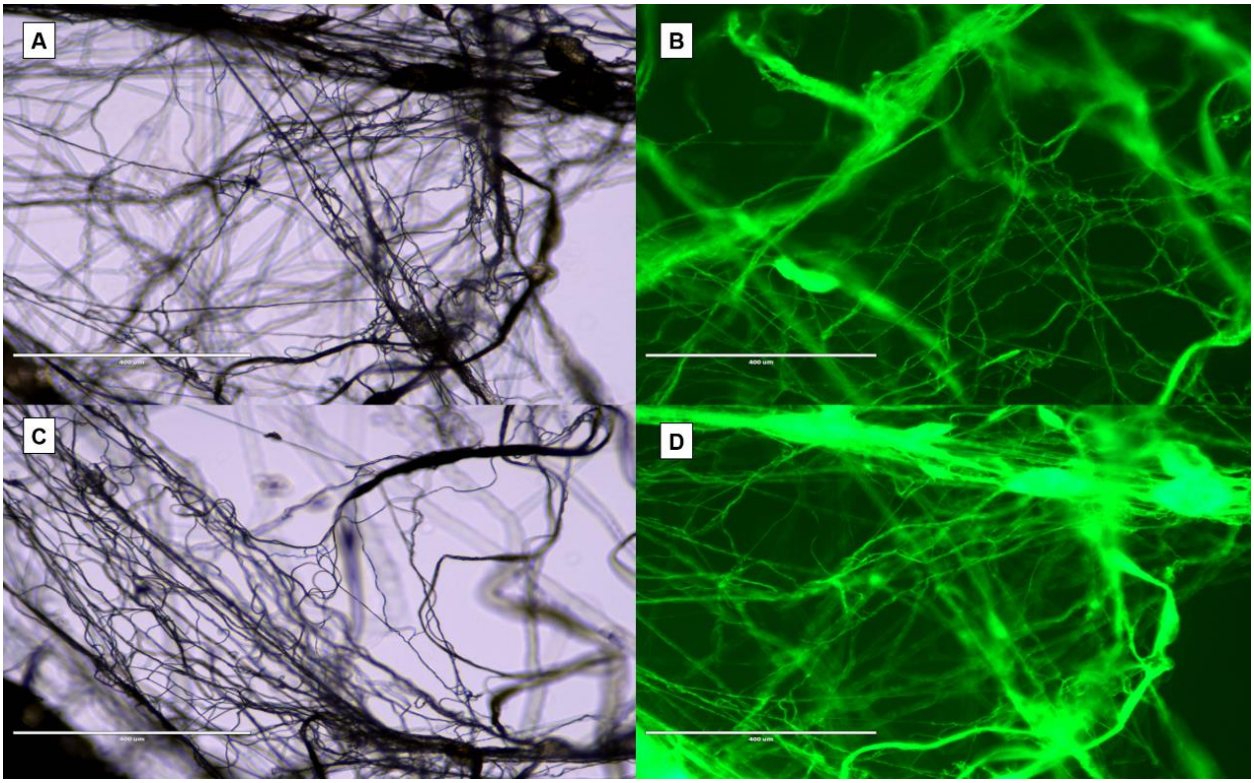

Figura 13. Nanofibras observadas bajo el microscopio de fluorescencia EVOS. A) Fibras de PCL/CS; B) Fibras de PCL/CS (filtro de fluorescencia GFP); C) Fibras de PCL/EM; D) Fibras de PCL/EM (filtro de fluorescencia GFP)

En los sistemas acuáticos la luz puede penetrar y es filtrada en los primeros 10cm, virtualmente todo el infrarrojo es filtrado y transformado en calor, dependiendo de las características de la columna de agua. En el primer metro de agua de mar el 60% de la radiación es absorbida y a los 10m el 80%. Por lo general la luz penetra a mayor profundidad en aguas oceánicas que en aguas costeras, principalmente por la baja concentración de material orgánico disuelto coloreado (MODc) (Franklin *et al.,*1997).

Al penetrar la luz en el océano cambia su cantidad y también calidad. El agua absorbe la radiación roja e infrarroja en los primeros metros, por lo que muchas algas

deben estar adaptadas a capturar esa luz, como complemento de la luz capturada con menores longitudes de onda. En las algas hay tres clases de pigmentos encargados de capturar la luz para la fotosíntesis: clorofilas, ficobiliproteinas y carotenoides (Al, 2006).

En macroalgas y como ha sido desarrollado en plantas terrestres, investigaciones destinadas a evaluar respuestas fisiológicas y eco fisiológicas, principalmente ante factores ambientales estresantes como altos niveles de RFA/UV son frecuentemente realizadas combinando cambios en la evolución del O_2 y en pulsos de amplitud modulada (PAM) de los parámetros de fluorescencia de la clorofila (Franklin *et al.,*1997). Desde mediciones de la fluorescencia de la clorofila, que ocurre principalmente en el Fotosistema II (FSII) de la cadena transportadora de electrones, es posible obtener una medida indirecta de la capacidad fotosintética (Al, 2006).

El principio del análisis de fluorescencia de la clorofila radica en que la energía absorbida por las moléculas de clorofila puede tener uno de tres distintos: puede ser usada para direccionar la fotosíntesis (proceso fotoquímico), el exceso de energía puede ser disipado como calor (proceso no fotoquímico) o este puede ser remitido como luz fluorescente de la clorofila. Estos tres procesos ocurren bajo competencia, por lo que cualquier mejora en la eficiencia de uno de ellos resulta en la disminución del rendimiento de los otros dos procesos. De esta forma midiendo el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila es posible obtener información sobre cambios en la eficiencia de las reacciones fotoquímicas y de la disipación de calor (Al, 2006).

El espectro de la fluorescencia es diferente al de la luz absorbida, con un máximo de emisión de fluorescencia en longitudes de onda largas (mayor a 670 nm). Por lo tanto, el rendimiento de fluorescencia puede ser cuantificado exponiendo el tejido fotosintético a una definida longitud de onda y midiendo la cantidad de luz re-emitida a longitudes de onda larga (Al, 2006).

La fluorescencia de la clorofila entrega información del estado del FSII, principalmente permitiendo entender cómo se está usando la energía absorbida por la clorofila y que tan extenso puede llegar a ser el daño producido en el aparato fotosintético cuando ocurre una perturbación por exceso de la luz. Además, permite examinar la

habilidad de las plantas a tolerar el estrés ambiental, así como la aclimatación a diferentes microambientes y factores ambientales (Al, 2006).

Estimaciones de producción primaria en algas, con uno u otro método, son de importancia en estudios biológicos acuáticos, como por ejemplo para estimaciones de productividad en praderas de macroalgas de importancia económica pudiendo estimar los efectos de la explotación pesquera, para evaluar el efecto de factores ambientales en poblaciones algales de gran importancia ecológica, para evaluar impacto ambiental de actividades contaminantes, para realizar interpretaciones de balance energético en ecosistemas locales, entre otros (Al, 2006).

