

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado

TESIS:

“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
HEMOCOMPATIBILIDAD DE UN HIDROGEL DE QUITOSANO PARA
LA LIBERACIÓN DE L-ARGININA AL 10%”

PRESENTA:

C.D. Rebeca Elizabeth Flores Ventura
Matrícula: 222450007

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Estomatología con Opción Terminal en Ortodoncia

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Miguel Angel Casillas Santana

DIRECTOR METODOLÓGICO:

D.C. Brenda Eréndida Castillo Silva

ASESOR DISCIPLINARIO:

M.O. Farid Alfonso Dipp Velázquez

ASESOR EXTERNO:

Dr. Juan Fernando Aristizabal Pérez

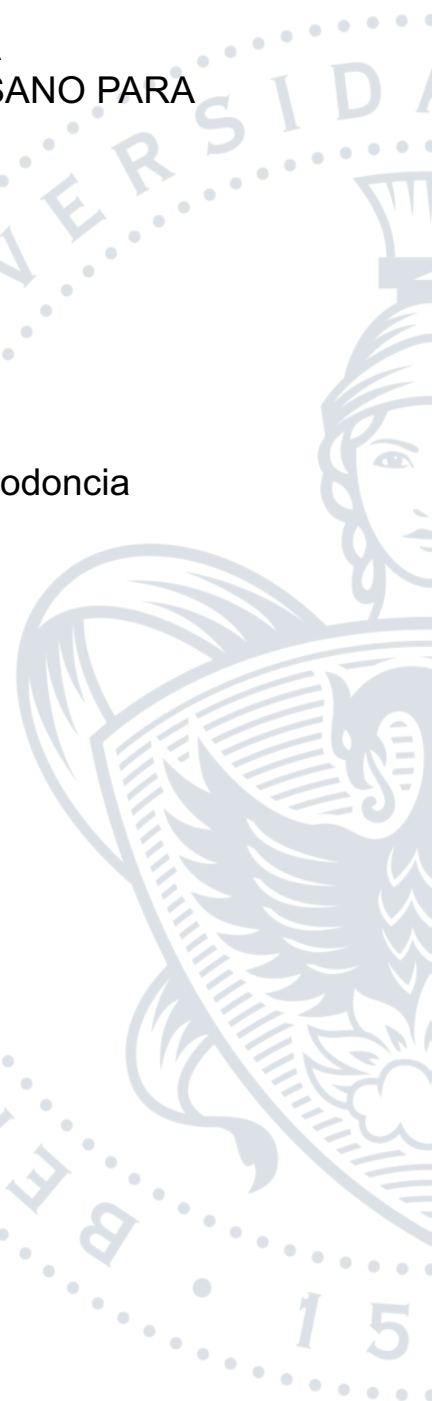
LECTOR DE TESIS:

M.C.M.I. Yolanda Torres Perfino

REGISTRO CIFE: 2024237

FECHA:

MAYO 2024



DICTÁMEN DE APROBACIÓN DE LA TESIS

Oficio No. FESIEP/CIFE/040/2024



Oficio No. FESIEP/CIFE/040/2024

C. Rebeca Elizabeth Flores Ventura
Estudiante de la Maestría en Estomatología
con opción en Terminal en Ortodoncia
Matrícula No.: 222450007
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la que suscribe MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; para comunicarle una noticia importante en relación con su proceso académico.

Con agrado, le informo que la Secretaría de Posgrado ha otorgado la aprobación para la impresión de su Tesis Titulada:

"Caracterización y evaluación de la hemocompatibilidad de un hidrogel de quitosano para la liberación de L-Arginina al 10%"

Esta tesis está inscrita en el libro de registros No. 09, página 01, con el No. de asignación 2024237 en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica. Usted presentará esta tesis para realizar su examen profesional y así obtener el grado de Maestría en Estomatología con opción en Terminal en Ortodoncia.

La aprobación de la impresión de su tesis represente un hito significativo en su trayectoria académica y profesional. Es el reflejo de su arduo trabajo, dedicación y la profundidad de su investigación en el campo de la Estomatología.

Le insto a que proceda con los pasos necesarios para la impresión y presentación de Tesis, cumpliendo con todas las normativas y plazos establecidos por la Facultad. Esto incluye la revisión final de su documento, asegurándose de que desempeñe todos los requisitos académicos y formatos establecidos, así como la coordinación con la Secretaría para la programación de su examen profesional.

Para cualquier consulta, aclaración o información adicional, le invito a contactar directamente a este Posgrado, estamos aquí para asistirle en cada paso restante de su proceso académico.

Sin otro particular, le reitero mi más atenta y distinguida consideración y le deseo éxito en la etapa final de esta carrera académica.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a viernes 24 de mayo de 2024

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología

*Nota: Se anexa Formato de Impresión de Tesis - C. Rebeca Elizabeth Flores Ventura - Maestría en Estomatología con opción en Terminal en Ortodoncia - S.I.E.P. - Facultad de Estomatología - B.U.A.P. (origina) - p.s.c.y.a.

*C.c.p. Archivo

*MCO, FJMA/MEP, GNRCQ/ymeth

Secretaría de Investigación y
Estudios de Posgrado
Facultad de
Estomatología

31 poniente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22'22 29 55 00
Ext. 5526

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: **Maestra en Estomatología con opción terminal en Ortodoncia**

No. Registro CIFE: 2024237.

Fecha de Registro ante CIFE: miércoles 24 de enero del 2024.

Título de la Tesis: "Caracterización y evaluación de la hemocompatibilidad de un hidrogel de quitosano para la liberación de L-Arginina al 10%"

Nombre del alumno: Rebeca Elizabeth Flores Ventura.

Matrícula: 222450007.

Domicilio: Boulevard Aaron Joaquín #2 Mza. "J", Col. Hermosa Provincia, Fortín de las Flores, Ver.

Tel: 27* 12 59 16 76.

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 03 de enero del 2022.

Firma: _____

Director de Tesis: DC. Miguel Ángel Casillas Santana.

Grado académico: Doctor en Ciencias Odontológicas.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100526485.

Tel: 44*48 46 76 45.

Firma: _____

Director Disciplinario: MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez.

Grado académico: Maestría en Ortodoncia.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100408155.

Tel: 22*21 61 47 78.

Firma: _____

Director Metodológico: DC. Brenda Eréndira Castillo Silva.

Grado académico: Doctor en Ciencias Odontológicas.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: NSS526469.

Tel: 44*42 42 60 77.

Firma: _____

Lector: MCMI. Yolanda Torres Perfino.

Grado académico: Maestra en Ciencias Médicas e Investigación.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100530226

Tel: S/N.

Firma: _____

Nombre y firma de aprobación del presidente de la academia/Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Ortodoncia

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez

Firma: _____

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la impresión de la Tesis.

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana



fecha: viernes 24 de mayo del 2024.

Sello _____

**OFICIO DE ACEPTACIÓN DE PROYECTO (C.I.F.E.)
CONSTANCIA NO. FESIEP/CIFE/008/2024**



BUAP

Constancia No. FESIEP/CIFE/008/2024

DC. Miguel Ángel Casillas Santana
Responsable del Proyecto de Investigación
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo la que suscribe MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y tras un detenido análisis y evaluación en el Proyecto de Investigación (Colectivo):

Nombre del Título del Proyecto:

"Caracterización y evaluación de la hemocompatibilidad de un hidrogel de quitosano para la liberación de L-Arginina al 10%"


Presentado por:

No.	Cargos	Nombres	ID y/o Matrícula
1	Responsable del Proyecto de Investigación:	DC. Miguel Ángel Casillas Santana	100526485
2	Directora Metodológica:	DC. Brenda Eréndida Castillo Silva	NSS526469
3	Director Disciplinaria:	MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez	100408155
4	Asesor Externo:	Dr. Juan Fernando Aristizábal Pérez Director del Departamento de Ortodoncia, Escuela de Odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia	S/N
5	Estudiante de Maestría en Estomatología: <u>Terminal en Ortodoncia</u>	C. Rebeca Elizabeth Flores Ventura	222450007

HAGO CONSTAR, que, ha sido oficialmente ACEPTADO. Este relevante proyecto, ha sido registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.), inscrito en el libro de registros No. 09, página 01, bajo el No. de asignación 2024237, en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica.

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a miércoles 24 de enero del 2024


MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado,
Facultad de Estomatología

*C.c.p. Archivo
*MCO, FJMA/MEP, GNRCQ, ~~Yaneth~~

Secretaría de Investigación y
Estudios de Posgrado
Facultad de
Estomatología

31 poniente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22*22 29 55 00
Ext. 5526



REPORTE DE SIMILITUD ANTIPLAGIO

Rebeca

ORIGINALITY REPORT

19%
SIMILARITY INDEX

13%
INTERNET SOURCES

3%
PUBLICATIONS

11%
STUDENT PAPERS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es la culminación de una etapa llena de aprendizaje, conocimientos, experiencias, aventuras e ilusiones.

Agradezco a Dios, que me deja sin palabras tras las experiencias que me permite vivir.

A mis padres, Samuel Flores y Sonia Ventura por ser personas de carácter fuerte, valiente, por educarme con todos los valores necesarios para llegar a ser lo que ahora soy, por creer en mi y en todo lo que puedo llegar a ser, sé que estos dos años y medio fueron difíciles, pero lo logramos.

A mis hermanos Aziel y Zabdi Flores, quienes siempre estuvieron aplaudiendo mis logros, aconsejándome y animándome cuando más lo necesitaba, además de enseñarme que la vida tiene más colores que solo blanco y negro, por darme la paz y distracción que muchas veces necesitaba y sobre todo por ayudarme a creer en mi misma y motivarme a esforzarme cada día.

A mis tios paternos y maternos, así como mis abuelos y primos, que con un consejo o apoyo siempre estuvieron para mi.

A mis amigos y familia de la Maestría... los ortoleales, por su apoyo en los diferentes momentos que pasamos juntos, por esas pláticas, peleas, risas, por su complicidad, compañerismo, amistad, confianza, confidencialidad... Pao, Omar, Yuri y May, quienes con distintas formas de ser, nos mantuvimos firmes, gracias, gracias, gracias, por estar para mi siempre, tocaron mi vida, sabía que este día llegaría, lo logramos, hubo risas y lágrimas detrás de esta etapa y ahora les deseo el mejor de los éxitos y amor en esto que apenas comienza.

A May V, Bren, Maggie, Denni, Max, Edgar, Chenó, Beto y amigos quienes me escucharon hasta el cansancio cuando más lo necesitaba, gracias por siempre estar, son parte fundamental de esta etapa, ya que siempre me recordaron mi capacidad y no dudaron de mí, ni un instante, cada uno de ustedes ocupa un lugar importante en mi corazón.

A Anita, quien fue mi antecesora en esta línea de investigación, ya que junto con ella, luchar y sacar adelante este proyecto, se convirtió en días de aventura y retos y nunca nos faltaron las risas, gracias por hacer más ameno los días de estrés e incertidumbre aun cuando ya habías egresado, mantuviste tu palabra de no dejarme sola, gracias por ser mi compañera y amiga, por permitirme aprender tanto de ti.

A mi maestro y amigo, José Luis Basulto, quien desde el propedéutico estuvo pendiente de que lograra mis objetivos, y ahora se cumple uno de los más importantes, esto apenas es un pasito de muchos, gracias por enseñarme que *“caballo que trota alcanza”* y nunca confiarme de mi conocimiento, siempre escuchar y aprender de los demás con humildad, así como mantener mis pies en el piso, gracias por enseñarme tanto.

A quien se convirtió de docente a mi amiga, la Dra. Alejandra Castro, quien con su bullying me enseñó a que la vida no es fácil y menos la Ortodoncia, pero si la ves desde otra perspectiva, los retos son más llevaderos, a que podemos aprender de nuestros errores, así como tener la humildad de aprender y enseñar lo que sabemos, a superarme a mi misma, a competir con mi yo del presente, sin olvidar a mi yo del pasado, recibiendo con amor a mi yo del futuro, a establecer mis

prioridades y buscar el equilibrio, a ayudar y pedir ayuda, usted fue esa voz adulta que me hacía caer en razón cuando me quejaba o no le encontraba razón a lo que sucedía durante la maestría, muchas gracias.

Así como a todos mis docentes, quienes me educaron no solo en la Ortodoncia, ya que forjaron mi carácter y me enseñaron a hacer mejor persona para la vida y para mis pacientes, por su apoyo, amistad, consejos, conocimientos, enseñanzas y sabiduría ya que con todo ello, sembraron un campo de experiencias en mi persona, los recuerdo y recordaré con mucho cariño, y les estaré agradecida por permitirme compartir cada uno de los momentos más memorables en mi vida.

A toda la familia de Ortodoncia: compañeros, pasantes, personal administrativo, mis pacientes que los recordare con mucho cariño.

Al Dr. Erick, Dra. Olivia, Dra. Julia, Dr. Nino, Dr. Ismael y en especial al Dr. Jerezano, que sin estar dentro del proyecto me brindó confianza y armas para culminarlo, así como al Dr. Casillas, director de este proyecto, quien me animaba, además que con su curiosidad me inspiraba a buscar siempre más opciones y soluciones para poder llevar a cabo este proyecto manteniendo vivo mi espíritu investigador.

A la vida y sus oportunidades, gracias por permitirme crecer.

“Apunta al infinito.

Aunque falles, aterrizarás entre las estrellas”.

Les Brown.

“Nunca te rindas. Es la forma más fácil de abandonar.

Establece una meta y no te rindas hasta alcanzarla.

Cuando lo hagas, fija otra meta y no te rindas hasta Alcanzarla. Nunca te rindas”.

Bear Bryant

“Los obstáculos son esas cosas horribles que ves cuando apartas la vista de tu meta”.

Henry Ford

“Todo es práctica”.

Pelé

“Las convicciones tienen el poder de crear y el poder de destruir”.

Anónimo

“He fallado una y otra vez en mi vida:

Por eso he conseguido el éxito”.

Michael Jordan

“Si no estás preparado para seguir buscando la luz en los lugares más oscuros sin parar, incluso en los momentos que parezca imposible, jamás tendrás éxito”.

Amelia Shepherd

“Lo imposible sólo tarda un poco más”

Mayra De la Cruz

-Donde quiera que estés, gracias por hacer que me atreviera entrar a la Maestría, ¡lo logramos!.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 ANTECEDENTES GENERALES	4
3.1.1 Hidrogeles	4
3.1.2 Vías de Administración y Sistemas de Liberación	4
3.1.3 Quitosano	6
3.1.4 L-Arginina	6
3.1.5 Teorías del Movimiento Dental	8
3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	9
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
5. JUSTIFICACIÓN	13
6. HIPÓTESIS	14
7. OBJETIVOS.....	14
7.1 Objetivo General	14
7.2 Objetivos Específicos.....	14
8. MATERIALES Y MÉTODOS	15
8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	15
8.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	15
8.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN	15
8.4 VARIABLES	15
8.5 CONCORDANCIA Y VIABILIDAD.....	17
8.6 UBICACIÓN ESPACIOTEMPORAL	17
9. PROCEDIMIENTO, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN	17
9.1 ELABORACIÓN DEL HIDROGEL	17
9.2 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES Y PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN.....	19
9.2.1 pH.....	19
9.2.2 ULTRAESTRUCTURA DEL HIDROGEL	20
9.2.3 HINCHAMIENTO O CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA	22
9.2.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADAS DE FOURIER.	23
9.2.5 HEMOCOMPATIBILIDAD	23
9.2.6. LIBERACIÓN	27
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33

11. RESULTADOS.....	34
11.1 pH	34
11.2 ULTRAESTRUCTURA.....	34
11.3 HINCHAMIENTO	35
11.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADAS DE FOURIER.....	36
11.5 LIBERACIÓN.....	40
11.5.1 Prueba de Cromatografía de Capa Fina	40
11.6 HEMOCOMPATIBILIDAD	41
11.6.1 Prueba de hemólisis	41
11.6.2 Prueba de Tiempo de Protrombina	42
11.6.3 Prueba de Tiempo de Tromboplastina Tisular Activada	42
12. DISCUSIÓN	43
12.1 pH	43
12.2 ULTRAESTRUCTURA.....	44
12.3 HINCHAMIENTO	45
12.4 FT-IR.....	45
12.5 HEMOCOMPATIBILIDAD	46
12.6 LIBERACIÓN.....	46
13. CONCLUSIONES	48
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
15. ANEXOS	53
15.1 CONSENTIMIENTOS INFORMADOS PARA REALIZAR PRUEBAS DE HEMOCOMPATIBILIDAD.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Tabla	Página
1	VARIABLES DEL ESTUDIO	15-16
2	PRUEBAS ESTADÍSTICAS A UTILIZAR	33
3	PROMEDIO DE LA MEDICIÓN DE pH DEL EXPERIMENTO POR TRIPLICADO DEL HIDROGEL DEL GRUPO POSITIVO	34
4	PROMEDIO DE LA MEDICIÓN DE pH DEL EXPERIMENTO POR TRIPLICADO DEL HIDROGEL DEL GRUPO CONTROL	34
5	PROMEDIO DE LA CANTIDAD EN PESO Y PORCENTAJE DE HINCHAMIENTO DE LOS HIDROGELES DEL GRUPO POSITIVO Y GRUPO CONTROL	35
6	RESULTADOS EN PORCENTAJE DE LA PRUEBA DE HEMÓLISIS	41
7	RESULTADOS EN SEGUNDOS DE LA EVALUACIÓN DEL TP	42
8	RESULTADOS EN SEGUNDOS DE LA EVALUACIÓN DEL TTPTA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Figura	Página
1	ESQUEMA DE LA CLASIFICACIÓN DE LOS HIDROGELES	5
2	SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE ACUERDO AL SITIO DE IMPLANTACIÓN	5
3	ESQUEMA DE PASOS A REALIZAR PARA EL PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE GRUPO POSITIVO Y CONTROL	19
4	PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE pH DE GRUPO POSITIVO Y CONTROL	20
5	MUESTRAS EN PROCESO DE RECUBRIMIENTO DE ORO	21
6	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (JSM-5800LV, JEOL, Tokio, Japón)	21
7	MUESTRAS DE HIDROGEL EN CAJA PETRI PREVIO A LA PRUEBA DE HINCHAMIENTO	22
8	EJEMPLO DE UN ESPECTRÓFOTOMETRO FT-IR (VERTEX 70 OPTICS-BRUCKER, BILLERICA, MA, USA)	23
9	RECOLECCIÓN DE SANGRE DE ADULTO HUMANO	24
10	HOMOGENEIZACIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE CON LOS HIDROGELES DE CADA GRUPO	24
11	OBTENCIÓN DE PLASMA	25
12	PRUEBA DE HEMÓLISIS	25
13	PRUEBA DE TIEMPO DE PROTROMBINA	26
14	PRUEBA DEL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA TISULAR ACTIVADA	27
15	ESQUEMA DEL DISEÑO DE PLACAS DE SÍLICE GEL	28
16	DISEÑO DE LAS PLACAS DE SÍLICE GEL	28
17	ESQUEMA DE LA SOLUCIÓN DE LA FASE MÓVIL	29
18	SOLUCIONES Y PREPARACIÓN DE FASE MÓVIL	29
19	ESQUEMA DE LA SOLUCIÓN REVELADORA	30
20	ESQUEMA DE LAS ALÍCUOTAS DE LA SALIVA ARTIFICIAL TRAS EL CONTACTO CON LOS HIDROGELES	30
21	ESQUEMA DE LA APLICACIÓN DE LA MUESTRA EN LA PLACA CROMATOGRÁFICA	31
22	REPRESENTACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA EN LA FASE MÓVIL	31
23	FASE REVELADORA	32
24	ESQUEMA DE SOLUCIONES DE L-ARGININA AL 10%	32
25	MICROFOTOGRAFÍAS OBTENIDAS DEL MEB DEL HIDROGEL DEL GRUPO POSITIVO	34

26	MICROFOTOGRAFÍAS OBTENIDAS DEL MEB DEL HIDROGEL DEL GRUPO CONTROL	35
27	HIDROGELES DEL GRUPO POSITIVO Y CONTROL, ANTES Y DESPUÉS DE LA PRUEBA DE HINCHAMIENTO	36
28	GRÁFICO DE ESPÉCTROS FT-IR DEL HIDROGEL GRUPO CONTROL	37
29	GRÁFICO DE ESPÉCTROS FT-IR DEL HIDROGEL GRUPO POSITIVO	37
30	GRÁFICO DE ESPÉCTROS FT-IR MÁS SIGNIFICATIVOS ENTRE GRUPOS EXPERIMENTALES	38
31	ESPÉCTROS FT-IR DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS OBTENIDOS DE LA CASA COMERCIAL SIGMA ALDRICH®, (ST. LOUIS, MO, USA).	39
32	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	40

ABREVIATURAS

SIGLAS	DEFINICIÓN
pH	Potencial De Hidrógeno
PT	Tiempo De Protrombina
APTT	Tromboplastina Tisular Activada
DDA	Grado De Desacetilación
DA	Grado De Acetilación
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NO	Óxido Nítrico
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
nNOS	Óxido Nítrico Sintasa Neuronal
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
cNOS	Óxido Nítrico Sintasa Constitutiva
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja Por Transformadas De Fourier
MEB	Microscopio Electrónico De Barrido
L-NMMA	Inhibidor De La Sintetasa De Óxido Nítrico
L-NAME	N G-Nitro-L-Arginina Metiléster
L-NIL	N6-(1-IMINOETIL)-L-LISINA 2 Hcl
NLA	Nitro-L-Arginina
TGF- β	Factor De Crecimiento Transformador Beta
TNF- α	Factor De Necrosis Tumoral Alfa
IL-8	Interleucina 8
CCR-1	Receptor De Quimiocinas Tipo Cc1
UV-Vis	Ultravioleta Visible
TLC	Cromatografía De Capa Fina Por Sus Siglas En Inglés Thin Layer Chromatography
PDMAEMA	Poli Dimetil Amino Etil Metacrilato
DITCO	Dirección De Innovación Y Transferencia De Conocimiento
FEBUAP	Facultad De Estomatología De La Benemérita Universidad Autónoma De Puebla
UV	Universidad Veracruzana
rpm	Revoluciones Por Minuto
g	Gramos
ml	Mililitros
CEIB	Centro De Investigación En Ingeniería Biomédica
μ l	Microlitros
μ m	Micrometros
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA HEMOCOMPATIBILIDAD DE UN HIDROGEL DE QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN DE L-ARGININA AL 10%”

La L-Arginina, aminoácido clave en la síntesis de óxido nítrico y regulación de la remodelación ósea, destaca en la aceleración del movimiento dental en tratamientos ortodóncicos sin embargo a la fecha, estudios en modelos animales muestran su eficacia, su aplicación directa en humanos requiere sistemas de liberación controlada, como hidrogeles de quitosano, siendo fundamental para futuras terapias ortodóncicas no invasivas y ambulatorias, siendo el objetivo de este estudio elaborar un hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10%, además de realizar pruebas de caracterización y evaluar la hemocompatibilidad mediante el Tiempo de Protrombina, Tromboplastina Tisular Activa y Hemólisis para demostrar que este efectivamente libera la L-Arginina y cumple con las características deseadas para un sistema de liberación de fármacos, y sentar las bases para poder realizar pruebas *in vitro* e *in vivo* posteriormente.

Se utilizaron dos grupos de hidrogel para realizar las pruebas, es decir, un grupo control compuesto por el hidrogel de quitosano sin carga de L-Arginina, así como un grupo positivo; hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10%, los experimentos se realizaron por triplicado con una n de 3 respectivamente. La prueba de ultraestructura se realizó mediante el Microscopio Electrónico de Barrido, así como se realizó prueba de pH a la saliva artificial en contacto con el hidrogel, se comprobaron la interacción de los componentes de cada grupo de hidrogeles mediante FT-IR, se sumergió cada grupo de hidrogel en saliva artificial para poder realizar la prueba de hinchamiento, se realizó las pruebas de hemocompatibilidad al interactuar los grupos de hidrogeles con sangre de adulto humano, así como se demostró la presencia de la L-Arginina en el medio acuoso (saliva artificial) con la prueba de Cromatografía de Capa Fina (TLC).

El medio acuoso en contacto con el hidrogel del grupo positivo presento un pH entre 7 a 6.8. Se observó una superficie irregular con cavidades porosas, así como el hidrogel del grupo positivo aumentó 210% su peso original durante la prueba de hinchamiento de 0 minutos a 60 minutos. Se obtuvieron picos característicos asociados con los grupos funcionales presentes en el quitosano y la L-Arginina en el grupo positivo.

La prueba de TLC evidenció la presencia de L-Arginina en la saliva artificial mediante la revelación cromatográfica de un color violáceo.

El grupo positivo presento propiedades anticoagulantes al interactuar con la sangre de adulto humano sano, además de considerarse como material no hemolítico.

Las pruebas de caracterización permitieron evidenciar aquellas propiedades deseables para un sistema de liberación de principios activos como los hidrogeles.

PALABRAS CLAVE

L-Arginina y Ortodoncia Acelerada, Sistemas de liberación de fármacos, Quitosano, Hidrogel, Caracterización de hidrogeles.

2. INTRODUCCIÓN

La Ortodoncia, una especialidad odontológica dedicada al estudio, prevención y corrección de las anomalías en el desarrollo, la conformación de las arcadas dentales y la disposición de los maxilares junto a sus estructuras dentales asociadas, persigue el restablecimiento del equilibrio morfológico, funcional y estético del complejo orofacial.

Uno de los factores determinantes en la duración de los tratamientos ortodóncicos es la velocidad del desplazamiento dental. Con el propósito de acelerar este proceso y, por ende, reducir el tiempo de tratamiento, se han explorado diversos protocolos que abarcan desde la irradiación con láser de baja energía hasta procedimientos como corticotomías o micro osteoperforaciones, además de enfoques farmacológicos que involucran la administración de prostaglandina E2, Vitamina D y L-Arginina.

La L-Arginina, aminoácido semiesencial y precursor clave para la síntesis de óxido nítrico, desempeña una función crucial en la regulación de la remodelación ósea, lo que a su vez favorece el movimiento dental.

Se han llevado a cabo estudios en modelos murinos que involucran la administración de L-Arginina mediante inyecciones repetidas para inducir una mayor rapidez en el desplazamiento dental, este modelo de aplicación resulta invasivo para su extrapolación a pacientes humanos. Hasta la fecha, no se dispone de estudios que hayan investigado la administración de L-Arginina para acelerar el movimiento dental en seres humanos.

Existen diversos sistemas de liberación controlada de fármacos que permiten una aplicación menos invasiva, posibilitando la liberación del agente bioactivo a una velocidad, localización y duración específica. Estos sistemas pueden dirigirse a diferentes áreas del organismo y, según sus características, reciben distintas denominaciones. Por ejemplo, para las mucosas de la cavidad oral se les conoce como sistemas mucoadhesivos, los cuales presentan formulaciones líquidas, sólidas y semisólidas como las más estudiadas y relevantes en cuanto a dosificación bucal. Estos comparten propiedades ideales, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, capacidad de hinchamiento y pH compatible con la cavidad oral. Dentro de los sistemas mucoadhesivos, los hidrogeles destacan por su capacidad para liberar agentes bioactivos. Estos materiales, sintetizados a partir de biopolímeros naturales, muestran excelentes propiedades para la aplicación en la cavidad oral. Se presume que la administración tópica de L-Arginina mediante un vehículo de liberación controlada, como los hidrogeles a base de quitosano, podría representar un tratamiento eficaz, no invasivo y ambulatorio para acelerar el movimiento dental, se ha comprobado que el quitosano es un material que cumple con las características anteriormente mencionadas por lo que ya se ha utilizado para aplicaciones dentales.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio radica en la elaboración de un hidrogel de quitosano que permita la liberación de L-Arginina al 10%, además de la caracterización de algunas de las propiedades fisicoquímicas que ayudan a evaluar que el hidrogel posee las propiedades deseables para ser utilizado en la mucosa de la cavidad oral y liberar un agente bioactivo (Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier, pH, hinchamiento, ultraestructura por el Microscopio

Electrónico de Barrido y liberación con Cromatografía de Capa Fina), así como el efecto del hidrogel sobre la coagulación sanguínea mediante la medición del Tiempo de Protrombina (PT), Tromboplastina Tisular Activada (APTT) y Hemólisis. Este avance sentará las bases para su futura aplicación en la aceleración de tratamientos de Ortodoncia.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES GENERALES

3.1.1 Hidrogeles

Hace más de cinco décadas, la biomedicina introdujo los hidrogeles como materiales que han evolucionado desde ser estáticos y bioinertes hasta convertirse en microentornos dinámicos y bioactivos capaces de direccionar respuestas biológicas específicas. Estas respuestas abarcan desde el estímulo del crecimiento celular en procesos de curación de heridas hasta la administración de tratamientos bajo demanda. Los hidrogeles son redes de polímeros hidrofílicos diseñados para desencadenar y responder a respuestas celulares específicas a nivel molecular. Estas redes tienen la capacidad de hincharse múltiples veces su peso en agua o fluidos biológicos sin perder su estructura tridimensional. Esta característica los convierte en candidatos atractivos para una amplia gama de aplicaciones biomédicas, ya que se asemejan a la fisiología de tejidos altamente hidratados (1).

Estos hidrogeles pueden ser de origen natural o sintéticos. Los primeros a menudo se componen de matrices basadas en polisacáridos o proteínas, siendo preferidos debido a su biocompatibilidad y capacidad de ser reconocidos y remodelados por células (2). Las propiedades de los hidrogeles están influenciadas por diversos factores, como cambios en el pH, fuerza iónica y radiación electromagnética para las propiedades estructurales, así como el entorno estimulante externo para las propiedades mecánicas. Además, las propiedades bioquímicas, como la carga, la hidrofilia y la bioactividad, están determinadas por la composición química de los precursores del hidrogel (1). La figura 1 muestra algunas de las clasificaciones más utilizadas para los hidrogeles, que se pueden emplear como sistemas de liberación de principios activos (2).

En la actualidad, los hidrogeles se han desarrollado para promover procesos de curación natural, evaluar interacciones entre células e interfaces de materiales y servir como vehículos en entornos clínicos. Sin embargo, su vía de administración más comúnmente utilizada ha sido la sistémica, lo que conlleva desventajas como la acumulación del fármaco fuera del objetivo, toxicidad y una rápida eliminación renal y hepática (3). Por lo tanto, para aplicaciones ortodóncicas, un sistema ideal de administración debería ser tópico.

3.1.2 Vías de Administración y Sistemas de Liberación

Cuando se trata de administración tópica, los hidrogeles generalmente liberan el principio activo mediante la degradación de los polímeros que los componen. A pesar de que el hinchamiento es una característica beneficiosa para la liberación, el control de la cinética de liberación puede verse afectado por un exceso de contenido de agua en el medio, lo que a menudo da lugar a una liberación rápida del fármaco, conocida como liberación explosiva (4,5). Sin embargo, la cavidad oral presenta un revestimiento de mucosas compuesto principalmente por

epitelio multicapa cubierto de moco, lo que la convierte en un lugar óptimo para la administración de fármacos (5).

La elección del sitio de administración es crucial al diseñar un sistema de liberación y determina la matriz polimérica apropiada. Esto posibilita la preparación de sistemas implantables, orales, transdérmicos o parenterales. En la figura 2 se ilustran estos sistemas de liberación según su sitio de implantación (6).

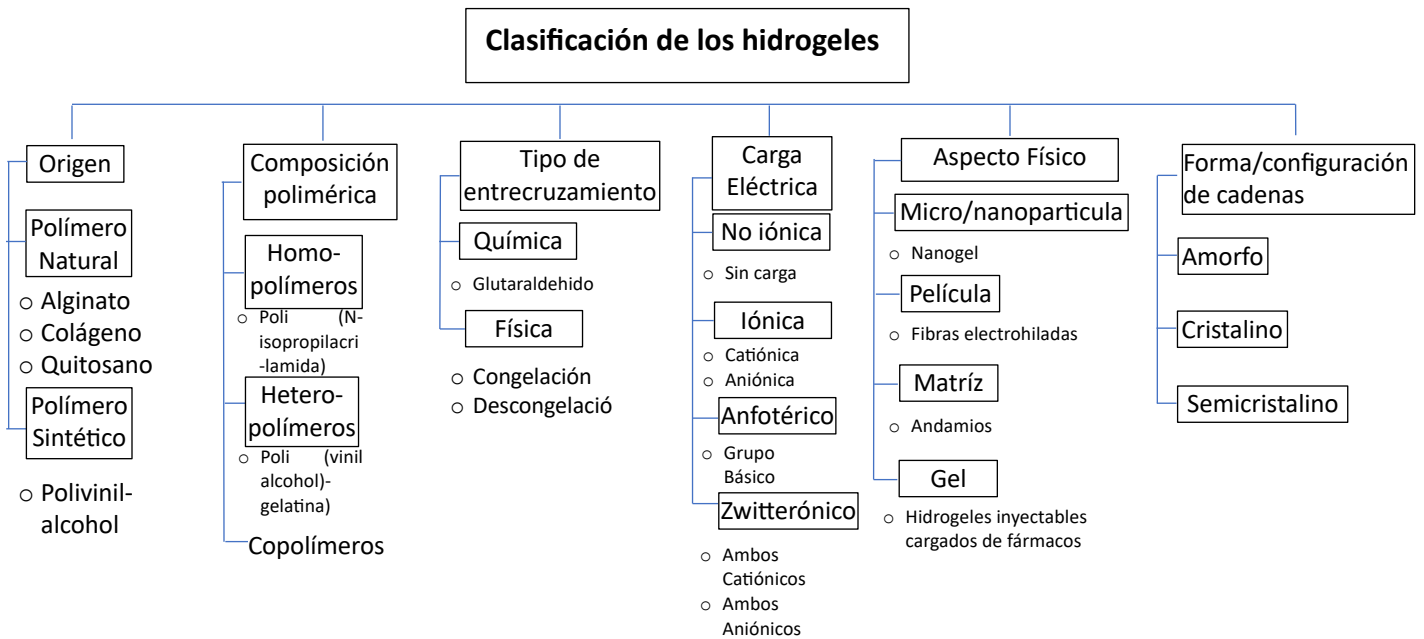


Figura 1. Esquema de la clasificación de los hidrogeles (2)

En el sistema implantable u oral, la liberación del principio activo se produce desde el centro hacia la periferia en todas las direcciones. Este sistema se subdivide en dos tipos: matriz y película. En el sistema de matriz polimérica, el fármaco está embebido en una red tridimensional del polímero y se libera a través de los espacios vacíos de esta red. En las películas, el fármaco se encuentra en un reservorio interno y se libera al atravesar una película limitante (6).

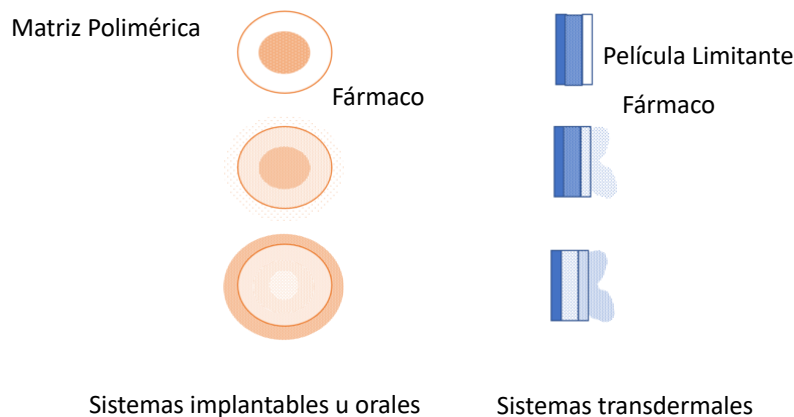


Figura 2. Sistemas de liberación de acuerdo al sitio de implantación (6)

El sistema transdérmico o transdermal se emplea para la liberación a través de la piel. Este sistema consta de una matriz con dos superficies planas opuestas, y la liberación se lleva a cabo exclusivamente a través de la superficie en contacto con la piel, mientras que la otra superficie actúa como una barrera impermeable contra los agentes del entorno externo. A este tipo de liberación también se le conoce como sistema controlado por difusión, ya que el dispositivo entrega el fármaco sin cambiar su tamaño mediante hinchamiento. La elección de las combinaciones de matrices poliméricas y agentes bioactivos permite una difusión controlada del fármaco en el organismo humano sin alterar el polímero (5, 6).

En esta investigación, se ha optado por un tipo de sistema sensible al entorno, que permite diseñar sistemas de liberación controlada que no liberan agentes activos hasta encontrar un ambiente biológico adecuado. El hinchamiento aumenta el volumen acuoso dentro del hidrogel, expandiendo su tamaño tridimensional y permitiendo que el fármaco se difunda hacia el medio externo. Este enfoque es especialmente relevante para el sistema de depósito y matrices (5).

3.1.3 Quitosano

El quitosano es uno de los polímeros más aceptados por el cuerpo humano y se encuentra en abundancia en el exoesqueleto de crustáceos, insectos, artrópodos y en la pared celular de los hongos. Este polímero, biodegradable y biocompatible, no es antigénico ni tóxico y posee propiedades antioxidantes y antimicrobianas (7). Las propiedades fisicoquímicas del quitosano están determinadas por el peso molecular y el grado de N-desacetilación. La N-desacetilación se puede expresar como grado de desacetilación (DDA) o grado de acetilación (DA), y estas características son fundamentales, ya que las propiedades mejoradas del quitosano con respecto a la quitina se deben a la N-desacetilación (8).

Dadas las propiedades excepcionales del quitosano, se han desarrollado desde películas comestibles biodegradables hasta películas bioactivas con propiedades mecánicas sobresalientes, lo que lo convierte en un medio ideal para la liberación de principios activos. Los hidrogeles basados en quitosano se utilizan en diversas aplicaciones biomédicas, ya sea como soporte para mantener, fortalecer o incluso organizar la regeneración tisular, o como matriz y vehículo para la liberación de sustancias bioactivas (9).

3.1.4 L-Arginina

Uno de los materiales bioactivos que ha suscitado un gran interés en el ámbito de la Ortodoncia es la L-Arginina, un aminoácido semiesencial que desempeña múltiples funciones en procesos biológicos. La L-Arginina se encuentra de manera natural en el cuerpo humano y también puede obtenerse a través de la dieta. Su síntesis endógena es posible gracias a que el organismo tiene la capacidad de convertir otro aminoácido llamado L-Glutamato en L-Ornitina

mediante la acción de una enzima denominada ornitina transcarbamilasa. Posteriormente, la L-Ornitina se combina con el carbamoilfosfato en una reacción catalizada por otra enzima, la argininosuccinato sintetasa, dando lugar al argininosuccinato. Por último, el argininosuccinato se descompone en L-Arginina y fumarato gracias a la enzima argininosuccinato liasa (10, 11).