6.3 Análisis termogravimétrico

Tabla 10. Análisis Termogravimétrico

Muestra	**Perdida (% masa)**	**Temperatura (℃)**
PCLc	15.86	347.85
	50	400.95
	100	430.73
CS100	5	52.04
	50	398.60
	100	431.97
CS200	5	165.60
	50	395.90
	100	422.78
CS300	5	53.18
	50	393.99
	100	416.32

EM100	5	59.08
	50	396.56
	100	424.61
EM200	14.62	90.46
	50	396.08
	100	424.71
EM300	5	96.64
	50	392.54
	100	429.04

En la tabla 10 se puede observar las temperaturas necesarias para degradar a las diferentes fibras de PCL, PCL/CS y PCL/EM. Se puede observar que las fibras PCL/CS100, PCL/CS300 y PCL/EM100, requieren muy poca temperatura (<100 ℃) para degradar un 5% de masa de cada material (~52.04 ℃, 53.18℃ y 59.08℃, respectivamente). Por otro lado, las muestras que requieren ~100 ℃ para perder 5% de su masa son las fibras de PCL/EM200 y PCL/EM300 (~90.46 ℃ y 96.64 ℃, respectivamente). Las fibras PCL/CS200 requieren hasta 165.60℃ para perder 5% de su masa, y finalmente, las fibras de PCL control necesitan una temperatura de 347.85℃ para perder un 15.86 %. En resumen, se puede observar que las fibras de PCL que contiene algas marinas (PCL/EM y PCL/CS) necesitan menor temperatura que las fibras de PCL para eliminar del 5 al 10% de la masa de las muestras. Esta pérdida de masa corresponde a la pérdida del solvente, se puede apreciar que a mayor proporción del complejo menor es la temperatura necesaria para iniciar con lo que se llama la temperatura de descomposición inicial (TDI). Esta reportado que la temperatura de descomposición inicial (TDI) del PCL es 378.3 ºC (Castilla *et al.,* 2019), la cual es similar a nuestro trabajo. En la figura 14 este suceso puede observarse detalladamente.

Con respecto a la pérdida del 50% de la masa las fibras que requieren mayor temperatura son las fibras de PCL control (~400.95ºC). Por otro lado, se puede observar

que conforme se va incorporando mayor proporción de los extractos CS y EM, se requiere menor temperatura para degradar el 50% de la masa de la muestra. Sin embargo, estas diferencias no son significativas entre las muestras.

Así mismo, las fibras de PCL perdieron su mayor parte de la masa a los 430.73 ºC, dicha temperatura corresponde a la temperatura máxima (T_{max}). La T_{max} reportada para PCL es de 412.2 ºC (Castilla *et al.,* 2019), la cual es cercana a lo obtenido en este estudio. Al añadir el extracto CS se puede observar que para degradar el 100% de masa es necesaria aplicar mayor temperatura, así mismo, entre mayor es la proporción del extracto CS menor temperatura es necesaria para degradar completamente las fibras. Por el contrario, entre mayor proporción del extracto EM mayor temperatura se necesita para degradar por completo a las muestras.

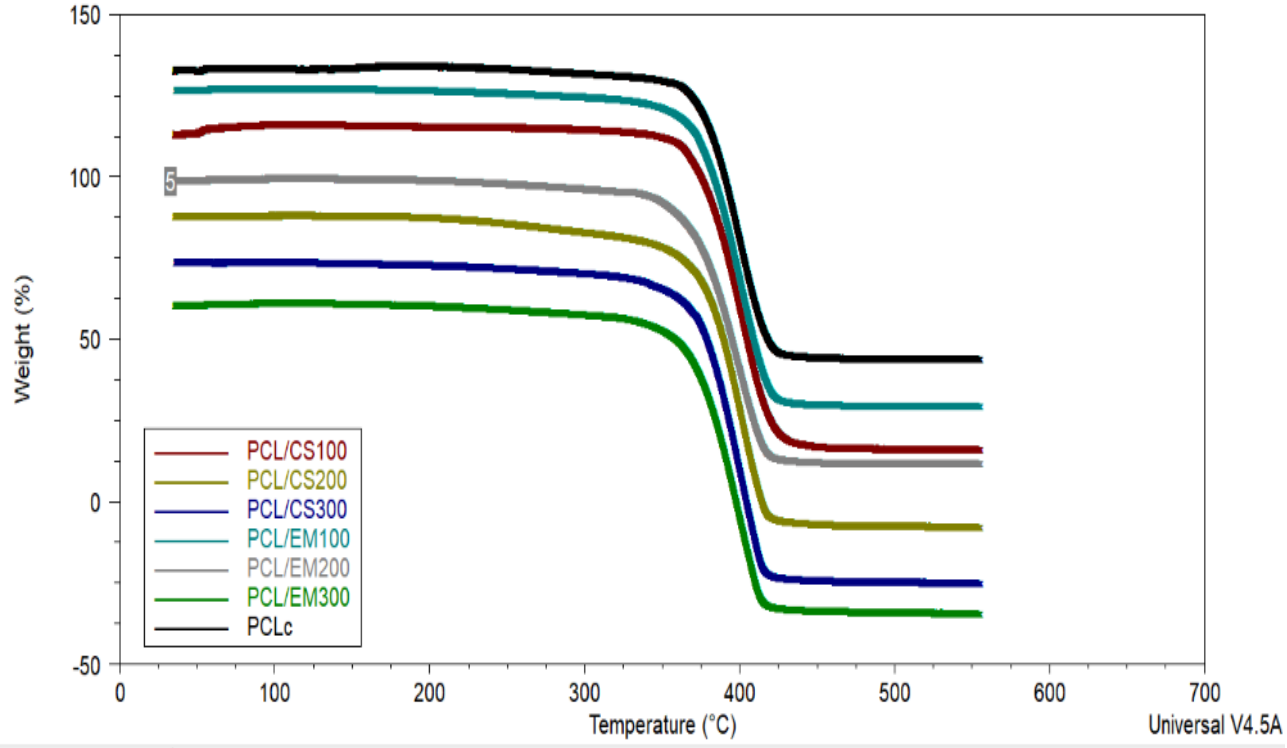

Figura 14. Termograma TGA de las fibras PCL, PCLCS y PCL/EM.

6.4 Análisis de calorimetría diferencial de barrido

En la figura 15, se observan los termogramas DSC de las fibras de PCL, PCL/CS y PCL/EM, donde se puede apreciar que todas las muestras tienen presente un cambio de flujo de temperatura entre los ~57 a 61 ºC, esta temperatura corresponde a la temperatura de fusión (Tf), reportada en la literatura (Abedalwafa *et al.,* 2013), aunque hay algunas variaciones en temperatura entre las muestras, no es una diferencia significativa.

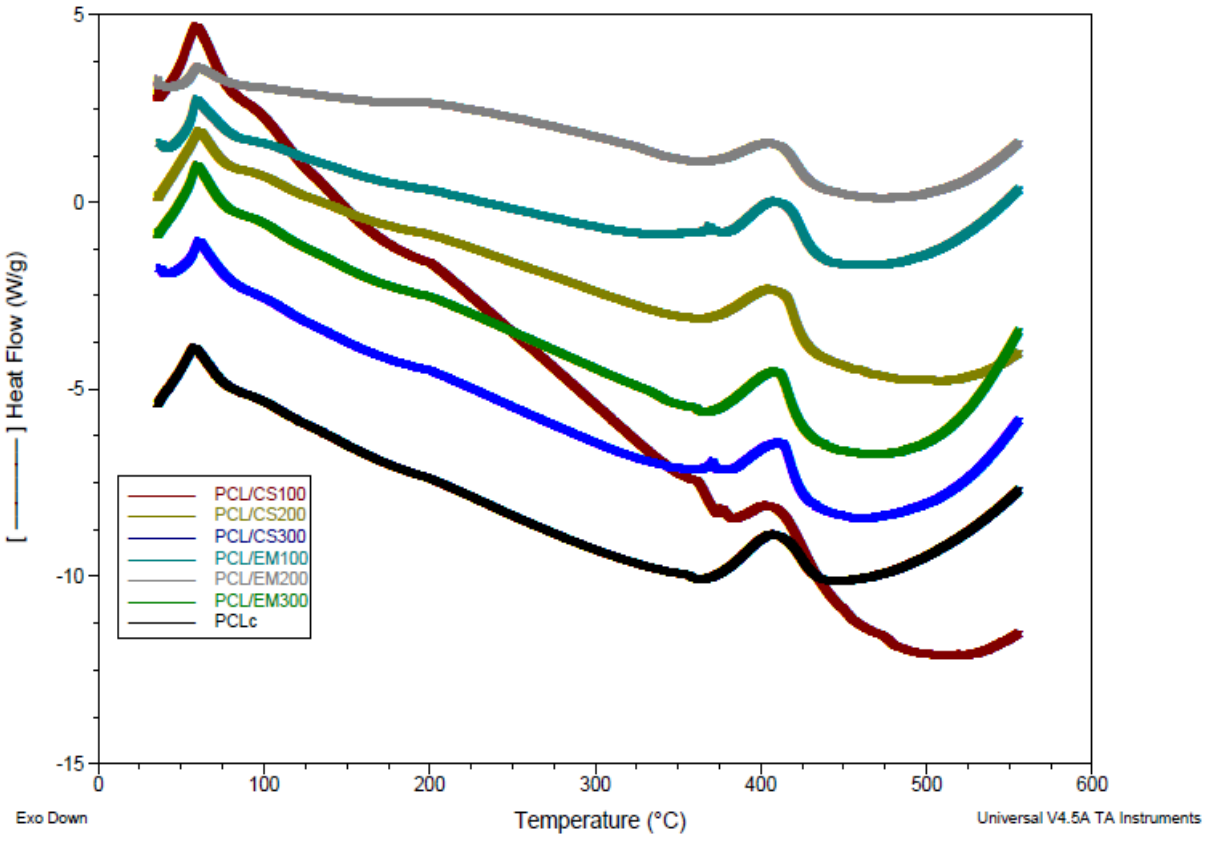

Figura 15. Termograma DSC de las fibras PCL, PCLCS y PCL/EM.

Posteriormente, se puede apreciar que la temperatura de descomposición o degradación (Td) de las fibras de PCL, PCL/CS y PCL/EM se encuentran entre los ~361-384 ºC (tabla 11). Estas temperaturas corresponden con la temperatura de degradación (Td) de los termogramas TGA de las mismas muestras. La temperatura de degradación reportada para el PCL es de ~ 380 ºC. (Patrício et al., 2013). Por último las temperaturas máximas (T_{max}) se encuentran entre ~410 ºC (tabla 11). Estadisticamente, no puede apreciarse una diferencia significativa entre las muestras.

Tabla 11. Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido

Muestra	**Tf (℃)**	**Td (℃)**	**Tmax (℃)**
PCLc	57.49	365.47	410.45
CS100	58.70	373.95	410.90
CS200	60.60	361.49	414.15
CS300	60.46	379.39	412.58
EM100	59.07	368.37	413.54
EM200	60.31	383.98	411.22
EM300	59.18	364.92	410.38

La poli (caprolactona) es un polímero semicristalino con una estructura regular, cuya temperatura de fusión reportada se encuentra entre los 59 a 64 ºC, y su temperatura de transición vítrea se encuentra a los -60 ºC, ya que posee un cuerpo con estructura semi cristalina, lo que le da alta dureza, debido a sus dominios amorfos cuando están en el estado elástico. (Abedalwafa *et al.,* 2013).

6.5. Actividad antimicrobiana

La prueba realizada tuvo como finalidad analizar si las algas *Colpomenia sinuosa y Egregia menziesii* poseen resistencia antimicrobiana, de tal manera que las nanofibras creadas con este tipo de algas puedan ser consideradas en algún método biomédico.

De manera general las fibras provocan una reacción diferente en cada célula bacteriana. *Staphylococcus aureus* es Gram positiva, *Pseudonoma aeruginosa y Escherichia coli* Gram negativas (el tipo de Gram representan las proteínas que tienen en la superficie de sus células) entonces van a reaccionar diferente, es por eso es que tenemos tres gráficas.