Además de la síntesis endógena, la L-Arginina también puede obtenerse a través de la alimentación. Los alimentos ricos en proteínas, como la carne, el pescado, los lácteos y las legumbres, contienen L-Arginina. Cuando se consumen estos alimentos, el sistema digestivo descompone las proteínas en sus aminoácidos constituyentes, incluyendo la L-Arginina, que posteriormente se absorbe en el torrente sanguíneo (11).

La síntesis de L-Arginina en el cuerpo está regulada por hormonas como la insulina y el glucagón. La insulina estimula la captación de aminoácidos en las células, mientras que el glucagón promueve la liberación de aminoácidos, incluyendo la L-Arginina, desde las células del hígado. La L-Arginina desempeña un papel esencial en diversas funciones corporales, como la síntesis de proteínas, la producción de óxido nítrico (el cual regula la vasodilatación y la presión arterial), y su participación en la función inmunológica y la cicatrización de heridas. Si bien el cuerpo puede producir L-Arginina de manera endógena y también se obtiene de la dieta, se considera un aminoácido no esencial en condiciones normales. Sin embargo, en situaciones particulares, como durante el crecimiento, la recuperación de enfermedades o la realización de ejercicio intenso, la demanda de L-Arginina puede aumentar, y en tales casos, su adquisición a través de la dieta o mediante suplementos puede resultar beneficiosa (12).

La L-Arginina ha demostrado ser prometedora en medicina, especialmente en el abordaje de problemas cardiovasculares en pacientes con disfunción endotelial, debido a su papel como precursor del óxido nítrico (NO). Además, se ha investigado su contribución a la regulación del metabolismo óseo. Su relevancia en el metabolismo óseo radica en varios factores, desde su participación en la formación del colágeno hasta su papel en la cicatrización de fracturas y la producción de óxido nítrico (13).

Las óxido nítrico sintasas (NOS) son enzimas que catalizan la síntesis de NO a partir del residuo de nitrógeno de la L-Arginina en presencia de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) y oxígeno molecular. En mamíferos, se han identificado tres tipos diferentes de NOS, incluyendo la NOS neuronal (nNOS), relacionada con la transducción de señales en neuronas; la NOS endotelial (eNOS), involucrada en la síntesis de óxido nítrico en los vasos sanguíneos; y la NOS inducible (iNOS), cuya expresión se induce en varios tipos de células por señales del sistema inmune. La eNOS es la enzima de mayor expresión en el hueso y juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo óseo, al inhibir la formación y activación de los osteoclastos, lo que contribuye a mantener la densidad mineral ósea y la estructura del esqueleto en condiciones de salud. Esto es particularmente relevante en Ortodoncia, ya que se basa en fuerzas ligeras para mover los dientes, aprovechando los mecanismos fisiológicos para desarrollar y mantener una función oclusal óptima (14-19).

3.1.5 Teorías del Movimiento Dental

Existen diferentes teorías que explican el proceso fisiológico necesario para llevar a cabo el movimiento dental en Ortodoncia. Según la literatura y la experimentación en animales, al aplicar fuerza a un diente en una dirección específica, se crean áreas de tensión y compresión en los tejidos periodontales. A esta teoría se le conoce como la teoría de Presión-Tensión (20-21).

Otra teoría relevante es la Teoría Bifásica del Movimiento Dental Ortodóncico. En esta teoría, los osteoclastos desempeñan un papel crucial en la activación de los osteoblastos. El proceso biológico del movimiento dental en Ortodoncia comprende dos fases separadas en el tiempo pero no específicas de un lugar. Tanto las fuerzas de presión como las de tensión causan daño en el ligamento periodontal, lo que conduce a una fase catabólica que estimula la osteoclastogénesis. Posteriormente, el hueso destruido es reemplazado por la aposición ósea de los osteoblastos, creando una fase anabólica. Esta teoría destaca la importancia de la relación entre las fuerzas ortodóncicas y la remodelación ósea (22).

En la actualidad, existen diversos métodos para acelerar el movimiento dental, desde infiltraciones con prostaglandinas hasta métodos más invasivos, como las corticotomías en las que se realizan cortes en el hueso alveolar o las osteoperforaciones. Como se ha planteado en este estudio, el uso de hidrogeles podría representar un método menos invasivo para acelerar el movimiento dental, con la ventaja de que se puede administrar en el surco gingival o en áreas donde se hayan realizado corticotomías. Por lo tanto, es esencial realizar pruebas de biocompatibilidad, como ensayos de hemólisis y coagulación, para evaluar la compatibilidad sanguínea de las partículas de L-Arginina en estos biomateriales, considerando su posible uso como recubrimiento óseo tras intervenciones ortodóncicas (23).

De acuerdo con un informe reciente de Montero et al., en 2022, existen pruebas de caracterización estandarizadas que son comúnmente empleadas en la investigación relacionada con hidrogeles. Estas pruebas incluyen, pero no se limitan a, la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), que permite la identificación de grupos funcionales y la evaluación de la estructura química. Además, la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se utiliza para explorar la morfología y la estructura a nivel microscópico (24).

Asimismo, se recurre al análisis del tamaño de partículas, que resulta esencial para aplicaciones como la ingeniería de tejidos. El análisis de la capacidad de hinchamiento es fundamental para evaluar la capacidad de absorción de líquidos, un aspecto crítico para la liberación controlada de fármacos. En el caso de aplicaciones que involucran interacción con tejidos o células vivas, se realizan pruebas de citotoxicidad para garantizar la seguridad del hidrogel en un entorno biológico (24).

Una de las pruebas que se realizan a los hidrogeles para evaluar la biocompatibilidad es decir, la capacidad de este para interactuar de manera segura con los tejidos y fluidos biológicos, son las pruebas de hemocompatibilidad que son una parte clave de la evaluación general de la biocompatibilidad del hidrogel, especialmente en aplicaciones bucales, donde la sangre puede entrar en contacto con el material, ya que existe la posibilidad de que entre en contacto con la sangre,

ya sea debido a pequeñas lesiones en los tejidos blandos o como es el posible uso de este hidrogel tras corticotomías o microosteoperforaciones (25).

En resumen, la caracterización de los hidrogeles es un proceso crucial en su desarrollo y aplicación, y la selección de pruebas adecuadas depende del tipo de hidrogel, sus objetivos, el método de síntesis y las propiedades deseadas. Las pruebas de FT-IR, MEB para la ultraestructura, capacidad de hinchamiento, liberación y citotoxicidad son algunas de las técnicas más frecuentemente utilizadas para evaluar y comprender las propiedades y el rendimiento de los hidrogeles en diversas aplicaciones.

3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En estudios previos realizados en ratas, se ha demostrado una relación significativa entre el óxido nítrico (NO) y el movimiento dental ortodóncico. Estos estudios emplearon Inhibidores de la Sintasa del NO (NOS) y observaron una disminución en la velocidad del movimiento dental cuando se utilizaban tales inhibidores (20). Además, investigaciones indican que la inyección de L-Arginina en ratas aumenta los niveles de NO, lo que resulta en una aceleración del movimiento dental (26,27).

Sun et al., en 2022 investigó el efecto de la L-Arginina como precursor de NO en la promoción de la actividad osteogénica durante el movimiento dental ortodóncico en ratones. La L-Arginina se inyectó en los ratones cada dos días desde el día anterior a la aplicación de la fuerza ortodóncica. Los resultados mostraron que la inyección de L-Arginina aumentó los niveles de NO y promovió el movimiento dental ortodóncico en los ratones. Por otro lado, la inyección de un Inhibidor de la Óxido Nítrico Sintetasa (L-NMMA), disminuyó los niveles de NO y redujo el movimiento dental ortodóncico en los ratones. En este estudio, se utilizó L-NMMA para suprimir la producción de NO en ratones durante el movimiento dental ortodóncico y evaluar su efecto en el proceso (16).

Hayashi et al., en 2002 utilizaron N G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor general de la actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS), para examinar el papel del óxido nítrico (NO) en el movimiento dental ortodóncico en ratas. Los resultados indicaron que la administración local de L-NAME redujo significativamente el movimiento dental ortodóncico en ratas, lo que sugiere que el NO es un mediador bioquímico importante en la respuesta del tejido periodontal a la fuerza ortodóncica y que se produce principalmente a través de la actividad de la NOS constitutiva. En este estudio, se encontró que la NOS constitutiva (cNOS) es la isoforma de NOS de mayor importancia en la producción de óxido nítrico (NO) en el movimiento dental ortodóncico en ratas. Se utilizó un inhibidor selectivo de la isoforma inducible de NOS (iNOS), N6-(1-iminoetil)-L-lisina 2HCl (L-NIL), que no tuvo efecto en el movimiento dental ortodóncico en ratas. Además, se sugiere que la NOS endotelial (eNOS) también puede tener un papel importante en la regulación de la producción de NO en el tejido periodontal en respuesta a la fuerza ortodóncica. En conclusión, la cNOS y posiblemente la eNOS son las isoformas de NOS más importantes en la producción de NO en el movimiento dental ortodóncico en ratas (26).

Shirazi et al., en 2002 examinaron el efecto de la L-arginina en el movimiento dental ortodóncico en ratas. Los resultados del estudio mostraron que la administración de L-arginina aumentó significativamente el movimiento dental en las ratas. Además, los análisis de microscopía electrónica de barrido mostraron que la resorción radicular inducida por la fuerza fue menor en el grupo de L-arginina en comparación con el grupo control. En conclusión, la L-arginina parece tener un efecto positivo en el movimiento dental ortodóncico al aumentar la producción de NO y mejorar la remodelación ósea (20).

Akin et al., en 2004 investigaron el efecto de la L-arginina en el movimiento dental ortodóncico en ratas. Se utilizaron dos compuestos relacionados con el NO: N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), que es un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (NOS), y nitro-L-arginina (NLA), que es un precursor del NOS. Se formaron diferentes subgrupos de ratas a las que se les administraron diferentes concentraciones de L-NAME y NLA, así como solución salina como grupo de control. Además, se aplicó una fuerza ortodóncica en un grupo para simular el movimiento dental. Se midieron diferentes parámetros, como la distancia entre los incisivos maxilares y la cantidad de resorción lacunar, osteoclastos y vascularización en las áreas de presión. Los resultados mostraron que la administración de NLA aumentó significativamente el movimiento dental ortodóncico, la resorción lacunar, los osteoclastos y la vascularización en comparación con los grupos de L-NAME y control. Estos hallazgos sugieren que la L-arginina y el NO pueden desempeñar un papel en la aceleración del movimiento dental ortodóncico. En conclusión, este estudio investigó el efecto de la L-arginina en el movimiento dental ortodóncico en ratas y encontró que la administración de NLA aumentó significativamente el movimiento dental (27).

En resumen, estos estudios previos respaldan la importancia del NO como mediador en el movimiento dental ortodóncico, con evidencia de que la administración de L-Arginina, como precursor del NO, puede acelerar este proceso. Sin embargo, no se han encontrado estudios previos que utilicen hidrogeles con L-Arginina para este propósito, en cambio en la literatura existen estudios que han demostrado su efectividad en la promoción de la cicatrización de heridas en piel y mucosas (28-31). Sousa et al., encontraron que un hidrogel con L-Arginina al 10% fue especialmente efectivo en la cicatrización de heridas, mostrando una alta expresión de iNOS y TGF- β , así como una marcada neovascularización. Además, la regulación a la baja de TNF- α , IL-8 y CCR-1, resultados que se pueden utilizar como un indicador indirecto de la posible regulación de estos mismos marcadores durante el movimiento ortodóncico (32-34).

Por otra parte, las pruebas de caracterización realizadas en los hidrogeles son un proceso multifacético que depende de una serie de variables críticas. Estos factores incluyen el tipo de hidrogel en consideración, los objetivos específicos para los cuales se está diseñando el hidrogel, el método de síntesis empleado y las propiedades particulares que se desean lograr en el material resultante.

Cada variante de hidrogel exhibe propiedades y atributos distintivos, lo que implica que las pruebas de caracterización deben ser adaptadas en consecuencia.

Asefi et al., llevaron a cabo un estudio en 2018 con el propósito de evaluar los efectos de la curcumina en la reabsorción radicular durante el movimiento dental ortodóncico en ratas, utilizando hidrogel de quitosano. En este estudio, se realizaron

pruebas de hinchamiento y absorción de agua en los hidrogeles de quitosano y curcumina, con el fin de evaluar su capacidad para liberar fármacos. Además, se midió la tasa de liberación de fármacos de estos hidrogeles durante dos intervalos de tiempo: 24 a 72 horas y 7 a 21 días. Se analizó tanto la explosión inicial como la tasa de liberación a lo largo del tiempo. Para llevar a cabo estas mediciones, se empleó un dispositivo UV-vis Multi-Spec 1501. Los resultados de las pruebas de hinchamiento y absorción de agua revelaron que los hidrogeles de quitosano mostraron un índice de hinchamiento superior en comparación con los hidrogeles de gelatina. Además, los hidrogeles de quitosano alcanzaron la saturación en aproximadamente 3 horas, mientras que los hidrogeles de gelatina lo hicieron en aproximadamente 15 minutos (35).

En lo que respecta a la liberación, se encontró que tanto los hidrogeles de quitosano como los de gelatina con curcumina lograron una liberación más sostenida en comparación con los hidrogeles que no contenían curcumina. Es importante destacar que los hidrogeles de quitosano con curcumina demostraron una liberación más sostenida en comparación con los hidrogeles de gelatina con curcumina. En conjunto, estos resultados sugieren que tanto los hidrogeles de quitosano como los de gelatina pueden resultar efectivos para la liberación sostenida de curcumina (35).

Gong et al., en 2009 llevaron a cabo la síntesis y caracterización de un hidrogel termosensible de polietilenglicol unido por un bloque de policaprolactona, diseñado para lograr una liberación controlada de fármacos. En este estudio, se llevaron a cabo diversas pruebas de caracterización del hidrogel, que abarcaron la evaluación de su degradación tanto *in vitro* como *in vivo*, así como la liberación de fármacos en condiciones *in vitro*. Entre las pruebas realizadas, se incluyó la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR). Los resultados del análisis de FT-IR indicaron que las bandas de absorción a 1528 cm^{-1} se relacionaban con las vibraciones de flexión N-H, lo que confirmó la formación de los copolímeros tribloque PECE. Además, se observó la ausencia de absorción en la región de $2250\text{-}2270\text{ cm}^{-1}$, lo que sugiere que los grupos -NCO del diisocianato de hexametileno habían reaccionado completamente con los grupos -OH. La ausencia de absorción en el rango de $2250\text{-}2270\text{ cm}^{-1}$ indica que la reacción de acoplamiento entre los grupos -NCO y -OH se llevó a cabo de manera efectiva, lo que reviste importancia para la estabilidad y las propiedades de los copolímeros (36).

En el estudio llevado a cabo por Xu et al., en 2015, se desarrolló un hidrogel con el propósito de establecer un sistema de administración de fármacos mucoadhesivo para la liberación oral de principios activos. Este hidrogel se sintetizó a partir de quitosano funcionalizado con catecol y genipina, y su capacidad para adherirse a la mucosa bucal y liberar fármacos de manera controlada fue evaluada minuciosamente. Se realizaron diversas pruebas de caracterización física del hidrogel de quitosano, utilizando un análisis de FT-IR. Además, se llevaron a cabo pruebas de tiempo y esfuerzo para evaluar la integridad estructural de la red del hidrogel. La ultraestructura del hidrogel de quitosano se analizó mediante MEB. Con el MEB se observó que los hidrogeles modificados con catecol presentaban poros de menor tamaño y una estructura más densa en comparación con el hidrogel de quitosano sin modificar. Estos hallazgos adquieren relevancia porque la estructura

del hidrogel puede incidir directamente en su capacidad para adherirse a la mucosa bucal y liberar fármacos de manera controlada (37).

En 2012, Sobczak-Kupiec et al., llevaron a cabo un estudio con el propósito de investigar las propiedades físico-químicas y biológicas de compuestos de hidrogel/gelatina/hidroxiapatita modificados con nanopartículas de plata, y su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos óseos. Este estudio incluyó análisis mediante FT-IR y evaluaciones *in vitro* en un fluido corporal simulado, así como en saliva artificial. Se llevaron a cabo pruebas de pH en agua destilada y saliva artificial para evaluar la estabilidad química de las muestras. Estas pruebas se realizaron midiendo los cambios en el valor de pH durante un período de incubación de 14 días a una temperatura de 37°C, tras sumergir las muestras en saliva artificial y el fluido corporal simulado. En cuanto a los resultados del pH, el estudio se centró en evaluar la estabilidad química de las muestras compuestas en diferentes entornos, incluyendo el agua destilada y la saliva artificial. En el caso del agua destilada, se observó un aumento inicial significativo del pH en las primeras etapas de la prueba de degradación para todos los compuestos, seguido de una disminución constante del pH en la segunda etapa de la prueba. Sin embargo, en relación a la saliva artificial, se notó un aumento del pH en todas las muestras después de 24 h de incubación (38).

En el año 2014, Liu et al. llevaron a cabo un estudio en el que se analizó una mezcla de Alanina y Arginina utilizando la técnica de Cromatografía de Capa Fina (TLC, por sus siglas en inglés) y FT-IR con el fin de separar y detectar cada aminoácido en dicha mezcla. En este estudio, se logró identificar la presencia de L-Arginina mediante la comparación de los espectros FT-IR de las manchas separadas en la placa de TLC con los espectros de referencia de L-Arginina. Los resultados experimentales evidenciaron que la alanina y la L-Arginina pueden separarse con éxito utilizando la placa de TLC de banda estrecha. Además, se constató que los espectros FT-IR de las manchas separadas de Alanina y L-Arginina en la mencionada placa son aproximadamente idénticos a los espectros de referencia de IR de Alanina y L-Arginina (39).

En el año 2011, Cerda-Cristerna et al. llevaron a cabo una evaluación de la hemocompatibilidad de polímeros basados en PDMAEMA (poli dimetilaminoetil metacrilato) con el objetivo de determinar su idoneidad para aplicaciones médicas. Los resultados de las pruebas de hemocompatibilidad de los polímeros basados en PDMAEMA revelaron que estos polímeros tienen un impacto significativo en la coagulación sanguínea, la agregación plaquetaria y la activación del complemento. Asimismo, se observó una hemólisis significativa en algunos de los polímeros evaluados (25).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La duración del tratamiento ortodóncico es un factor importante que afecta la satisfacción del paciente y la eficacia del tratamiento. Se han propuesto diversos métodos para acelerar el movimiento dental, como la irradiación con láser de baja energía, corticotomías o micro osteoperforaciones, campos magnéticos, vibraciones de baja frecuencia y abordajes farmacológicos como la inyección de prostaglandina E2, vitamina D y L-Arginina. La L-Arginina es un aminoácido que se ha demostrado que induce la aceleración del movimiento dental en modelos murinos. Sin embargo, el modelo de administración de L-Arginina mediante inyecciones recurrentes es invasivo y no es adecuado para su uso clínico en humanos. Por lo tanto, se ha propuesto el uso de un hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10% para su uso en ortodoncia con el fin de acelerar el movimiento dental y reducir la duración del tratamiento. Sin embargo, no se ha elaborado y caracterizado un hidrogel que contenga quitosano y L-Arginina, ni se ha determinado su hemocompatibilidad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es realizar las pruebas de caracterización que permitan evaluar si el hidrogel posee las propiedades necesarias para ser aplicado con este objetivo, además de evaluar su hemocompatibilidad mediante el efecto en la coagulación sanguínea por medio de la medición de los Tiempos de Protrombina, Tromboplastina Tisular Activa y Hemólisis.