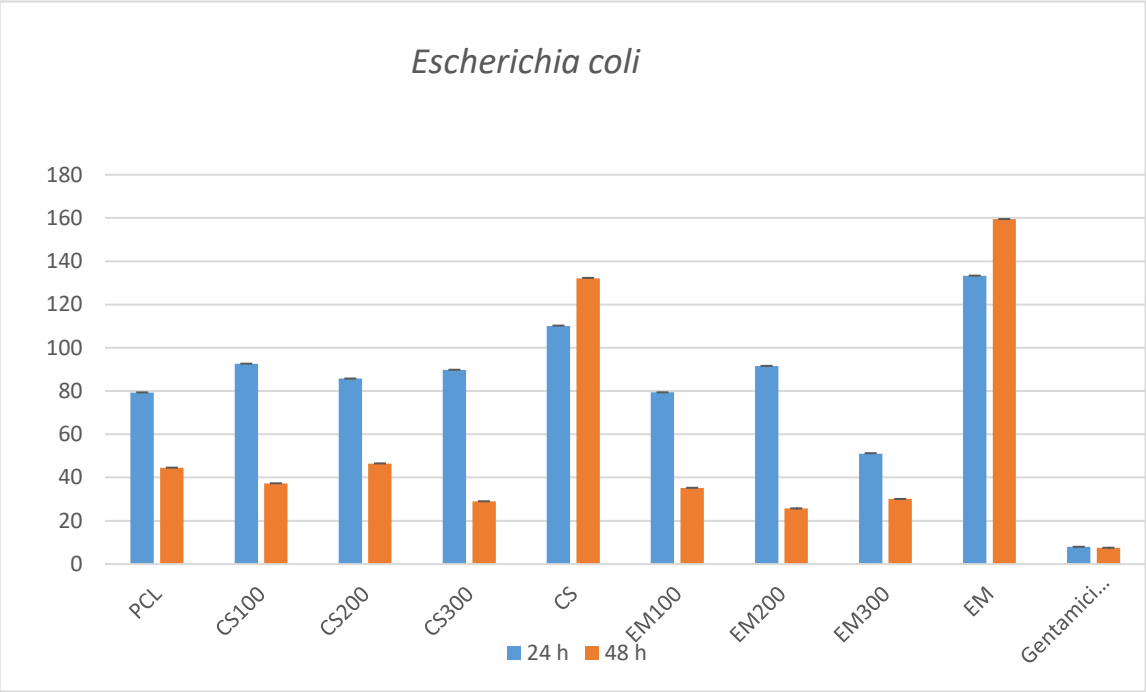

Figura 16. Ensayo de proliferación de bacteria *Escherichia coli*

En la figura 16 las fibras de PCL solo provocan el 20 % de crecimiento de las células y en EM300, pero en todas las demás la proliferación no se ve afectada. En este análisis no se observa una muerte drástica de las células a comparación de como lo hace

el antibiótico, pero tampoco están creciendo más del 100 %. Estas fibras no se descartan como biocompatibles.

Cuando pasan las 48 horas, los porcentajes de proliferación bajaron ya que las fibras se degradaron (a excepción del alga sola), lo que provoca que las bacterias no tengan un sostén para poder crecer.

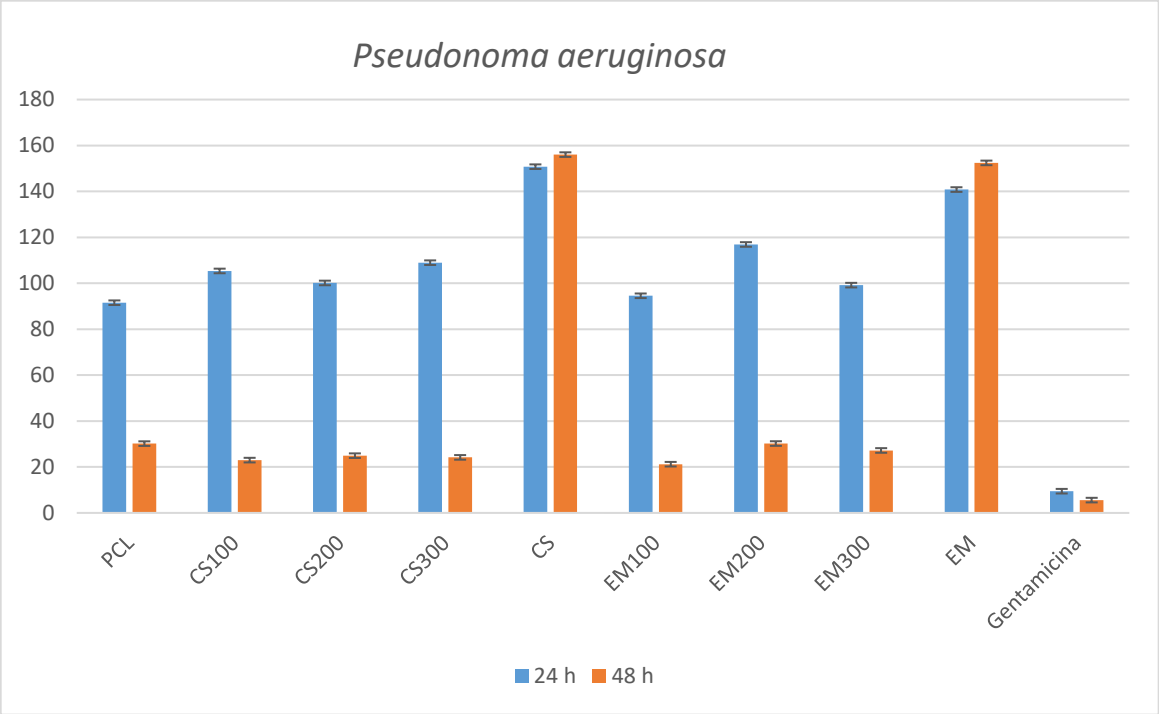

Figura 17. Ensayo de proliferación de *Pseudomona aeruginosa*

En la figura 17 se observa el mismo fenómeno que en *Escherichia coli*, en las 24 horas la bacteria crece y se pueden observar más integras, pero a las 48 horas se fueron fragmentando. Las fibras CS100, CS300 y EM200 crecen más del 50%, estas se podrían utilizar para el crecimiento de dicha bacteria y el resto de las fibras no crecen más del 100%, por lo que tampoco son descartadas como biocompatibles.

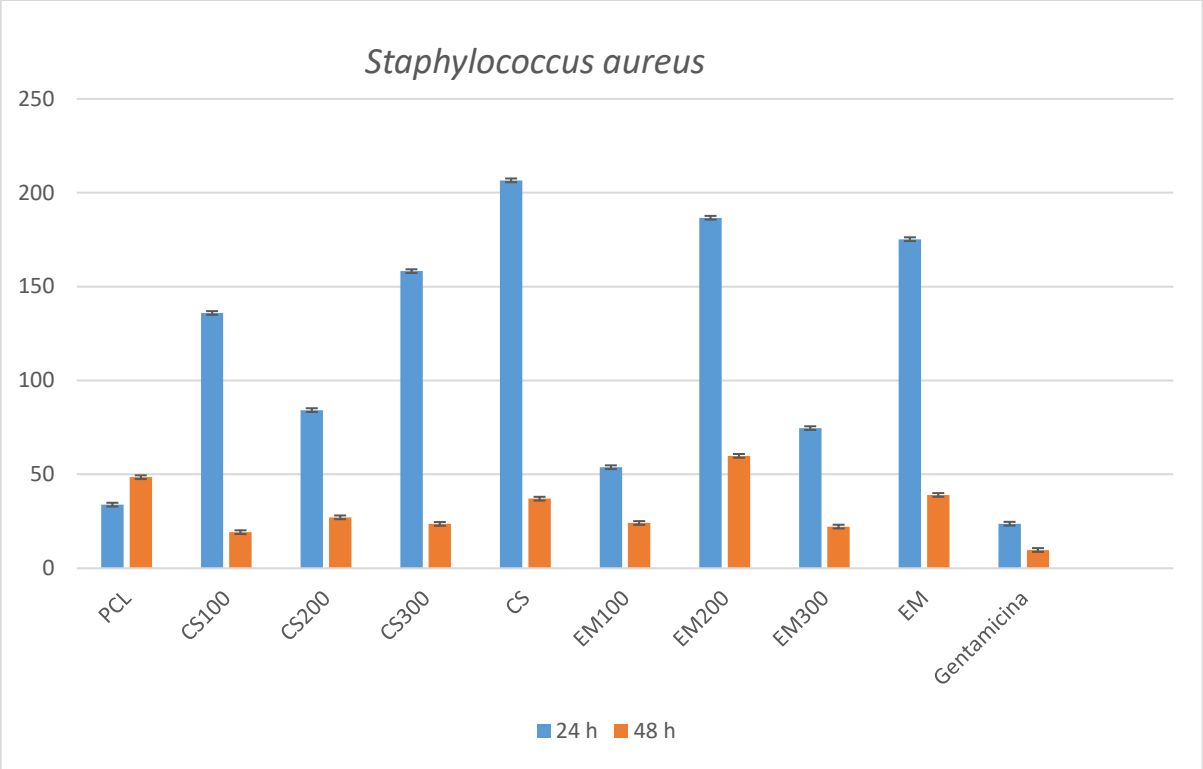

Figura 18. Ensayo de proliferación de *Staphylococcus aureus*

En la figura 18 el crecimiento de las fibras en casi todas las algas es de más del 100 % (a excepción de EM100) en las 24 horas, con esto podemos decir que las algas están comportándose similarmente como nuestro control (PCL) y a las 48 horas se ve una evidente muerte de células (por debajo del 60%), realizando el mismo trabajo que nuestro antibiótico (gentamicina) ya en ese tiempo estas son consideradas toxicas.

Al realizar una previa comparación entre cada una de nuestras muestras tenemos que las fibras provocan una evidente proliferación bacteriana en Gram positivas y ningún efecto en Gram negativas.

La mayoría de las bacterias de importancia clínica pueden adquirir y expresar resistencia a los agentes antimicrobianos que se usan en forma habitual para tratar las infecciones que causan. Por consiguiente, una vez que se aísla un microorganismo en el laboratorio su caracterización con frecuencia incluye pruebas para detectar resistencia

a los antimicrobianos. Los procedimientos utilizados para determinar los perfiles de sensibilidad antimicrobiana y detectar resistencia a los agentes que pueden usarse con fines terapéuticos se denominan pruebas se sensibilidad a los antimicrobianos (Oltra Hostalet et al., 2018).

6.5.1. Comparación antimicrobiana entre sistemas de compositos de PCL

Diversa es la literatura que se ha reportado donde el polímero de PCL ha sido combinado y electrohilado para crear un sistema con actividad antimicrobiana. Por ejemplo, Drobrzanski, et al. (2014), reportó un sistema complejo de PCL/$AgNO_3$ el cual presentó actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (99.95% de inhibición con 5% de $AgNO_3$) y *Staphylococcus aureus* (99.93 % de inhibición con 5% de $AgNO_3$) (Dobrzański *et al.,* 2014).

Así mismo en el mismo año, también se reportaron fibras de PCL y quitosano que mostró tener la capacidad para inhibir a la *Escherichia coli,* evidenciándose un 24.47 mm de diámetro de inhibición. Por otro lado, el grupo de Gao, et al. (2014), fabricó compositos de PCL/ CA/ AgNP utilizando la técnica de electrohilado, donde lograron una inhibición del crecimiento bacteriano de la *Escherichia coli (*99% de inhibición en 5 minutos y 100% de inhibición en 30 minutos) (Gao *et al.,* 2014).

Posteriormente entre 2015 al 2019, varios grupos de investigadores en diferentes países estudiaron la capacidad antimicrobiana de fibras de PCL y Gelatina donde Chong, *et al.,* (2015) al evaluar la capacidad inhibitoria de este sistema observaron un 30% de inhibición ± en 1.2 mm de diámetro al evaluarla con *Escherichia coli* (Chong *et al.,* 2015). En el caso del grupo de Adeli Sardou, *et al.* (2018), obtuvieron una mayor capacidad inhibitoria pero evaluada con *Staphylococcus aureus* (37.6% de inhibición ± en 0.41mm de diámetro con 10% de ácido hennotánico), *Pseudomona aeruginosa* (ninguno de los andamios cargados con ácido hennotánico tuvo efecto significativo sobre la inhibición de esta bacteria) (Adeli *et al.,* 2018). Por último, Ramalingam, *et al.,* (2019), reportó porcentajes de inhibición más bajos que los reportados anteriormente con *Escherichia coli* (4.2% ± en 0.8 mm de diámetro), *Pseudomona aeruginosa* (6.3% ± en 1.1mm de

diámetro), *Staphylococcus aureus* (15.2% ± en 3.6 mm de diámetro) (Ramalingam *et al.,* 2019).

Por otro lado, se han utilizado nanoparticulas de oxido de cobre para buscar un aumento en la actividad antimicrobiana con bacterias patógenas. Dichos fibras poliméricas de PCL/CuONPs mostraron hasta el momento una actividad alta en comparación a lo reportado con *Escherichia coli* (37.98% de inhibición con 200 nM), *Pseudomona aeruginosa* (53.96% de inhibición con 200 mM), *Staphylococcus aureus* (13.75% de inhibición con 200 mM) (Muñoz *et al.,*2019).

Sin embargo, Nejaddehbashi, *et al.,* (2020) logró incrementar esta actividad antimicrobiana logrando con *Staphylococcus aureus* (50% de eficacia en 3 días*), Pseudomona aeruginosa* (50% de eficacia en 3 días). Este éxito lo obtuvo gracias al uso de Sulfadiazina de plata incorporándola en fibras de PCL (Nejaddehbashi *et al.,* 2020).

En la tabla 12 podemos ver los resultados de los artículos científicos previamente mencionados. Cabe mencionar que los porcentajes varían porque el análisis antimicrobiano en cada una de ellas fue distinto. Por ejemplo, algunos análisis fueron realizados con contacto directo, en donde la respuesta de inhibición fue en minutos, en otros se incubaron las bacterias (*Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa y Staphylococcus aureus*) junto con las respectivas fibras y el porcentaje de inhibición fue basado en un diámetro especifico, y en otras la respuesta fue evaluada en horas y días.