Debido a esto surge la siguiente pregunta:

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La caracterización y evaluación de hemocompatibilidad de un hidrogel de quitosano demostrarán que es apropiado para la liberación de L-Arginina al 10%?

5. JUSTIFICACIÓN

La Ortodoncia es una rama esencial de la Odontología que se dedica al diagnóstico, prevención y corrección de las anomalías dentofaciales. Uno de los desafíos comunes en esta disciplina es la duración del tratamiento ortodóncico, que a menudo se extiende durante un período considerable. La velocidad del movimiento dental es un factor crítico que influye en la duración del tratamiento ortodóncico y, por lo tanto, en la satisfacción del paciente. En consecuencia, existe un interés continuo en encontrar enfoques que aceleren el proceso de movimiento dental de manera segura y efectiva.

La evidencia científica acumulada ha señalado una relación significativa entre el Óxido Nítrico (NO) y el movimiento dental ortodóncico. La administración de L-Arginina, un aminoácido que actúa como precursor del NO, ha demostrado elevar los niveles de este gas y aumentar la velocidad del movimiento dental en estudios con modelos animales. Además, se ha observado que diferentes isoformas de la

Óxido Nítrico Sintasa (NOS) desempeñan un papel clave en la remodelación ósea durante el proceso de movimiento dental ortodóncico.

A pesar de estas investigaciones prometedoras, se necesita un enfoque práctico y clínicamente aplicable para administrar L-Arginina de manera controlada en pacientes humanos. Los enfoques actuales, como las inyecciones repetidas en áreas específicas, presentan limitaciones en términos de invasividad y comodidad para los pacientes.

Por lo tanto, el uso de hidrogeles y/o matrices de polímeros hidrofílicos, surgen como una opción revolucionaria para liberar L-Arginina de manera controlada. Aunque prometedores, la literatura carece de estudios donde se haya elaborado un hidrogel de quitosano para la liberación de L-Arginina, y además de ello caracterizar sus propiedades físico-químicas y la biocompatibilidad mediante la evaluación del efecto de éste sobre la coagulación sanguínea como lo son las pruebas de hemocompatibilidad. Evaluar la liberación, las características físico-químicas y de hemocompatibilidad mediante la medición de Tiempos de Protrombina, Tromboplastina Tisular Activa y Hemólisis de los hidrogeles de quitosano con L-Arginina al 10% abrirá camino a futuras investigaciones en ortodoncia acelerada y su posible aplicación clínica.

6. HIPÓTESIS

Hi: El hidrogel de quitosano caracterizado y con prueba de hemocompatibilidad permite la liberación de L-Arginina al 10%.

Ho: El hidrogel de quitosano caracterizado y con prueba de hemocompatibilidad no permite la liberación de L-Arginina al 10%.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

- Caracterizar y evaluar la hemocompatibilidad mediante el Tiempo de Protrombina, Tromboplastina Tisular Activa y Hemólisis de un hidrogel de quitosano para liberar L-Arginina al 10%.

7.2 Objetivos Específicos

- Elaborar hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10%.
- Determinar la ultraestructura mediante las imágenes obtenidas de MEB.
- Determinar hinchamiento mediante la técnica de Swelling con saliva artificial.
- Identificar y caracterizar los componentes químicos presentes mediante FT-IR.
- Cualificar liberación de L-Arginina al 10% del hidrogel en saliva artificial por medio de la Cromatografía de Capa Fina mediante la reacción de Ninhidrina.
- Medir Hemocompatibilidad del hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10% mediante el efecto del hidrogel sobre la coagulación sanguínea por medio de la medición del Tiempo de Protrombina, Tromboplastina Tisular Activa y Hemólisis.
- Cuantificar el pH del medio (saliva artificial) y del hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10%, así como el del grupo control con un potenciómetro.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, *in vitro*.

8.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Muestreo de asignación aleatoria simple

Universo:

Grupo	Clave
Hidrogel de Quitosano	Grupo Control
Hidrogel de Quitosano con L-Arginina al 10%	Grupo Positivo

8.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

- **Inclusión:** Hidrogel de quitosano (Control), Hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10%.
- **Exclusión:** Hidrogeles con más de 15 días de elaboración.
- **Eliminación:** Contaminación de los hidrogeles que imposibiliten medir las variables del estudio.

8.4 VARIABLES

TABLA 1. VARIABLES DEL ESTUDIO

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN Y UNIDADES	CATEGORÍA
Hidrogel de quitosano (Control)	Red tridimensional polimérica de cadenas flexibles, con propiedades hidrofílicas, formado a partir de un polisacárido natural llamado quitosano.	Hidrogeles sintetizados con quitosano mediante entrecruzamiento químico con ácido acético.	Cualitativa, dicotómica.	Independiente
Hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10%	Red tridimensional polimérica de cadenas flexibles, con propiedades hidrofílicas, formado a partir de un polisacárido llamado quitosano cargado con L-Arginina al 10%.	Hidrogeles sintetizados con quitosano mediante entrecruzamiento químico con ácido acético con un porcentaje de L-Arginina al 10%.	Cualitativa, dicotómica.	Independiente
pH	Índice numérico que se emplea para expresar el grado de acidez o alcalinidad de una solución.	Se analizará por medio de potenciómetro, donde los valores del pH varían en una escala de 0 hasta 14.	Cuantitativa, razón, ordinal.	Dependiente

Ultraestructura del hidrogel	Organización y disposición a nivel microscópico de los componentes que conforman la matriz del hidrogel.	Identificación de la morfología y ultraestructura de los hidrogeles de la cual se deshidratarán las muestras para poder ser analizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).	Cualitativa, nominal, politómica (presencia de poros, rugosidades, etc.)	Dependiente
Hinchamiento	Fenómeno mediante el cual un hidrogel experimenta un aumento en su volumen como resultado de la absorción de agua o solvente.	Aumento en el volumen de un hidrogel expresado como el porcentaje de cambio en el volumen inicial del hidrogel después de absorber una cantidad conocida de solvente.	Cuantitativa, razón, continua, porcentaje.	Dependiente
FT-IR	Técnica que permite identificar la composición química y la estructura molecular de los hidrogeles, proporcionando detalles sobre los grupos funcionales, interacciones moleculares presentes, así como la evaluación de la homogeneidad de la muestra.	La muestra se expone al espectrómetro FT-IR, que registra los espectros de absorción resultantes para brindar información detallada sobre los enlaces químicos presentes en la muestra, permitiendo así comprender su estructura molecular y sus propiedades.	Cuantitativa, razón, continua, numérica (cm^{-1})	Dependiente
Hemocompatibilidad	Habilidad intrínseca del material para interactuar favorablemente con los componentes sanguíneos cuando se encuentra en contacto con la circulación sanguínea.	Evaluación de la interacción de los componentes del hidrogel con la sangre mediante parámetros medibles como porcentaje de hemólisis y los tiempos de Protrombina y Tromboplastina Tisular Activada.	Cuantitativa, razón, continua, (mg/ml), segundos, porcentajes.	Dependiente
Liberación de L-Arginina al 10%	Proceso mediante el cual se permite que una sustancia activa o un agente terapéutico contenido dentro de un material se libere gradualmente en el entorno biológico.	Evaluación de la presencia o ausencia de L-Arginina contenida en el hidrogel en saliva artificial en diferentes intervalos de tiempo mediante Cromatografía de Capa Fina.	Cualitativa	Dependiente

8.5 CONCORDANCIA Y VIABILIDAD

Se capacitó al investigador por un experto para la elaboración del hidrogel, todas las pruebas se realizaron por triplicado bajo la supervisión del experto en el área. La tesista se estandarizó en el manejo de todas las técnicas: hinchamiento, pH, MEB, FT-IR, liberación por Cromatografía de Capa Fina y hemocompatibilidad. El investigador a cargo y la tesista llevaron a cabo la fase experimental y para determinar la confiabilidad, reproductibilidad y concordancia entre las mediciones se reportó un índice de Kappa superior a 0.8 para variables no numéricas y el índice de correlación intraclase o r^2 de Pearson para variables cuantitativas, se tomaron los valores promedios de cada grupo para cada una de las mediciones. El gold standard fueron las medidas que registró el experto, quien tuvo la mayor experiencia, destreza y habilidad. Los reactivos fueron de grado analítico y medidos con instrumentos de laboratorio exactos, calibrados, y en buen estado. Por la naturaleza del estudio, existió una imposibilidad técnica para cegar al alumno experimentador con respecto a las variables de caracterización y hemocompatibilidad, sin embargo, se cegó al asesor metodológico con respecto a los resultados de las variables dependientes para realizar el análisis estadístico.

8.6 UBICACIÓN ESPACIOTEMPORAL

Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITCo)
Laboratorio Multidisciplinario FEBUAP
Centro Avanzado de Pruebas Análíticas no Destructivas BUAP
Laboratorio de Biomateriales FEBUAP
Laboratorio de Microbiología Oral FEBUAP
Laboratorio de Biomateriales UV

9. PROCEDIMIENTO, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN

9.1 ELABORACIÓN DEL HIDROGEL

No existe literatura que reporte la elaboración de un hidrogel en ortodoncia acelerada con el uso de quitosano y L-Arginina, por lo tanto, tampoco se ha reportado la fiabilidad de los hidrogeles con este fin, con base en ello, se decidió realizar una modificación de la preparación de hidrogeles de quitosano de acuerdo al método descrito por Sámano-Valencia et al., debido a que es una preparación simple cuyo polimerizante es el ácido acético a diferencia de otro tipo de elaboraciones más complejas donde se utiliza radiación UV, temperatura u otros agentes químicos que podrían no ser compatibles con el objetivo propuesto en este trabajo (40). Se adicionó Hidróxido de Sodio para ajustar el pH del hidrogel tal y como lo ha reportado Asefi et al. (35).

Para la obtención del hidrogel del grupo positivo es decir el hidrogel con carga de L-Arginina al 10% se realiza el siguiente procedimiento:

1. En la balanza analítica se pesaron todos los reactivos y se reservaron.
2. Se solubilizó 1.223 g de L-Arginina (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA) en 10 ml de agua destilada a 25 °C mediante agitación a 270-275 rpm por medio de un agitador de hélice (IKA® RW 20 digital, Wilmington, NC, USA).
3. Una vez integrada la L-Arginina, se agregó 0.5 g de Quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA).
4. Se agregó 0.5 ml de ácido acético glacial al 100% (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA) durante la agitación mediante goteo.
5. Se añadió 1.3 ml de Hidróxido de Sodio al 1N (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA) mediante goteo para obtener un pH de 6.8, manteniéndose en agitación durante 5 minutos.
6. Se conservó a temperatura ambiente en un tubo falcón estéril de 15 ml.

Para la obtención del hidrogel del grupo control es decir el hidrogel que no contiene carga de L-Arginina, se realizó el siguiente procedimiento:

1. En la balanza analítica se pesaron todos los reactivos y se reservaron.
2. Se solubiliza 0.5 g de Quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA) con 10 ml de agua destilada a 25 °C mediante agitación a 270-275 rpm por medio de un agitador de hélice (IKA® RW 20 digital, Wilmington, NC, USA).
3. Se agregó 0.5 ml de ácido acético glacial al 100% (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA) durante la agitación mediante goteo.
4. Se añadió 1.3 ml de Hidróxido de Sodio al 1N (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA) mediante goteo para obtener un pH de 6.8, manteniéndose en agitación durante 5 minutos.
5. Se conservó a temperatura ambiente en un tubo falcón estéril de 15 ml.

El procedimiento para la obtención de los hidrogeles se representa en la figura 3.

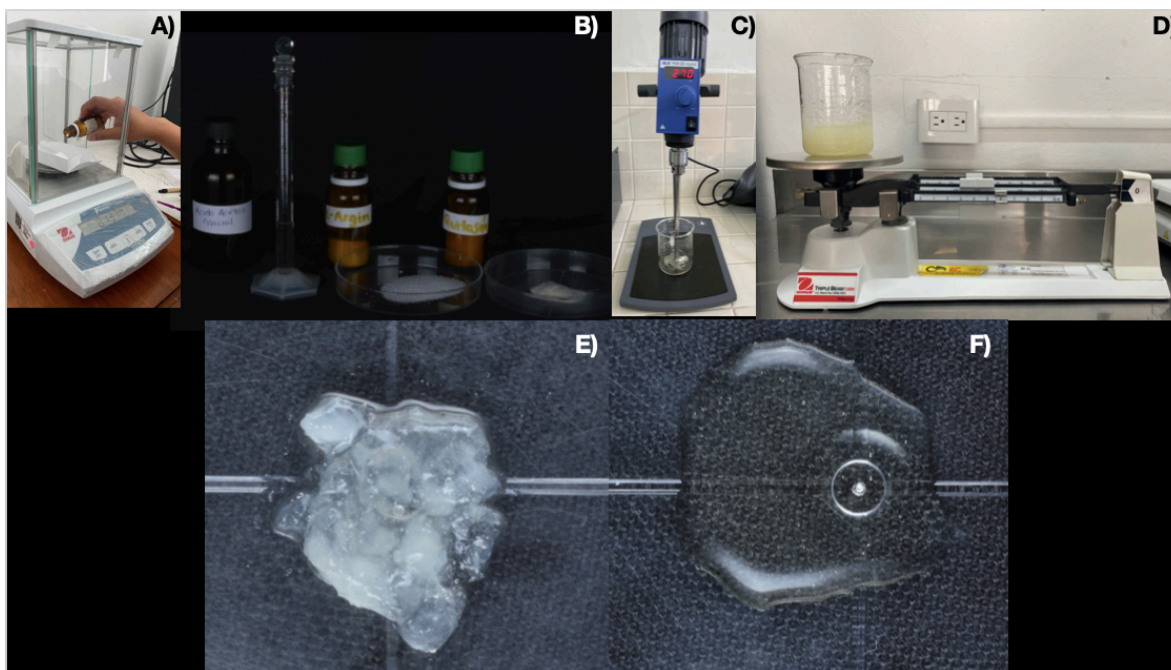


Figura 3. Esquema de pasos a realizar para el procedimiento de obtención de hidrogelos de grupo positivo y control.

A) Peso de reactivos en balanza analítica. B) Reactivos pesados. C) Se mezclaron los reactivos con agua destilada mediante agitación de hélice y se añadió por medio de goteo ácido acético glacial y el hidróxido de sodio al 1N. D) Se obtuvo una mezcla homogénea. E) Hidrogel grupo positivo. F) Hidrogel grupo control.

Fuente propia.

9.2 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES Y PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN

9.2.1 pH

Durante la liberación de la L-Arginina se tomó el pH de la saliva artificial donde se encontraba inmerso el hidrogel en diferentes intervalos de tiempo. Se sumergió 0.5 g de hidrogel de cada grupo en 10 ml de saliva artificial (VIARDEN®, Mission, TX, USA) y se colocó en agitación oscilatoria a 80 rpm a una temperatura constante de 37°C para semejar el ambiente de la cavidad oral. Se tomaron muestras de la saliva artificial del medio del hidrogel del grupo positivo así como del grupo control, se midió el pH de la saliva artificial al poner el electrodo del medidor en contacto con la saliva artificial, se estandarizó previamente el potenciómetro, así como, se registró en el equipo la temperatura en la que la solución se mediría es decir, 37 °C (35).

Se hicieron mediciones al contacto, a los 30, 60 minutos y a las 8 horas en muestras por triplicado de cada grupo, Figura 4.

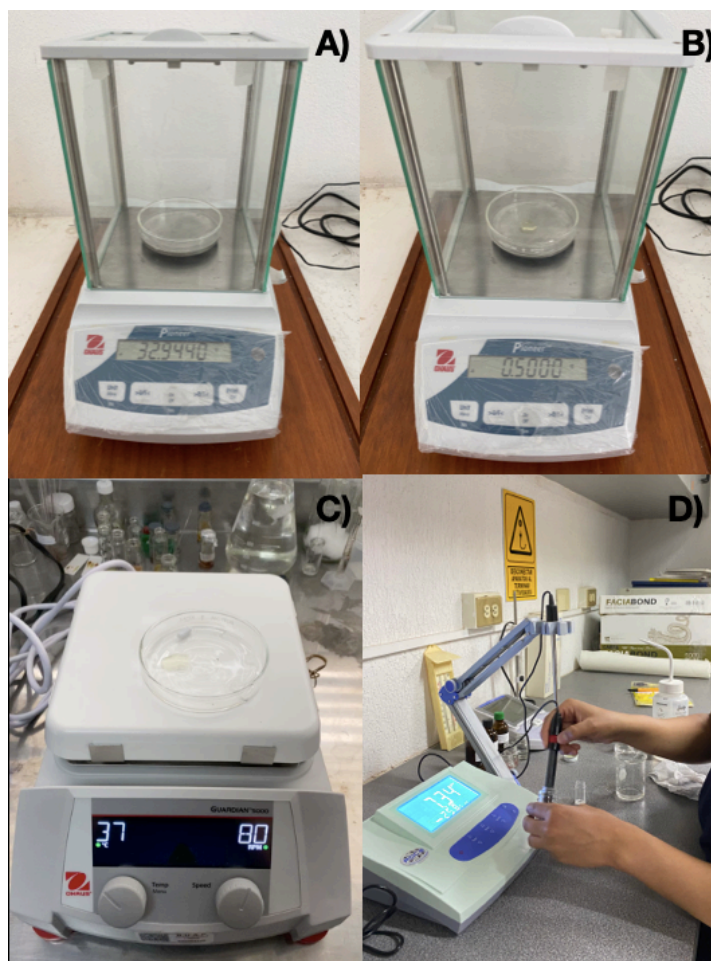


Figura 4. Procedimiento para la toma de pH de grupo positivo y control.

- A) Pesado de la caja petri con la saliva artificial en balanza analítica.
- B) Se agregaron 0.5 g de hidrogel de cada grupo respectivamente.
- C) Colocación de la caja petri con la saliva artificial y el hidrogel de cada grupo respectivamente, a 37 °C, al cual se le añadió una barra magnética en una agitación oscilatoria de 80 rpm para semejar el ambiente de la cavidad oral.
- D) Medición del pH, se sumergió el electrodo del potenciómetro y se espero unos segundos hasta obtener un valor estable.

Fuente propia.

9.2.2 ULTRAESTRUCTURA DEL HIDROGEL

Se prepararon las muestras de cada grupo de hidrogel por triplicado para poder ser observadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), de la siguiente manera, se deshidrató con ethanol absoluto $\geq 99.8\%$ (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 0.5 g de hidrogel en una caja petri (41).

Se montaron los discos de hidrogel obtenidos a partir de la deshidratación en una barra semirígida para poder observar de forma transversal cada disco de hidrogel, se procedio a recubrirlas con oro con una evaporadora (DENTON

VACCUM DESK V ®, Moorestown, NJ, USA) por 1 minuto de recubrimiento a 25 miliamperios (MAMPS), Figura 5.

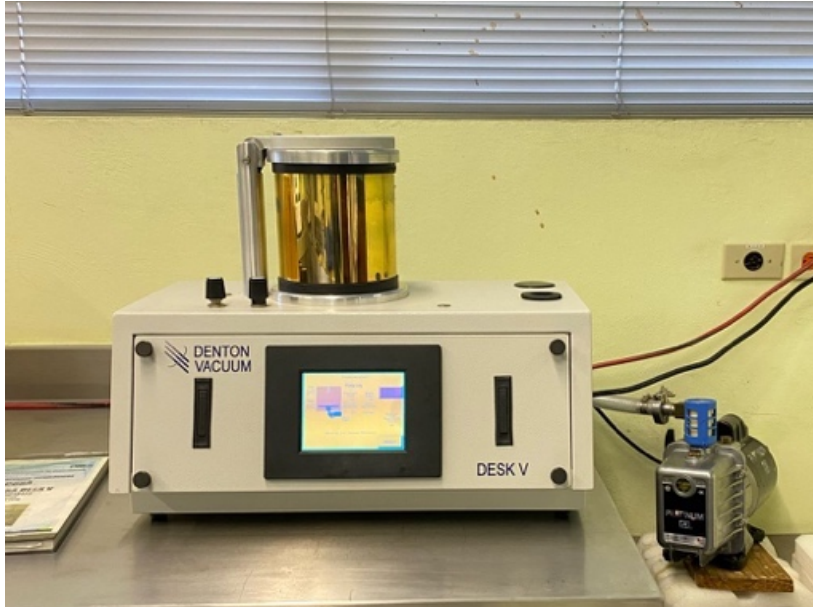


Figura 5. Muestras en proceso de recubrimiento de oro.
Fuente propia.

Los discos del hidrogel del grupo control y grupo positivo fueron analizados mediante Microscopio Electrónico de Barrido (JSM-5800LV, JEOL ®, Tokio, Japón), en un voltaje de aceleración de 20 kV, se tomaron las microfotografías a x1500 y x3000 para poder observar la ultraestructura con sus diferentes características como superficie rugosa, lisa o uniforme, Figura 6 (38).



Figura 6. Microscopio electrónico de barrido (JSM-5800LV, JEOL, Tokio, Japón)
Fuente propia.

9.2.3 HINCHAMIENTO O CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA

Para determinar el hinchamiento o Swelling, se utilizó el método descrito por Asefi et al., (35) es decir, comparar el hidrogel antes y después de ser sumergidos en saliva artificial. Primero se determinó el peso inicial de las muestras de 0.5 g de hidrogel de L-Arginina al 10% (grupo positivo) con ayuda de cajas petri en una balanza analítica (OHAUS® PR124, Ciudad de México, MX) por triplicado, así como del grupo control (hidrogel de quitosano sin carga positiva), Figura 7. Posteriormente, dichas muestras fueron inmersas en 10 ml de saliva artificial (VIARDEN®, Mission, TX, USA) a una temperatura constante de 37°C en una cámara de secado (BINDER®, Tuttlingen, DE) para imitar las condiciones térmicas de la cavidad oral. Para determinar el peso del hidrogel hinchado se retiraron las muestras de la saliva artificial en tiempos determinados (contacto al minuto cero, 5, 10, 30, 60 minutos) y la saliva artificial de la superficie se secó con papel filtro para nuevamente ser pesadas con la balanza analítica hasta conseguir un peso constante y después se regresaron al contenedor con saliva artificial del que fueron retiradas. El hinchamiento de las muestras se evaluó mediante la modificación de su peso, aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Relación de Hinchamiento H (\%)} = \frac{W - W_0 (100)}{W_0}$$

Donde H es el porcentaje de líquido absorbido por el hidrogel, W es el peso del hidrogel húmedo a diferentes tiempos y W_0 el peso del hidrogel inicial, antes de ser sumergido en la saliva artificial (35).

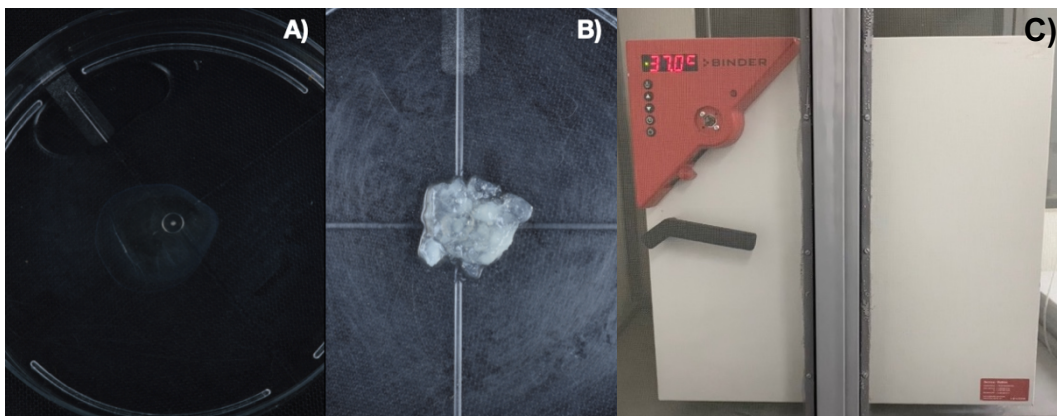


Figura 7. Muestras de hidrogel en caja petri previo a la prueba de hinchamiento.

- A) Muestra de hidrogel del grupo control con saliva artificial.
- B) Muestra de hidrogel del grupo positivo con saliva artificial.
- C) Muestras en cámara de secado a 37 °C.

Fuente propia.

9.2.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADAS DE FOURIER.

Se realizó el análisis estructural mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier para detectar las interacciones entre el quitosano y L-Arginina, así como sus posibles cambios estructurales. Las pruebas fueron realizadas a cabo en la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento de la BUAP, donde se analizaron en el Espectroscopio de Rayos Infrarrojos (Vertex 70 Optics-Bruker ©, Billerica, MA, USA) para observar el espectro de cada hidrogel. La representación del aparato utilizado se puede observar en la figura 8.

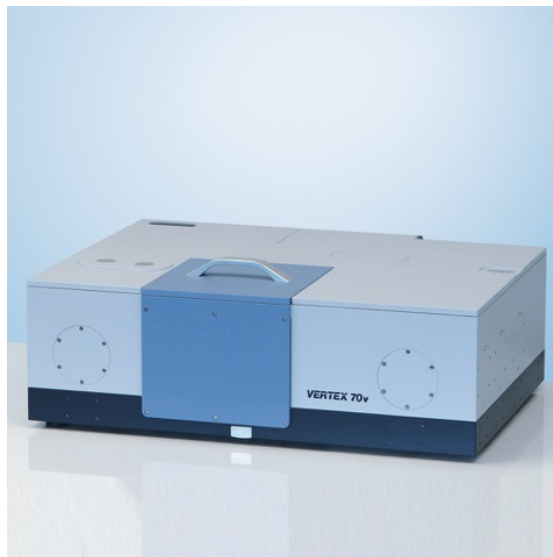


Figura 8. Ejemplo de un espectrófotometro FT-IR (Vertex 70 Optics-Bruker ©, Billerica, MA, USA) .
(42)

Se examinaron tres muestras de cada grupo, es decir, del grupo positivo y del grupo control y se graficó un espectro por cada una. El espectro de cada muestra fue medido en -1 en el rango de número de onda $660-3500\text{ cm}^{-1}$ a una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C), y se identificaron los espectros de las bandas de absorción de los grupos funcionales de cada componente (36, 43).

9.2.5 HEMOCOMPATIBILIDAD

El protocolo para evaluar el efecto del hidrogel de quitosano con L-Arginina al 10%, así como el del grupo control, se llevó a cabo siguiendo las pautas reportadas por Cerda-Cristerna et al., (25) basadas en los documentos del Estándar de Práctica para la evaluación de propiedades hemolíticas de materiales (Designación: F 756-00), adaptadas por el Centro de Investigación en Ingeniería Biomédica (CEIB) de la última versión, (16/11/2010) (44). Se obtuvo una muestra de sangre fresca de un adulto sano, equivalente a 25 ml, la cual fue recolectada en

un tubo con 3.5 ml de citrato (Vacutest Kima ® Buffered Sodium Citrate Tubes, Arzergrande, PD, Italia).

El consentimiento informado para la obtención de la muestra de sangre se encuentra detallado en el apartado de Anexos 1. Una vez obtenida la muestra de sangre, se procedió a colocarla en tubos falcón, tal como se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Recolección de sangre de adulto humano.

Se colocaron las muestras de sangre en tubos falcón para ser reservadas.
Fuente propia.

Se incubarán 600 μ l de sangre con 50 mg de muestra de cada grupo; control y positivo por triplicado, durante 15 minutos en agitación oscilatoria a 100 rpm a 37 °C (MaxQ 4450, Thermo Scientific ®, Waltham, MA, USA), Figura 10.

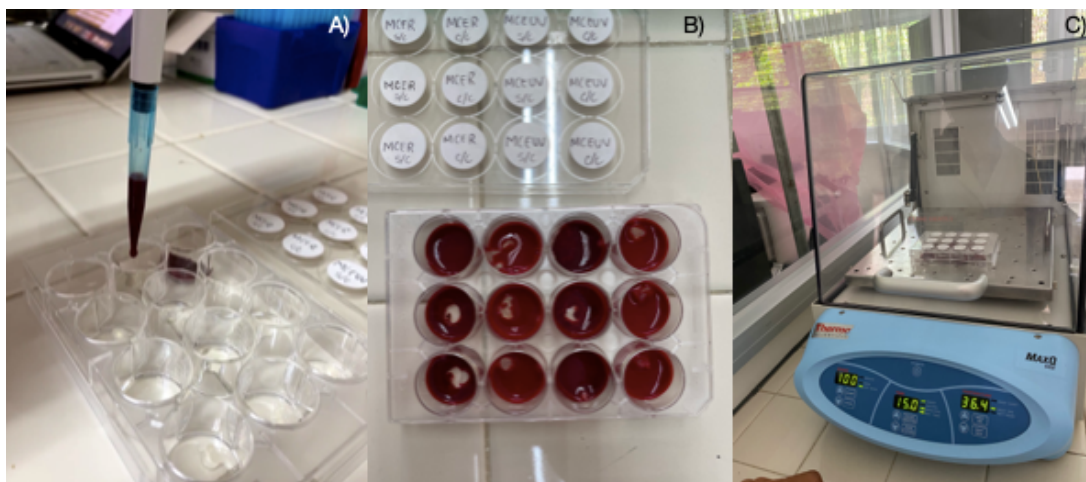


Figura 10. Homogeneización de la muestra de sangre con los hidrogel de cada grupo.

- A) Colocación de 600 μ l de sangre en la caja multipocillos.
- B) Incubación de de sangre con la muestra de hidrogel.
- C) Agitación oscilatoria de la sangre con el hidrogel.

Fuente propia.

Después se llevaron las muestras a la centrífuga (FORCE Mini®, Australia) durante 5 minutos para obtener el plasma por medio de tubos de ensayo para centrifuga de 1.5 ml, el cual fue utilizado para la medición de cada una de las pruebas de este apartado Figura 11 (25).

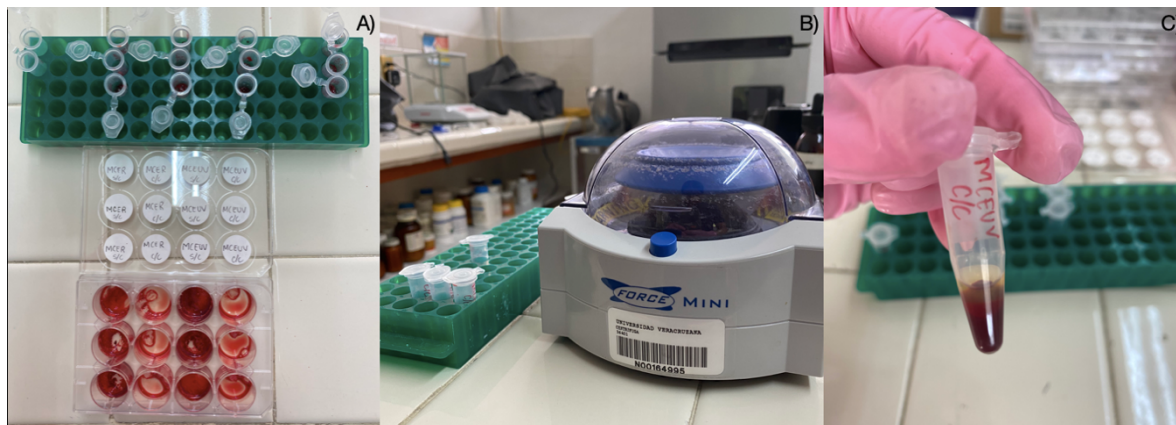


Figura 11. Obtención del plasma.

- A) Se traslada la sangre post-homogeneización de cada grupo a tubos de ensayo de 1.5 ml.
 - B) Centrifugación de las muestras de sangre.
 - C) Obtención del plasma.
- Fuente propia.

Prueba de hemólisis: Se agregaron 225 μ l de solución de Drabkin (Ferricianuro de potasio, cianuro de potasio, dihidrógeno de potasio), (45) y se mezclaron con 25 μ l de plasma en una multiplaca de 96 pozos para cada grupo y por triplicado, se procedió a obtener la lectura de la absorbancia de la hemoglobina a 540 nm con un Multiskan FC (ThermoFisher®, Waltham, MA, USA), se obtuvo una curva de calibración, así como los respectivos porcentajes de hemólisis por cada muestra Figura 12, (25).



Figura 12. Prueba de hemólisis.

- A) Depósito de la solución de Drabkin y plasma en la multiplaca.
 - B) Multiskan FC (ThermoFisher®, Waltham, MA, USA).
 - C) Obtención de la curva de calibración con los porcentajes de hemólisis.
- Fuente propia.

Prueba de Tiempo de Protrombina: Se realizó con el equipo Biobas 10 (SPINREACT®, Girona, España), para la medición de tiempos de coagulación con el principio óptico de turbidensimetría, se ingresaron 50 µl de plasma del grupo control así como del grupo positivo, cada uno en una cubeta individual, posteriormente se colocó el reactivo PT (Tromboplastina de cerebro de conejo, cloruro cálcico, inhibidor de heparina, tampón y conservantes, liofilizado), (46) respectivo para la prueba PT y se tapó la cubeta, obteniendo el resultado del Tiempo de Protrombina en segundos, se registraron esos valores para cada muestra de los grupos por triplicado Figura 13, (25).

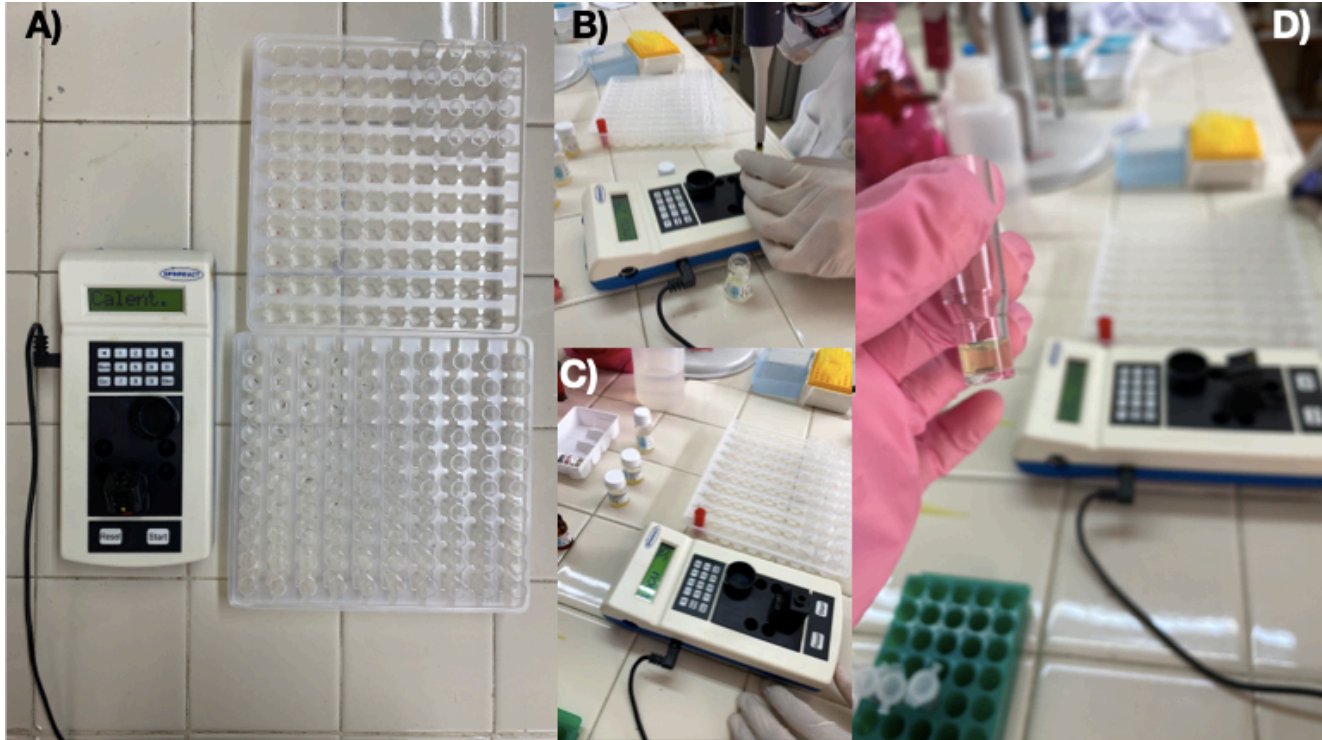


Figura 13. Prueba de tiempo de Protrombina.

- A) Biobas 10 (SPINREACT®, Girona, España), y cubetas individuales para cada una de las muestras.
- B) Ingreso de la cubeta con el plasma al equipo BIOBAS 10 (SPINREACT®, Girona, España).
- C) Incubación de la muestra con el respectivo reactivo.
- D) Obtención del resultado.

Fuente propia.

Prueba del Tiempo de Tromboplastina Tisular Activada: Se realizó con el equipo Biobas 10 (SPINREACT®, Girona, España), se ingresaron 50 µl de plasma de cada grupo experimental en la cubeta, con 100 µl de Reactivo 1 Activador (ácido elágico, tampón y conservantes) y después de 5 minutos, se colocó el Reactivo 2 Iniciador (cloruro cálcico (CaCl_2) 0.02 M) (47). Posteriormente, se obtuvo el resultado del Tiempo de Tromboplastina Tisular Activada en segundos, se registraron esos valores para cada muestra de los grupos por triplicado Figura 14, (25).