Tabla 12. Resultados (%) de inhibición bacteriana de literatura científica

Compositos de PCL con:									
Bacteria	***Algas****	**CuONPs**	**$AgNO_3$**	**Chitosan**	**AgNP**	**GEL**	**SSD**	**GEL**	**GEL**
Escherichia coli	***60***	37.98	99.95	24.47	99	37.6		30	4.2
Pseudomona aeruginosa	***60***	53.96					50		6.3

Staphylococcus aureus	***75***	13.75	99.93				50		15.2

***Nuestro estudio.**

Dicho esto, podemos realizar una comparación de cada resultado junto con los nuestros y podemos ver que los promedios de inhibición en *Escherichia coli (49.15%) Staphylococcus aureus* (50.776%) *y Pseudomona aeruginosa* (42.565%) son muy aproximados entre ellos. Analizando dichos promedios tenemos que *Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa* presenta menor porcentaje de muerte bacteriana que en *Staphylococcus aureus.*

Observando los resultados reportados en la tabla 12 se puede decir que el uso de extractos de algas marinas fue beneficioso en la inhibición de las bacterias, ya que los porcentajes obtenidos demuestran que, en cada una su crecimiento se vio afectado por la presencia de las algas y por ende dentro del área de salud es importante para combatir el desarrollo de infecciones o enfermedades. Comparando cada porcentaje nos podemos percatar que el estudio realizado en este proyecto presenta mejores porcentajes de disminución de crecimiento de la bacteria, a excepción de los nitratos de plata, en el cual sus porcentajes eliminaron casi por completo a las bacterias.

Como hemos dicho anteriormente cada bacteria presenta diferente respuesta dependiendo el tipo de Gram al cual pertenezca*. Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa* pertenecen a la familia de las Gram negativas *y Staphylococcus aureus* a las Gram positivas. La diferencia entre el tipo de Gram se debe a su pared celular, las Gram negativas aparte de contar con una membrana plasmática tiene una membrana externa y en esta se encuentran muchos lipopolosácaridos (LPS). Los LPS están conformados por una cadena lateral o también llamada ‘’Antígeno O’’, el cual tiene como función principal impedir la entrada de cualquier molécula. Al ser más compleja la pared celular de las Gram negativas el paso de cualquier molécula es más limitado que en las Gram positivas.

Por lo tanto, retomando una parte del párrafo anterior junto con los promedios de porcentaje de inhibición de cada bacteria con sus respectivas fibras, tenemos que la muerte de las bacterias Gram positivas es mayor que en las bacterias Gram negativas.

En efecto las algas tienen como ventaja ser parte del medio natural, no son para nada toxicas y el hecho de estudiarlas no tan sólo genera un impacto en el área biomédica sino también en el área ambiental y al ser electrohiladas con un polímero biodegradable hace de este estudio el poder crear productos naturales para el beneficio del ser humano y de nuestro ecosistema.

Teniendo como conclusión que lo ya mencionado en nuestro análisis antimicrobiano con nuestras algas, puede ser verificado con literatura científica semejante a este trabajo.

VII. CONCLUSIONES

La técnica del electrohilado es relativamente nueva, pues hasta hace pocos años se comenzó a usar, gracias al sin fin de áreas en las que puede apoyar. Este trabajo logró electrohilar el extracto de las algas marinas *Colpomenia sinuosa (Cs)* y *Egregia menziesii (Em*), lo cual resulta muy beneficioso, ya que estas cuentan con una gran cantidad de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados para diferentes fines. También se obtuvo que algunas de las algas cuentan con fluorescencia, característica cuya aplicación puede ser estudiada en una investigación a futuro. En la prueba antimicrobiana analizamos que la respuesta de inhibición de las bacterias depende del tipo de Gram a las que estas pertenezcan, obteniendo mejores resultados con las bacterias Gram positivas. Las fibras poliméricas electrohiladas con extractos de alga marina que presentaron mayor efectividad en la inhibición fueron aquellas funcionalizadas con la bacteria *Staphylococcus aureus.*

VIII. BIBLIOGRAFIA

Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L., & Li, C. (2013). Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A Review. Reviews on advanced materials science. 34, 123–140.

Adeli-Sardou, M., Torkzadeh-Mahani, M., Yaghoobi, M. M., & Dodel, M. (2018). Biomacromolecular Journal Antibacterial and Anti-biofilm Investigation of Electrospun PCL/gelatin/Lawsone Nano Fiber Scaffolds against Biofilm Producing Bacteria. *Biomacromol. J*, *4*(1), 46–57. Retrieved from www.bmmj.org

Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L. E., Ávila Serrano, G. E., González Yajimovich, Ó., & Becerril Bobadilla, F. (2010). Macroalgas submareales de la bahía de Todos Santos, Baja California, México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 81(003), 601–618. https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2010.003.632

Al, E. T. (2006). Capitulo XI. Fotosíntesis, Productividad y Algas Marinas, 1–39. Retrieved from http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/fotosintesisyproductividadyalgasmarinas.pdf

Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011). Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*, *9*(10), 2106–2130. https://doi.org/10.3390/md9102106

Álvarez-Suárez, A. S., Dastager, S. G., Bogdanchikova, N., Grande, D., Pestryakov, A., García-Ramos, J. C., … Villarreal-Gómez, L. J. (2020). Electrospun Fibers and Sorbents as a Possible Basis for Effective Composite Wound Dressings. Micromachines, 11(4), 441. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/mi11040441.

Amaya, J. B. (2018). Estudio De La Degradabilidad Del Pcl (Policaprolactona) Dosificado Con La Lignina De La Fibra De Banano. Revista Iberoamericana de Polimeros y MAteriales, 19(4), 128–141.

Anllely Grizett Gutiérrez Rodríguez. (2018). Caracterización de las propiedades anti-

hiperglicemiante de los extractos derivados del alga marina *Egregia menziesii.*

Cabra, V., Arreguín, R., Química, I. De, Nacional, U., México, A. De, Exterior, C., … México, D. F. (2008). Emulsifying properties of proteins, *2*(2), 80–89.

Camelo R., M., Vera M., S. P., & Bonilla B., R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *12*(2), 159. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:227

Castilla-Cortázar, I., Vidaurre, A., Marí, B., & Campillo-Fernández, A. J. (2019). Morphology, Crystallinity, and Molecular Weight of Poly(ε-caprolactone)/Graphene Oxide Hybrids. Polymers, 11(7), 1099. https://doi.org/10.3390/polym11071099.

Cherry, P., O'hara, C., Magee, P. J., Mcsorley, E. M., & Allsopp, P. J. (2019). Risks and benefits of consuming edible seaweeds. Nutrition Reviews, 77(5), 307–329. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy066

Chojnacka, K. (2012). Biologically Active Compounds in Seaweed Extracts - the Prospects for the Application. The Open Conference Proceedings Journal, 3(1), 20–28. https://doi.org/10.2174/1876326X01203020020

Chong, L. H., Lim, M. M., & Sultana, N. (2015). Fabrication and evaluation of polycaprolactone/gelatin-based electrospun nanofibers with antibacterial properties. *Journal of Nanomaterials*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/970542.