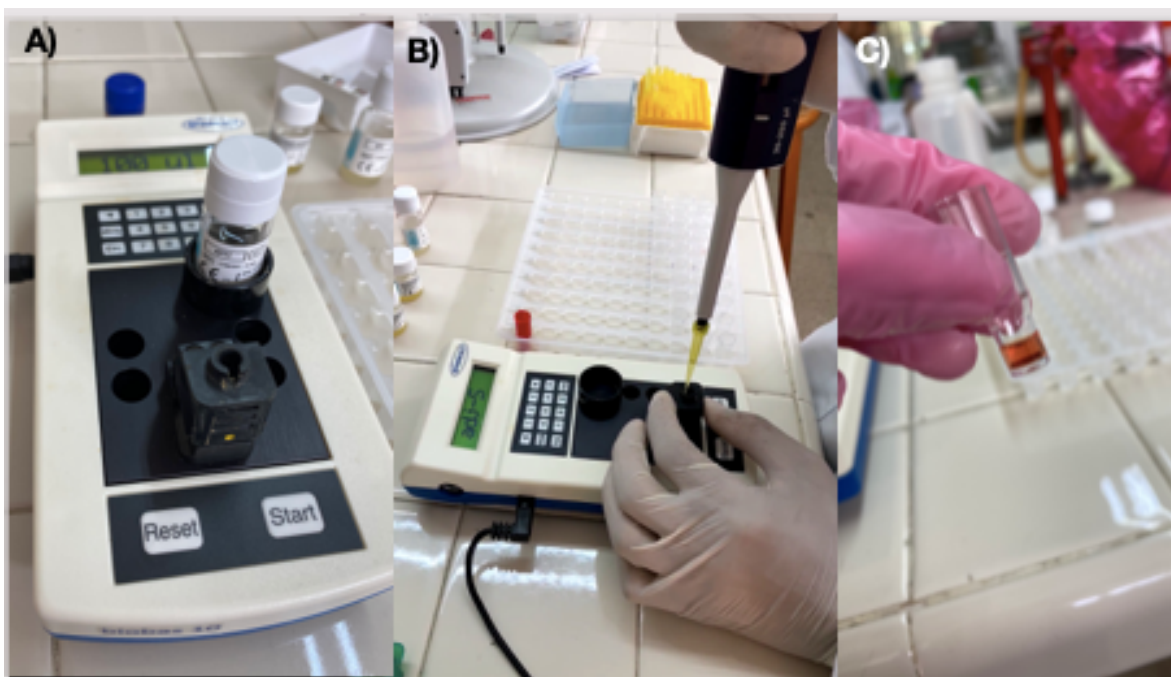


Figura 14. Prueba del Tiempo de Tromboplastina Tisular Activada.

- A) Colocación del reactivo R1 al plasma en el equipo BIOBAS 10 (SPINREACT®, Girona, España).
 B) Posterior a los 5 minutos de espera se introdujo el reactivo R2 a la cubeta.
 C) Obtención del resultado.
 Fuente propia.

9.2.6. LIBERACIÓN

9.2.6.1 Cromatografía de Capa Fina

Se evaluó la liberación de la L-Arginina en saliva artificial a través del hidrogel a una temperatura constante de 37°C a los 0, 15, 30, 60 minutos y a las 8 horas, utilizando el método descrito por Liu et al., es decir, por medio de la prueba de Cromatografía de Capa Fina (39), a la cual se le aplicó una solución de reacción de Ninhidrina tal como lo reporta Sinhababu et al., con el fin de evaluar cualitativamente la liberación de L-Arginina (48).

Para llevar a cabo la prueba de Cromatografía de Capa Fina, se empleó una fase estacionaria de placa de aluminio de Silica Gel Matrix 60, con un grosor de 200 µm de 2.5 cms x 7.5 cms, con una partícula de tamaño de 10-12 µm con un poro medio de 60 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), a la cual se le realizaron cortes en forma de bisel en la parte inferior (parte activa) tal como se muestra en la Figura 15 y 16.

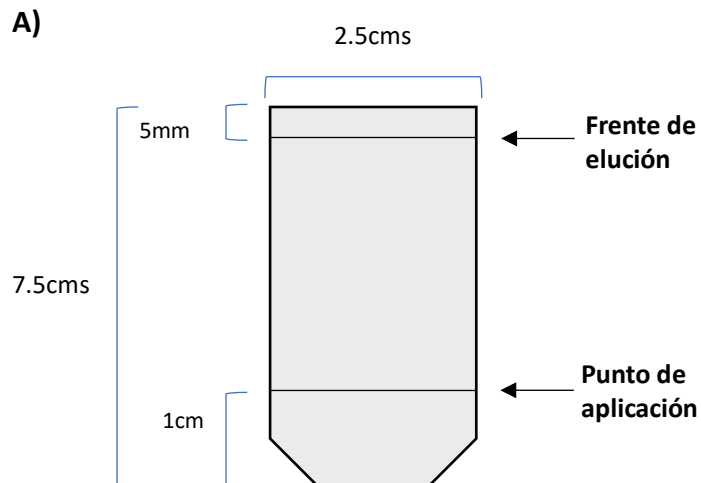


Figura 15. Esquema del diseño de placas de Sílice Gel.

A) Esquema previo a realizar los cortes y marcaje en la placa de Sílice Gel.

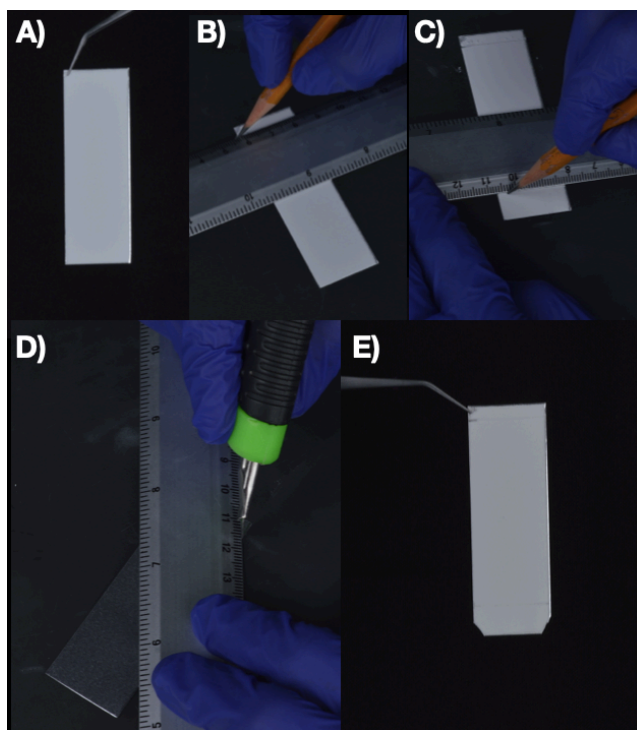


Figura 16. Diseño de las placas de Sílice Gel.

A) Placa de Sílice Gel (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA), sin preparación.

B) Marcaje con lápiz del frente de elución a 5 mm del borde superior.

C) Marcaje con lápiz de punto de aplicación a 10 mm del borde inferior.

D) Corte biselado de 5 mm del borde inferior.

E) Placa de Sílice Gel (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA), con los marcajes y biselados.

Fuente propia.

A continuación, se preparó la solución respectiva a la fase móvil en un frasco de vidrio con tapa hermética para poder obtener un sellado completo y evitar que se volatilice el ethanol absoluto $\geq 99.8\%$ (Sigma Aldrich ®, St. Louis, MO, USA), la composición de la fase móvil es ethanol absoluto: agua destilada en una proporción 1:2, además se forro de papel aluminio el frasco hermético con el objetivo de que no se afectara por la luz la placa de sílice gel como se muestra en la Figura 17 y 18.

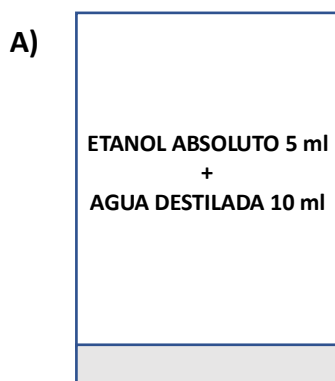


Figura 17. Esquema de la solución de la fase móvil.

A) Esquema previo con la proporción y medida de las soluciones.

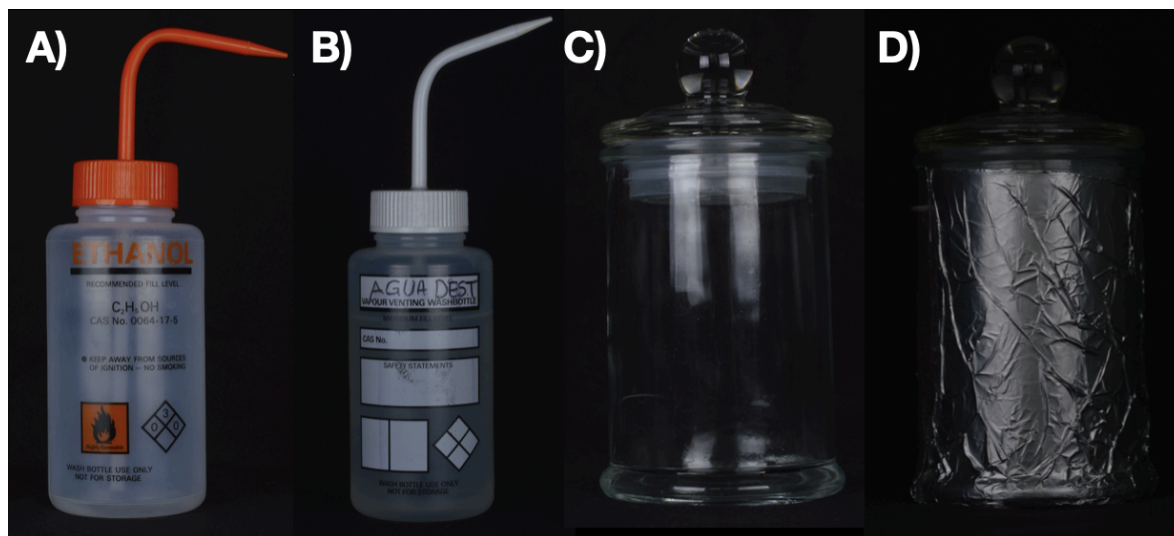


Figura 18. Soluciones y Preparación de Fase Móvil.

A) Ethanol absoluto $\geq 99.8\%$ (Sigma Aldrich ®, St. Louis, MO, USA).

B) Agua destilada.

C) Frasco hermético.

D) Frasco hermético cubierto de papel aluminio.

Fuente propia.

Posteriormente se preparó la solución de Ninhidrina (Trioxohydrindene monohydrate, Sigma Aldrich ®, St. Louis, MO, USA) para poder realizar la reacción

reveladora, la cual esta compuesta por Ethanol absoluto y Ninhidrina, la Figura 19 representa la proporción de dicha solución.

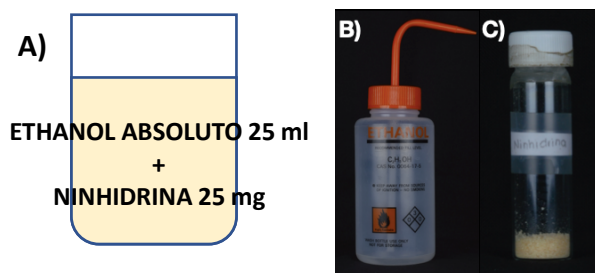


Figura 19. Esquema de la solución reveladora.

- A) Esquema de la proporción de las soluciones.
B) Ethanol absoluto $\geq 99.8\%$ (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA).
C) Ninhidrina (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA).

Fuente propia.

Se procedió a colocar 5 ml de saliva artificial (VIARDEN®, Mission, TX, USA) en un vaso de precipitado estéril con 1 g de hidrogel de grupo positivo y otro vaso de precipitado con la misma cantidad de saliva artificial e hidrogel de grupo control, ambos frascos se colocaron en una parrilla eléctrica (StableTemp®, Vernon Hills, IL, USA) a 37°C para simular la temperatura de la cavidad oral.

En frascos estériles se colocaron alícuotas de 1 ml de saliva artificial (VIARDEN®, Mission, TX, USA) del contacto con el hidrogel de cada grupo en diferentes intervalos de tiempo, lo cual esta representado en la Figura 20.



Figura 20. Esquema de las alícuotas de la saliva artificial tras el contacto con los hidrogeles.

- A) Cada frasco contiene 1 ml de saliva artificial (VIARDEN®, Mission, TX, USA) tras el contacto con cada hidrogel respectivamente en diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60 minutos y 8 horas).

Fuente propia.

Por medio de un capilar de cristal se tomaron 300 μ l de cada alícuota para colocarlos en la placa de Sílice Gel (Sigma Aldrich ®, St. Louis, MO, USA), previamente preparada, Figura 16, el punto de aplicación fue en el centro de la línea de referencia, cada aplicación se hizo por triplicado, tal como se representa en la Figura 21.

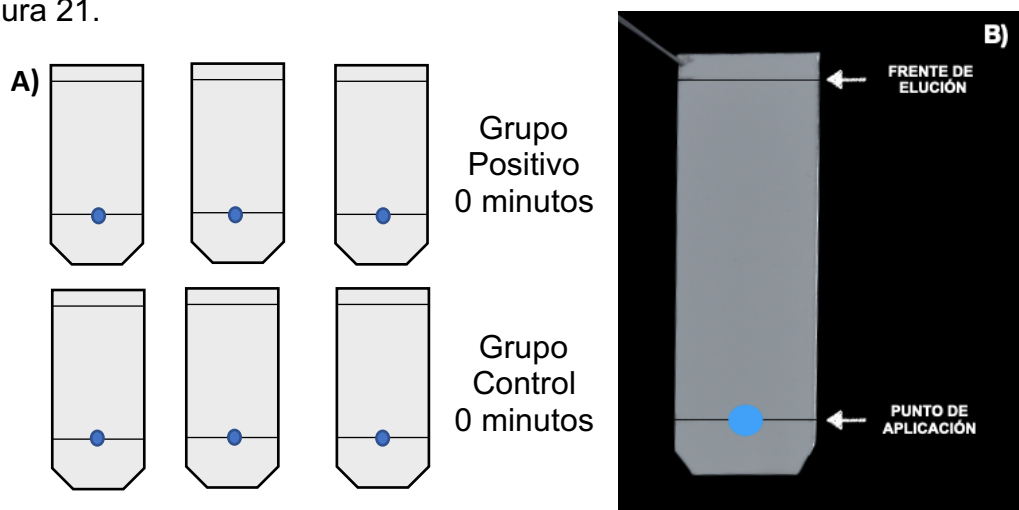


Figura 21. Esquema de la aplicación de la muestra en la placa cromatográfica.

A) Esquema previo a realizar el muestreo.

B) Marcaje sobre la placa cromatográfica.

Fuente propia.

Se corrió la muestra de la placa de sílice gel en el frasco de la fase móvil, esta placa se colocó de forma vertical evitando que se doblara para que al penetrar la fase móvil en la placa fuera uniforme, Figura 22.

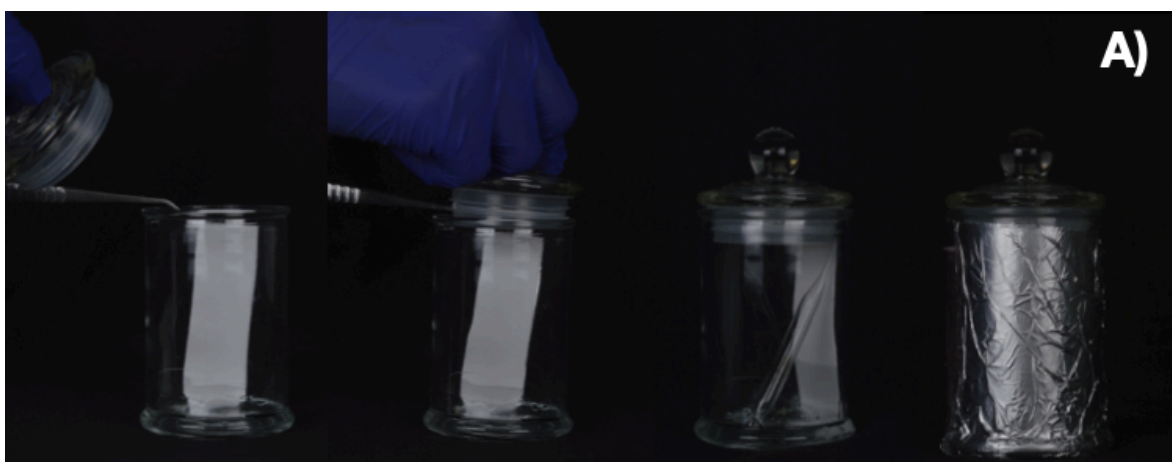


Figura 22. Representación de la cromatografía en la fase móvil.

A) Proceso de cómo se colocó la placa cromatográfica en el frasco hermético con la fase móvil, el cual se descubrió para poder observar la verticalidad de la placa en la fase móvil.

Fuente propia.

Las placas cromatográficas fueron reveladas utilizando una pinza con algodón estéril impregnado con la solución reveladora (Ninhidrina). Posteriormente, se colocaron sobre una parrilla de calor a una temperatura de 40°C para activar la reacción cromatográfica, como se muestra en la Figura 23.

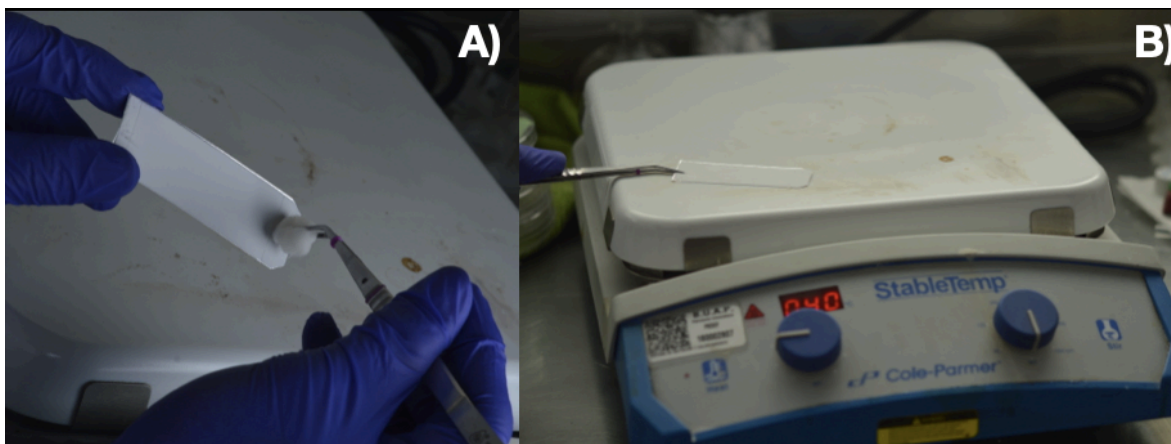


Figura 23. Fase reveladora.

- A) Se aplicó la solución reveladora con un algodón estéril del borde inferior del punto de aplicación hacia el frente de elución de forma uniforme.
- B) Secado y revelado de la prueba de cromatografía con calor mediante la parrilla eléctrica (StableTemp®, Vernon Hills, IL, USA).

Fuente propia.

Como grupos controles positivos en la liberación de L-Arginina por el hidrogel en la saliva artificial, se procedió a revelar dos estándares de la siguiente manera, se realizaron dos soluciones de L-Arginina (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA), en diferente solvente, con agua destilada y saliva artificial (VIARDEN®, Mission, TX, USA) al 10%, a las cuales se aplicó el mismo procedimiento de la prueba de Cromatografía de Capa Fina, utilizado para las muestras de grupo positivo y grupo control, las soluciones se representan en la Figura 24.

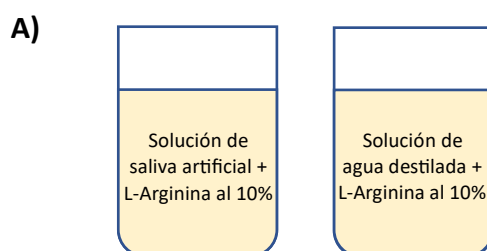


Figura 24. Esquema de soluciones de L-Arginina al 10%.

- A) Se realizaron dos soluciones de L-Arginina (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA), con agua destilada y saliva artificial (VIARDEN®, Mission, TX, USA) 10%.

Fuente propia.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Por la naturaleza del estudio, se aplicó estadística descriptiva, para variables cualitativas se utilizaron porcentajes y gráficos correspondientes y para variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central, de dispersión y de forma, para identificar diferencias entre los promedios de las mediciones, se utilizó la ANOVA de medidas repetidas, todas estas pruebas con sus respectivas significancias estadísticas, esto es $p > 0.05$. El resumen del análisis estadístico empleado se puede observar en la Tabla 2.

TABLA 2. PRUEBAS ESTADÍSTICAS A UTILIZAR

Pruebas	Análisis estadístico
pH	Estadística descriptiva
Ultraestructura	Estadística descriptiva
Hinchamiento	Estadística descriptiva
FT-IR	Estadística descriptiva
Liberación	Estadística descriptiva
Hemocompatibilidad	Estadística inferencial

11. RESULTADOS

11.1 pH

Se evaluó el pH del hidrogel, de la saliva artificial al minuto cero de embeber el hidrogel, a los 30, 60 minutos y 8 horas (grupo control y grupo positivo). Los resultados se expresaron como la media y fueron obtenidos a partir de un experimento realizado por triplicado, los cuales se pueden observar en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Promedio de la medición de pH del experimento por triplicado del hidrogel del grupo positivo.

INTERVALO	pH
Hidrogel antes de contacto con saliva	6.8
Contacto con saliva	7.07
30 minutos	7.15
60 minutos	7.01
8 horas	6.84

Tabla 4. Promedio de la medición de pH del experimento por triplicado del hidrogel del grupo control.

INTERVALO	pH
Hidrogel antes de contacto con saliva	6.8
Contacto con saliva	7.15
30 minutos	6.89
60 minutos	6.12
8 horas	5.52

11.2 ULTRAESTRUCTURA

Las Figura 25 y 26 muestra microfotografías obtenidas a partir del Microscopio Electrónico de Barrido de los hidrogeles de los grupos positivo y control.

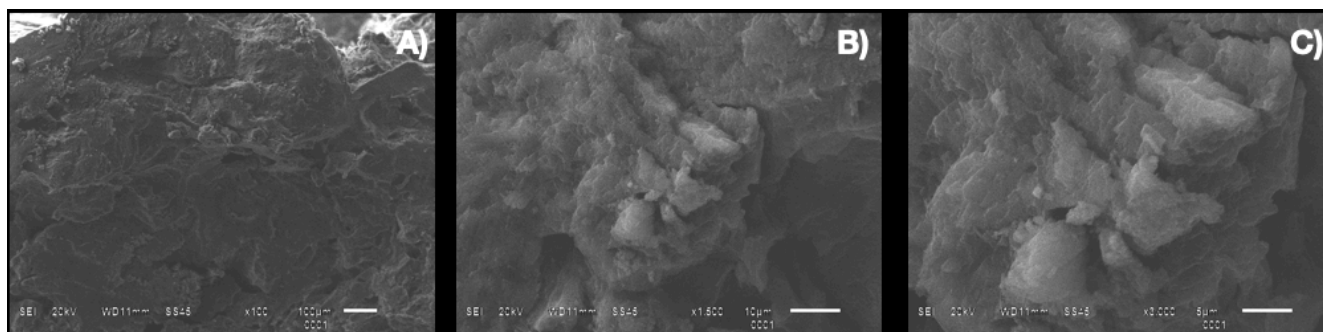


Figura 25. Microfotografías obtenidas del MEB del hidrogel del grupo positivo.

- A) Magnificación de x100, presencia de una superficie irregular.
- B) Magnificación de x500, superficie irregular con cavidades porosas.

C) Magnificación de x3000, superficie irregular, se observa una estructura con forma de capas y poros.

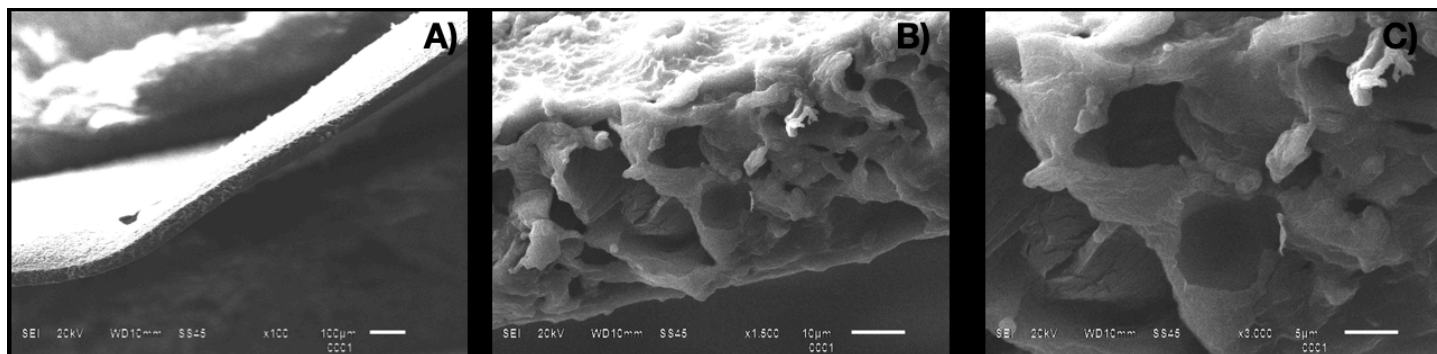


Figura 26. Microfotografías obtenidas del MEB del hidrogel del grupo control.

A) Magnificación de x100, presencia de una superficie irregular.

B) Magnificación de x1500, superficie con irregularidades y presencia de poros de tamaño variado.

C) Magnificación de x3000, se observa la definición del espacio interporo con una superficie menos rugosa y con grietas.

11.3 HINCHAMIENTO

La cantidad de hinchamiento en peso y porcentaje de los hidrogeles del grupo positivo y control sumergidos en saliva artificial se evaluó a intervalos de tiempo de 5, 10, 30 y 60 minutos desde el contacto inicial. Los resultados se expresaron como la media y se obtuvieron a partir de realizar el experimento por triplicado, los cuales se presentan en la Tabla 5 y Figura 27.

Tabla 5. Promedio de la cantidad en peso y porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles del grupo positivo y grupo control.

	Peso inicial	Peso a los 5 minutos	Peso a los 10 minutos	Peso a los 30 minutos	Peso a los 60 minutos	% de absorción de saliva
Grupo Positivo	0.500mg	0.7738mg	0.776mg	0.8847mg	1.0996mg	210%
Grupo Control	0.500mg	0.7738mg	0.7780mg	0.8901mg	1.2342mg	246%

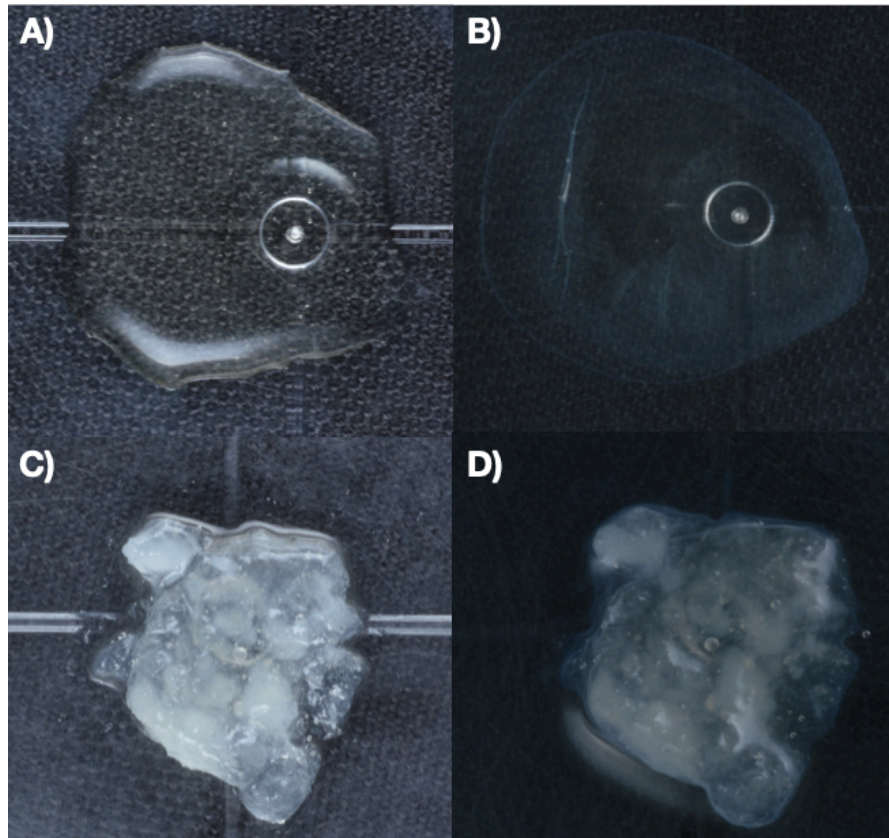


Figura 27. Hidrogeles del grupo positivo y control, antes y después de la prueba de hinchamiento.

- A) Hidrogel grupo control antes de sumergirse en saliva artificial.
- B) Hidrogel grupo control a los 60 minutos de sumergido.
- C) Hidrogel grupo positivo antes de sumergirse en saliva artificial.
- D) Hidrogel grupo positivo a los 60 minutos de sumergido.

Fuente propia.

11.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADAS DE FOURIER

Se identificaron los grupos funcionales del quitosano y la L-Arginina en los grupos control y positivo, asignándose las respectivas vibraciones de estiramiento y deformación, como se muestra en la Figura 28 y 29. Los cambios más significativos en las vibraciones de las mezclas se observan en la Figura 30, donde se evidencia cómo los picos se resaltan o intensifican para el grupo positivo.

En el grupo control, se pueden distinguir tres picos importantes: uno alrededor de $1600-1700\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la vibración de la amida I de los enlaces de N-acetilglucosamina; otro alrededor de $1560-1580\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la amida II (NH) y la deformación del grupo amino (NH_2); y un tercero alrededor de 3300 cm^{-1} , asociado a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo (OH), Figura 28, (49).

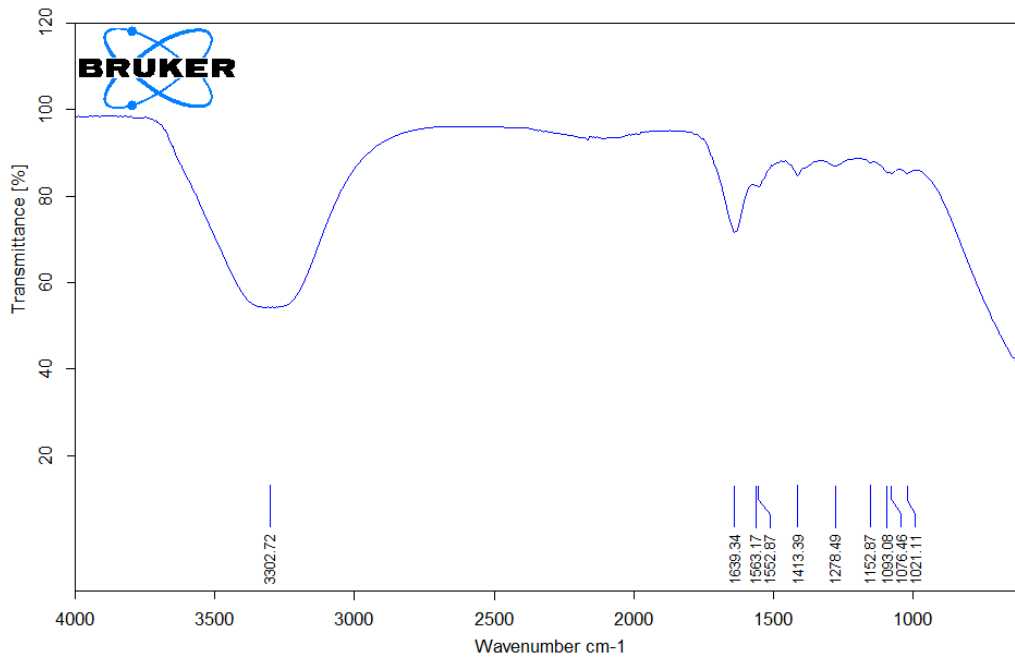


Figura 28. Gráfico de espectros FT-IR del hidrogel grupo control.
Fuente propia.

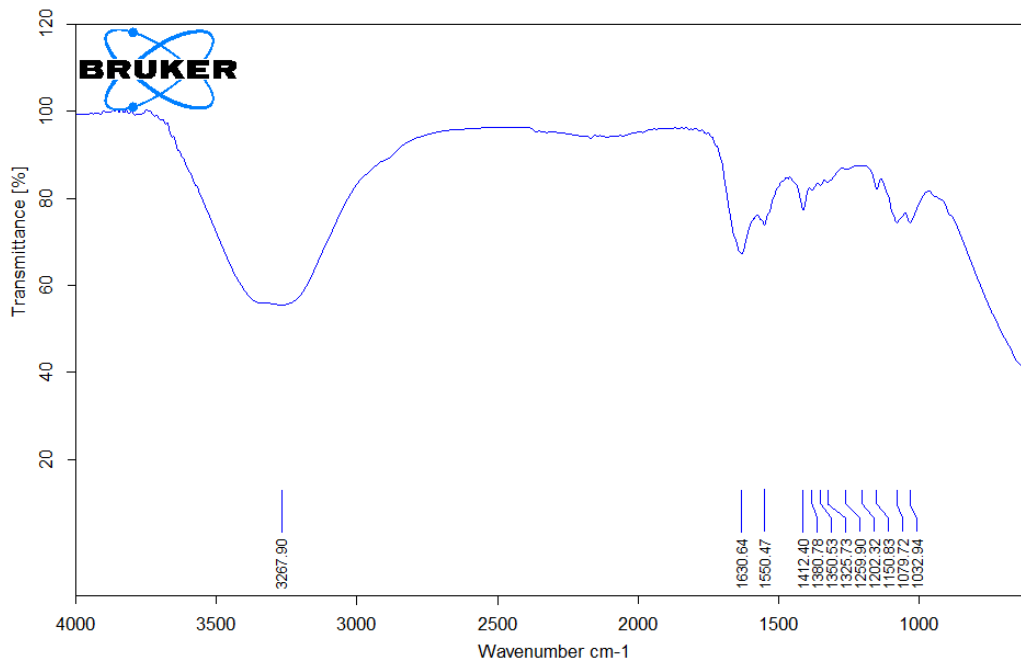


Figura 29. Gráfico de espectros FT-IR del hidrogel grupo positivo.
Fuente propia.

En el grupo positivo, se identificaron picos característicos asociados con los grupos funcionales presentes en el quitosano y la L-Arginina: un pico más intenso alrededor de $1600-1700\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la vibración de estiramiento de los

grupos amida (C=O); y otro en la región de 1400-1500 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de deformación de los grupos amino y metileno, Figura 29, (50, 51).

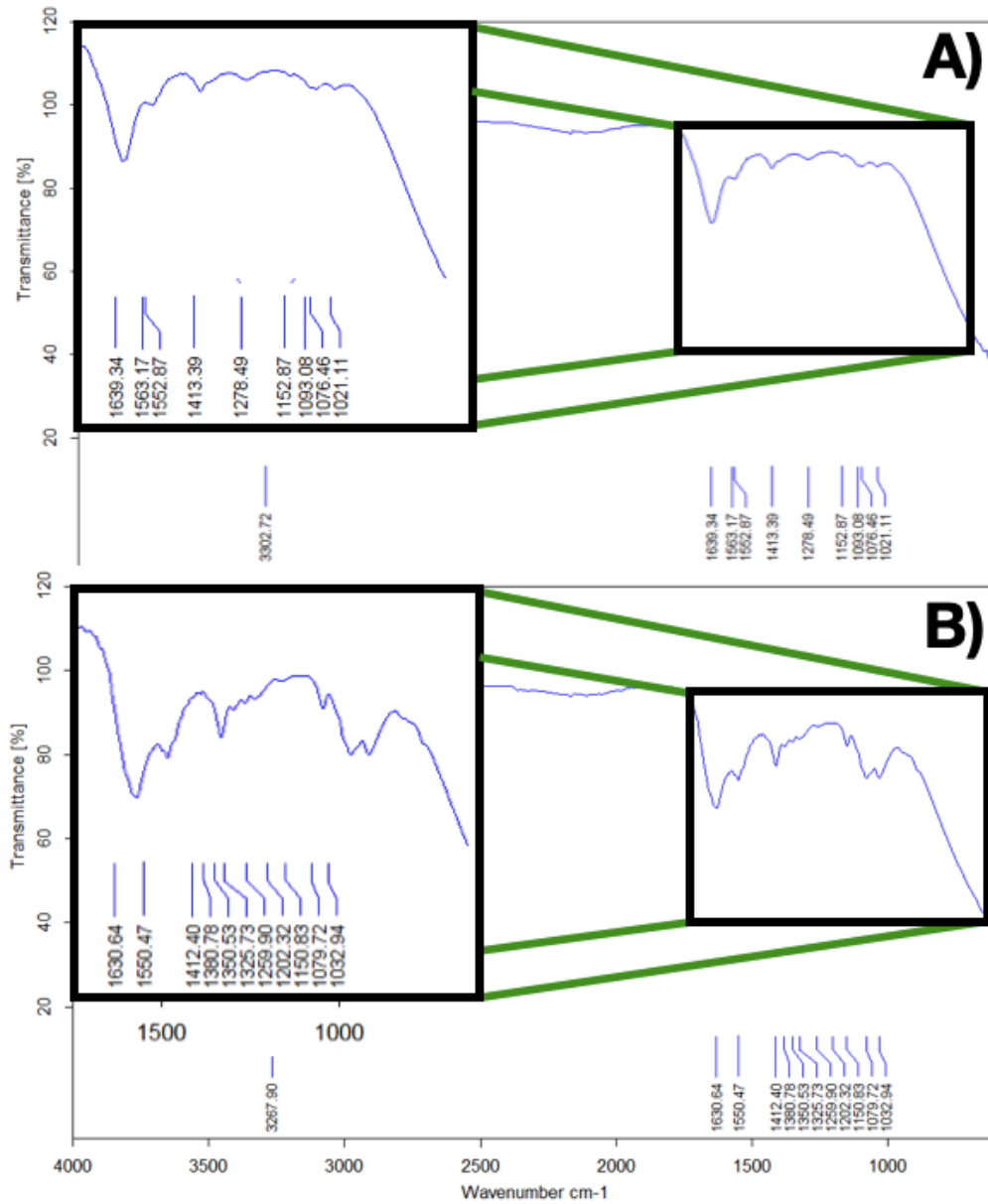


Figura 30. Gráfico de espectros FT-IR más significativos entre grupos experimentales.

A) Espectro grupo control.

B) Espectro grupo positivo.

Fuente propia.