Colin, A. (2017). Síntesis de nanopartículas de oro asistida por extracto de alga marina, (August). https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21093.70888.

Cornejo Bravo, J. M., Villarreal Gómez, L. J., & Serrano Medina, A. (2016). Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques. In *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications* (p. 14). InTech. https://doi.org/10.5772/65939

Cui, W., Zhou, Y., & Chang, J. (2010). Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery. *Science and Technology of Advanced Materials*, *11*(1), 14108. https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014108.

Dad, U., San, N., Gonzaga, L., De, E., Antiinflamatoria, A., En, O., & Provincia, L. A. (2014). Universi.dad nacional “san luis gonzaga” de ica.

Dash, T. K., & Konkimalla, V. B. (2012). Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. Journal of Controlled Release, 158(1), 15–33. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.064.

Dobrzański, L. A., Hudecki, A., Chladek, G., Król, W., & Mertas, A. (2014). Surface properties and antimicrobial activity of composite nanofibers of polycaprolactone with silver precipitations. *Archives of Materials Science and Engineering*, *70*(2), 53–60.

El Asri, O., Ramdani, M., Latrach, L., Haloui, B., Ramdani, M., & Afilal, M. E. (2017). Comparison of energy recovery after anaerobic digestion of three Marchica lagoon algae (Caulerpa prolifera, Colpomenia sinuosa, Gracilaria bursa-pastoris). Sustainable Materials and Technologies, 11(February), 47–52. https://doi.org/10.1016/j.susmat.2016.12.002

El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *18*(1), 1–25. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001

Ellis, N., Ommen, J. R. van, & Yurteri, C. U. (2010). “Development of a continuous nanoparticle coating with electrospraying” in “The 13th International Conference on Fluidization - New Paradigm in Fluidization Engineering.” *Sang Done Kim,Korea Advanced Institute of Science and Technology, Korea; Yong Kang, Chungnam National University, Korea; Jea Keun Lee, Pukyong National University, Korea; Yong Chil Seo, Yonsei University, Korea Eds, ECI Symposium Series*.

Enis, I. Y., Vojtech, J., & Sadikoglu, T. G. (2016). Alternative solvent systems for polycaprolactone nanowebs via electrospinning. Journal of Industrial Textiles, 47(1), 57–70. https://doi.org/10.1177/1528083716634032.

Franklin, L., & Forster, R. (1997). The changing irradiance environment: Consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *European Journal of Phycology*, *32*(3), 207–232. https://doi.org/10.1080/09670269710001737149

Frikha, F., Kammoun, M., Hammami, N., Belbahri, L., Gargouri, Y., & Miled, N. (2011). C m 2 3, 37, 113–124.

Gao, Y., Truong, Y. B., Zhu, Y., & Louis Kyratzis, I. (2014). Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications. *Journal of Applied Polymer Science*, *131*(18), 9041–9053. https://doi.org/10.1002/app.40797

Gimenez, P. J., Angosto, J. M., & Fernandez-lopez, J. A. (2013). Bioactividad de colorantes rojos naturales. *VI Jornadas de Introduccion a La Investigacion de La UPCT*.

González Bermúdez, Y., Rodríguez Rico, I. L., Guibal, E., Calero de Hoces, M., & Martín-Lara, M. Á. (2012). Biosorption of hexavalent chromium from aqueous solution by Sargassum muticum brown alga. Application of statistical design for process optimization. *Chemical Engineering Journal*, *183*, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.12.022

Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2007). Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(30), 5670–5703. https://doi.org/10.1002/anie.200604646

Hadipour-Goudarzi, E., Montazer, M., Latifi, M., & Aghaji, A. A. G. (2014). Electrospinning of chitosan/sericin/PVA nanofibers incorporated with in situ synthesis of nano silver. *Carbohydrate Polymers*, *113*, 231–239. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.082

Hernández-Herrera, R. M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Briceño-Domínguez, D. R., Di Filippo-Herrera, D. A., & Hernández-Carmona, G. (2018). Seaweed as potential plant growth stimulants for agriculture in Mexico. *Hidrobiologica*, *28*(1), 129–140. https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2018v28n1/hernandezc

Hurtado, M. Á., Manzano-Sarabia, M., Hernández-Garibay, E., Pacheco-Ruíz, I., & Zertuche-González, J. A. (2011). Latitudinal variations of the yield and quality of agar from Gelidium robustum (Gelidiales, Rhodophyta) from the main commercial harvest beds along the western coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, *23*(4), 727–734. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9572-0

Jackson, V. A. (2008). Investigation into the metal contamination of three rivers in the Western Cape and the subsequent application of a bioreactor system as remediation technology. *Technology*.

Kanagasabhapathy, M., Yamazaki, G., Ishida, A., Sasaki, H., & Nagata, S. (2009). Presence of quorum-sensing inhibitor-like compounds from bacteria isolated from the brown alga Colpomenia sinuosa. Letters in Applied Microbiology, 49(5), 573–579. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02712.x

Khin Khin Gyi. (2010). The morphology and distribution of Colpomenia sinuosa (Mertens ex Roth) Derbes & Solier (Scyosiphonales, Phaeophyta) from Myanmar. *Department of Marine Science*, *Master of*(1), 1–21.

Kuda, T., Taniguchi, E., Nishizawa, M., & Araki, Y. (2002). Fate of water-soluble polysaccharides in dried Chorda filum a brown alga during water washing. Journal of Food Composition and Analysis, 15(1), 3–9. https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1037

Li, Z., & Wang, C. (2013). Effects of Working Parameters on Electrospinning (pp. 15–28). https://doi.org/10.1007/978-3-642-36427-3_2

Lozano, I. S. (2013). Extracción, caracterización y análisis de la actividad anticoagulante de los polisacáridos sulfatados del alga café Hydroclathrus clathratus (C. Agardh) M.A. Howe, 52.

Lydia, D., & Ladah, B. (2013). Coordinador del programa de posgrado en Ecología Marina Director de Estudios de Posgrado <<20>> de <<marzo>> de 2013.

Mendoza, E. R. (2017). Universidad De San Carlos De Guatemala Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacia, (38), 2019.

Menendez, R., Fernandez, M., & Garcia, N. (2010). Las algas marinas como fuente de nuevos agentes anti-inflamatorios . *Revista Electronica de La Agencia Del Medio Ambiente*, *10*(19), 1–10. Retrieved from http://ama.redciencia.cu/articulos/19.06.pdf

Mochane, M. J., Motsoeneng, T. S., Sadiku, E. R., Mokhena, T. C., & Sefadi, J. S. (2019). Morphology and Properties of Electrospun PCL and Its Composites for Medical

Applications: A Mini Review. Applied Sciences, 9(11), 2205. https://doi.org/10.3390/app9112205.

Molinar Toribio, E. M. (2015). Estudio del efecto de los ácidos grasos poliinsaturados, polifenoles e iminociclitoles sobre marcadores relacionados con el síndrome metabólico, 1 recurs electrònic (411). Retrieved from http://hdl.handle.net/2445/63267

Monla, R. Al, Dassouki, Z., Kouzayha, A., Salma, Y., Gali-Muhtasib, H., & Mawlawi, H. (2020). The cytotoxic and apoptotic effects of the brown algae colpomenia sinuosa are mediated by the generation of reactive oxygen species. Molecules, 25(8), 1–14. https://doi.org/10.3390/molecules25081993

Muñoz-Escobar, A., Ruíz-Baltazar, Á. de J., & Reyes-López, S. Y. (2019). Novel Route of Synthesis of PCL-CuONPs Composites With Antimicrobial Properties. *Dose-Response*, *17*(3), 1–11. https://doi.org/10.1177/1559325819869502

Nageh, H., Ezzat, M., Ghanim, M., Hassanin, A., & Abd El-Moneim, A. (2014). Evaluation of Antibacterial Activity and Drug Release Behavior of Chitosan-Based Nanofibers (In Vitro Study). *UK Journal of Pharmaceutical Biosciences*, *2*(3), 1. https://doi.org/10.20510/ukjpb/2/i3/91158

Nazrul, M. (2013). Los antioxidantes para la salud óptima. *Revista Medica Cientifica*, *26*(2), 3–9.

Nejaddehbashi, F., Hashemitabar, M., Bayati, V., Moghimipour, E., Movaffagh, J., Orazizadeh, M., & Abbaspour, M. (2020). Incorporation of silver sulfadiazine into an electrospun composite of polycaprolactone as an antibacterial scaffold for wound healing in rats. *Cell Journal*, *21*(4), 379–390. https://doi.org/10.22074/cellj.2020.6341

Oltra Hostalet, F., Núñez-Núñez, M., Portillo Cano, M. del M., Navarro Bustos, C., Rodríguez-Baño, J., & Retamar Gentil, P. (2018). Análisis de la calidad de uso de antimicrobianos en el servicio de urgencias de un hospital de tercer nivel TT - Analysis of quality antimicrobial agent use in the emergency department of a tertiary care hospital. *Emergencias (Sant Vicenç Dels Horts)*, *30*(5), 297–302. Retrieved from

http://emergencias.portalsemes.org/descargar/anlisis-de-la-calidad-de-uso-de-antimicrobianos-en-el-servicio-de-urgencias-de-un-hospital-de-tercer-nivel/force_download/

Parsons, M. J. (1982). Colpomenia (endlicher) derbès et solier (phaecphyta) in New Zealand. New Zealand Journal of Botany, 20(3), 289–301. https://doi.org/10.1080/0028825X.1982.10428496

Pérez-González, G. L., Villarreal-Gómez, L. J., Serrano-Medina, A., Torres-Martínez, E. J., & Cornejo-Bravo, J. M. (2019). Mucoadhesive electrospun nanofibers for drug delivery systems: Applications of polymers and the parameters' roles. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 5271–5285. https://doi.org/10.2147/IJN.S193328

Piggott, A. M., & Karuso, P. (2005). Quality not quantity: The role of marine natural products in drug discovery and reverse chemical proteomics. *Marine Drugs*, *3*(2), 36–63. https://doi.org/10.3390/md302036

Ramalingam, R., Dhand, C., Leung, C. M., Ezhilarasu, H., Prasannan, P., Ong, S. T., … Arunachalam, K. D. (2019). Poly-ε-caprolactone/gelatin hybrid electrospun composite nanofibrous mats containing ultrasound assisted herbal extract: Antimicrobial and cell proliferation study. *Nanomaterials*, *9*(3). https://doi.org/10.3390/nano9030462

Ramier, J., Bouderlique, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Langlois, V., … Grande, D. (2014). Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, *38*, 161–169. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.046

Sajeev, U. S., Anoop Anand, K., Menon, D., & Nair, S. (2008). Control of nanostructures in PVA, PVA/chitosan blends and PCL through electrospinning. *Bulletin of Materials Science*, *31*(3), 343–351. https://doi.org/10.1007/s12034-008-0054-9

Sánchez Cepeda, Á. P. (2016). Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina. *Ciencia En Desarrollo*, *7*(2), 133.

https://doi.org/10.19053/01217488.v7.n2.2016.4818

Scott, J., & Sarabi-mianeji, S. (2015). Investigating two electrospinning mass transfer mechanisms, (October), 4–6.

Seeram Ramakrishna, Zamani, M., & Molamma P Prabhakaran. (2013). Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, *8*, 2997. https://doi.org/10.2147/IJN.S43575

Singh, H., Sharma, R., Joshi, M., Garg, T., Goyal, A. K., & Rath, G. (2015). Transmucosal delivery of Docetaxel by mucoadhesive polymeric nanofibers. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *43*(4), 263–269. https://doi.org/10.3109/21691401.2014.885442

Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanpour, Z., Robert Waaland, J., & Rabiei, R. (2012). Fatty acids, amino acids, mineral contents, and proximate composition of some brown seaweeds. Journal of Phycology, 48(2), 285–292. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01122.x

Tucker, N., Stanger, J. J., Staiger, M. P., Razzaq, H., & Hofman, K. (2012). The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, *7*(3), 63–73. https://doi.org/10.1177/155892501200702s10

Velasco Barraza, R. D., Álvarez Suarez, A. S., Villarreal Gómez, L. J., Paz González, J. A., Iglesias, A. L., & Vera Graziano, R. (2016). Diseño de un dispositivo de electrohilado de bajo costo para la enseñanza práctica en un curso de Biomateriales en Bioingeniería. Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica, 37(1), 7–16.1

Vert, M. (2009). Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: Beliefs and facts. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20(2), 437–446. https://doi.org/10.1007/s10856-008-3581-4

Villarreal-Gómez, Luis Jesús, Cornejo-Bravo, J. M., Vera-Graziano, R., & Grande, D. (2016). Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: a critically

selected survey. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *27*(2), 157–176. https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1116885

Villarreal-Gómez, Luis J, Soria-Mercado, I. E., Guerra-Rivas, G., & Ayala-Sánchez, N. E. (2010). Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *45*(2). https://doi.org/10.4067/s0718-19572010000200008

Wang, L., Wang, X., Wu, H., & Liu, R. (2014). *Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years*. *Marine Drugs* (Vol. 12). https://doi.org/10.3390/md12094984.

Yu, D.-G., Zhang, X.-F., Shen, X.-X., Brandford-White, C., & Zhu, L.-M. (2009). Ultrafine ibuprofen-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats using electrospinning. *Polymer International*, *58*(9), 1010–1013. https://doi.org/10.1002/pi.2629