En los espectros de los dos grupos control y positivo, la contribución de agua se puede identificar mediante el ensanchamiento de las regiones de las bandas entre 3000-3500, 1500-1800 y 500-900 cm^{-1} , Figura 28 y 29, (52).

Los espectros FT-IR de L-Arginina y quitosano obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich ®, (St. Louis, MO, USA), los cuales fueron utilizados en este estudio se representan en la Figura 31, para hacer referencia del componente químico, así como confirmar la identidad y pureza de dichos componentes (53, 54).

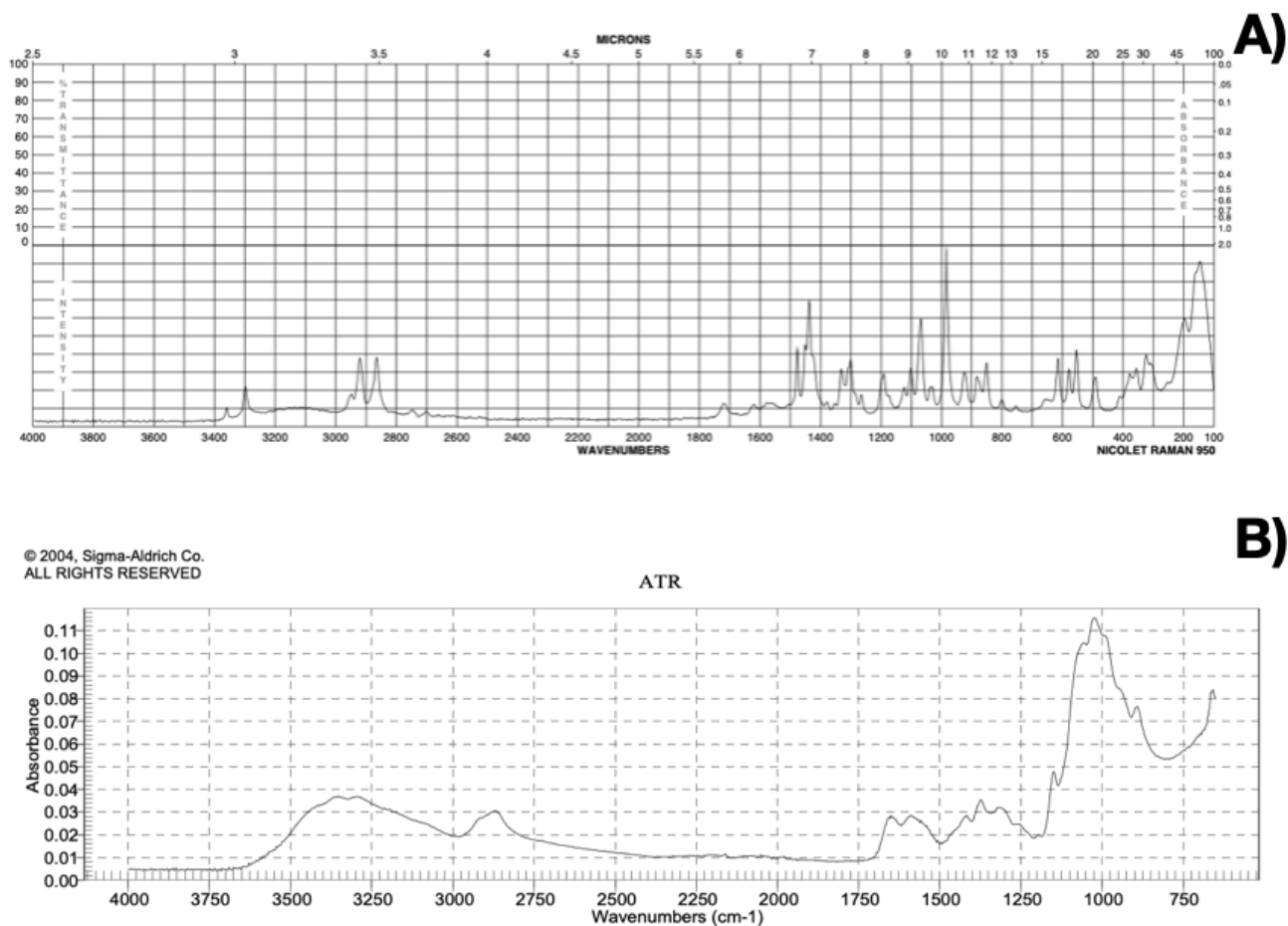


Figura 31. Espectros FT-IR de los componente químicos obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich ®, (St. Louis, MO, USA).

- A) Espectros FT-IR del reactivo puro de L-Arginina.
 - B) Espectros FT-IR del reactivo puro de quitosano.
- (53,54)

11.5 LIBERACIÓN

11.5.1 Prueba de Cromatografía de Capa Fina

Los resultados obtenidos de la prueba demuestran que una vez expuesta la placa cromatográfica al agente revelador, se observó que la L-Arginina fue sensible y reaccionó tiñiéndose a un color violáceo de menos a más intenso, dependiendo del tiempo en el que el hidrogel estuvo expuesto en la saliva artificial. En contraste, al realizar la prueba para el hidrogel del grupo control este no reaccionó con el agente revelador es decir, no se reveló algún color sobre la placa cromatográfica.

Los resultados son representados en la Figura 32.

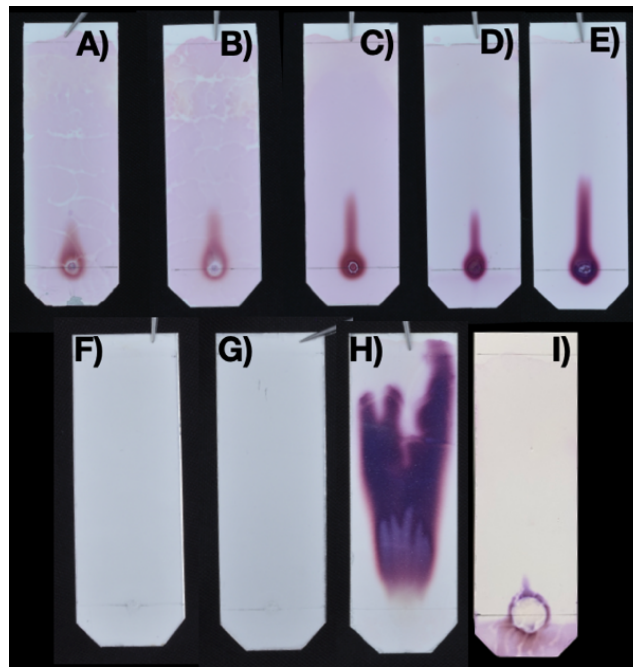


Figura 32. Resultados de la prueba de Cromatografía de Capa Fina.

- A) Placa a los 0 minutos de interacción del hidrogel grupo positivo más saliva artificial.
- B) Placa a los 15 minutos del hidrogel grupo positivo.
- C) Placa a los 30 minutos del hidrogel grupo positivo.
- D) Placa a los 60 minutos del hidrogel grupo positivo.
- E) Placa a las 8 horas del hidrogel grupo positivo.
- F) Placa a los 0 minutos del hidrogel grupo control.
- G) Placa a las 8 horas del hidrogel grupo control.
- H) Placa de la solución de agua destilada con L-Arginina al 10%.
- I) Placa de la solución de saliva artificial con L-Arginina al 10%.

Respecto a las pruebas realizadas como estándares, Figura 32, H), I), se observó que entre ellas hubo una diferencia en el resultado del desarrollo de la placa cromatográfica, es decir, la solución de agua destilada arrastró consigo junto con la fase móvil la L-Arginina hacia el frente de elución, en comparación a la solución de

la saliva artificial, que no ascendió de manera similar, sin embargo, respecto a la revelación del color representativo, este se observa en ambas muestras.

11.6 HEMOCOMPATIBILIDAD

11.6.1 Prueba de hemólisis

La prueba de hemólisis evalúa el porcentaje de hemólisis en plasma. La hemoglobina se cuantifica por medio de absorbancia (540nm) cuando la hemoglobina se combina con el reactivo de Drabkin para formar cianmetahemoglobina. De manera que para cuantificar la hemoglobina primero se realiza una curva de calibración empleando una solución estandarizada de hemoglobina. Para cuantificar la hemoglobina, se toma una muestra de plasma de sangre que fue incubada con el hidrogel y la muestra se mezcla con el reactivo de Drabkin. Los resultados obtenidos se reportan en porcentaje, de acuerdo con el documento Estándar de Práctica para la evaluación de propiedades hemolíticas de materiales (Designación: F 756-00), adaptadas por el Centro de Investigación en Ingeniería Biomédica (CEIB) de la última versión 2010 (44); de acuerdo con este documento, se considera un material no hemolítico cuando el material causa una hemólisis de 0-2%; se considera un material ligeramente hemolítico cuando el material causa una hemólisis de 2-5%, y se considera un material hemolítico cuando el material causa una hemólisis >5%. Los resultados obtenidos del experimento de la evaluación de las propiedades hemolíticas del hidrogel del grupo control y positivo se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados en porcentaje de la prueba de hemólisis.

Muestra	Porcentaje de hemólisis
Hb total (basal)	100.00
Hb plasma	0.16
Control +	15.21
Control -	0.91
Hidrogel Grupo Control	10.41
Hidrogel grupo Positivo	0.155

La muestra Hb total representa el 100% de hemoglobina de la sangre empleada en el experimento (155.76 mg/mL). La muestra Hb plasma representa la hemoglobina en plasma normal por lo tanto se espero un porcentaje mínimo de hemoglobina en esa muestra. La muestra Control + es la muestra control positivo (300 µl de sangre + 300 µl de solución de NaCl) y la muestra Control – es la muestra de control negativo (600 µl de sangre incubada con una muestra de un cubo de silicón de 5 mm x 5 mm). El resultado de las muestras experimentales es el promedio del porcentaje obtenido de las muestras por triplicado.

Los resultados muestran que el hidrogel del grupo control causa hemólisis mayor al 5%. El hidrogel del grupo positivo no causa hemólisis. De manera que puede interpretarse como que el hidrogel del grupo control es hemolítico y el hidrogel del grupo positivo no es hemolítico.

11.6.2 Prueba de Tiempo de Protrombina

Los resultados del experimento para la evaluación del TP se presentan en la tabla 7, en la cual se observa que el control patológico está en tiempo anormal y el control normal está en un tiempo dentro del rango de lo normal. El control fisiológico mostró un tiempo dentro del rango de lo normal. Para el hidrogel del grupo control el resultado fue un valor de TP más prolongado del rango normal, sin embargo para el hidrogel del grupo positivo se encontró dentro del rango normal.

Tabla 7. Resultados en segundos de la evaluación del TP.

Tiempo de Protrombina Vía Extrínseca						
Muestra	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Promedio	Desviación Estándar	P valor
Control Patológico	24.4	24.9	24.1	24.5	0.4	NS
Control Normal	12.4	12	12.1	12.2	0.2	NS
Control Fisiológico	13.3	13.6	14.1	13.7	0.4	NS
Hidrogel Grupo Control	32.9	39.4	41.35	37.83	8.8	NS
Hidrogel Grupo Positivo	14.2	14.4	14.1	14.2	0.2	NS

El tiempo normal de TP con el método empleado es de 11.1-14.3 segundos.

NS: P >0.05

11.6.3 Prueba de Tiempo de Tromboplastina Tisular Activada

En los resultados de la prueba de TTPTA se observa que hubo un efecto del hidrogel del grupo control sobre el tiempo de coagulación por el TTPTA, siendo este más prolongado en un rango de más de 30 segundos. Cuando el hidrogel está cargado con L-Arginina se observa que el TTPTA es cercano al tiempo del rango normal. Los resultados del experimento se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados en segundos de la evaluación del TTPTA.

Tiempo de Tromboplastina Tisular Activada Vía Intrínseca						
Muestra	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Promedio	Desviación Estándar	P valor
Control Patológico	66.7	70.1	68.4	68.4	1.7	NS
Control Normal	31.1	31.8	31.4	31.4	0.4	NS
Control Fisiológico	29.2	27.3	28.3	28.3	0.9	NS
Hidrogel Grupo Control	80.0	80.0	80.0	80.0	0.0	NS
Hidrogel Grupo Positivo	33.9	37.4	35.7	35.7	1.8	NS

El tiempo normal de TTPTA con el método empleado es de 24-36 segundos.

NS: P >0.05

12. DISCUSIÓN

La búsqueda de métodos para acelerar tratamientos ortodóncicos ha llevado a investigar la L-Arginina y los hidrogeles de quitosano. Aunque la L-Arginina ha mostrado resultados prometedores en modelos murinos, su aplicación en humanos no se ha estudiado. Los hidrogeles de quitosano representan una posible solución para la liberación controlada de L-Arginina. Este estudio se centra en la elaboración y caracterización mediante pruebas de pH, ultraestructura, hinchamiento, FT-IR, liberación, así como su efecto sobre la coagulación sanguínea por medio de pruebas de hemocompatibilidad como lo son la prueba de hemólisis, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina tisular activada, sentando las bases para su posible aplicación clínica en la Ortodoncia. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue elaborar hidrogeles de quitosano con L-Arginina al 10%, los cuales al someterse a diferentes pruebas de caracterización se observaron resultados que fueron contrastados con la literatura. Dichas pruebas discutidas son pH, ultraestructura, hinchamiento, FTIR, hemocompatibilidad y liberación, las cuales se presentan a continuación.

12.1 pH

El pH salival, que representa el potencial de hidrógeno, oscila entre 6.5 y 7.5 en promedio. Por lo tanto, es crucial que un hidrogel mantenga un pH neutro a ligeramente básico para asegurar su compatibilidad con la mucosa oral. Un pH extremadamente ácido o básico puede causar molestias desde leves hasta severas en el paciente, afectando la aplicación del hidrogel y potencialmente dañando la mucosa oral. Por ende, mantener un pH adecuado es esencial para preservar la biocompatibilidad del hidrogel con la mucosa oral, (38).

Es crucial comprender los reactivos empleados en la fabricación de hidrogeles, ya que influyen en el comportamiento del pH en la cavidad oral. Por ejemplo, el quitosano, un polisacárido con un pH de 6 a 7 en condiciones estándar, exhibe enlaces hidrógeno intermoleculares e intramoleculares altamente cristalinos, lo que lo hace insoluble en agua y limita sus aplicaciones. Es esencial mejorar su solubilidad en agua, dado que, obtenido mediante la desacetilación de quitina, solo puede disolverse en una solución ácida. Asefi et al., informaron que la adición de ácido acético reduce su pH durante la elaboración, pero al incorporar hidróxido de sodio al 1N, se logra mantener un pH neutro, corroborado tanto por Asefi et al., como por los resultados de la prueba de pH del grupo control, que mantuvo un pH por encima de 6 durante los primeros 60 minutos de interacción con la saliva artificial. (35)

Por otro lado, el pH de la L-arginina oscila entre 10 y 12 (15), esto se evidencia en el pH del grupo positivo de este estudio, que se mantuvo por encima de 6.8 hasta 8 horas de contacto con saliva artificial, a pesar de que el pH del hidrogel de quitosano disminuyó a 5.52, lo que se podría sugerir en que la L-Arginina ayuda a mantener un pH neutro.

Además, Amanpreet et al., explican que el pH ejerce influencia tanto en la superficie de las mucosas como en la de los polímeros. Así como, señalan que la mucoadhesión es óptima en condiciones de pH bajo (menor de 6), pero a valores de pH más elevados (mayor de 8), se produce un cambio en la conformación de una estructura similar a una barra, lo que los hace más susceptibles a la interdifusión y la interpenetración (55). En pH muy elevados, los polímeros cargados positivamente, como el quitosano, forman complejos de polielectrolitos como el moco y exhiben altas fuerzas mucoadhesivas. En nuestro estudio, el grupo control a las 8 horas de contacto con la saliva artificial muestra una disminución en el pH valores inferiores a 6. Sin embargo, el hidrogel del grupo positivo mantiene un pH por encima de 6 durante el mismo período, lo que sugiere una excelente capacidad de adhesión, interdifusión e interpenetración. Estas características son ventajosas para las propiedades ideales buscadas en el hidrogel en este estudio (55).

12.2 ULTRAESTRUCTURA

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) es una herramienta fundamental para determinar diversas propiedades superficiales de los hidrogeles, como la textura que se puede describir como lisa, rugosa o áspera, así como la distribución del agente bioactivo, ya sea que exista homogeneidad o se encuentre disperso (37). La literatura científica respalda la importancia de esta técnica para evaluar la morfología superficial de los hidrogeles, por lo que se incluyó en la caracterización del hidrogel de este estudio (37)

La observación de una mayor absorción de agua puede correlacionarse con un menor grado de reticulación, lo que facilita un mayor hinchamiento del hidrogel, como lo han reportado, Govindaraj et al., sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran diferencias en las superficies de los grupos. Como se puede apreciar en las microfotografías de las figuras 25 y 26. El grupo control exhibe poros más grandes en comparación con el grupo positivo, que muestra una superficie más homogénea y lisa, así como una estructura de capas. Estos hallazgos contrastan con los resultados de la prueba de hinchamiento, sugiriendo que las diferencias en las superficies influyen en el comportamiento de absorción y liberación del agente bioactivo (56).

Los resultados de las pruebas de caracterización permiten identificar los posibles usos del hidrogel, como lo reporta Li et al., una superficie porosa es beneficiosa cuando el hidrogel se requiere como andamio para formación ósea, mientras que una superficie lisa y uniforme es más adecuada cuando se necesita mantener contacto con la mucosa, permitiendo una liberación gradual y evitando lesiones en las mucosas al simular la fisiología del tejido (57).

Es importante destacar que, dentro de las limitaciones del estudio, las muestras se deshidrataron por medio del método con ethanol absoluto durante la preparación para su observación al MEB. Es importante tomar en consideración que este método de preparación para su observación puede presentar riesgo de modificaciones en

la muestra, lo cual puede conducir a artefactos en las imágenes, usar series de ethanol puede generar encogimiento y densificación de la muestra, sin embargo, cualquiera de los métodos utilizados puede generar este tipo de artefactos en las imágenes (41).

12.3 HINCHAMIENTO

El hidrogel del grupo control mostró un aumento significativo en su capacidad de hincharse en comparación con el grupo positivo. Este fenómeno puede explicarse por los hallazgos obtenidos de Rahnema et al., (49) quienes indican que en los hidrogeles de quitosano, un mayor tamaño de poro esta asociado con una menor densidad de reticulación, lo que resulta en una red polimérica más suelta y una mayor movilidad de las cadenas poliméricas. Esta estructura permite una difusión más amplia de agua en la red del hidrogel del grupo control, de acuerdo con lo reportado por Udhayakumar et al., (58) con los resultados obtenidos en este estudio, es decir, el hidrogel del grupo positivo tuvo un aumento gradual en comparación al grupo control que de 30 a 60 minutos en contacto con saliva artificial aumento un 34%, en cambio el grupo positivo aumento alrededor de 21% entre los intervalos de tiempo, esto de acuerdo a lo reportado con la literatura indica que existe una adecuada interacción entre el aminoácido y el polímero, resultando en una mejor capacidad de retención de agua, en comparación al fenómeno observado en la secuencia de los intervalos de tiempo del grupo control que tuvo mayor saturación de un tiempo a otro (58). El aumento gradual del hinchamiento del grupo positivo se puede correlacionar con el número de grupos amino presentes, en este contexto, se sugiere que la incorporación del aminoácido a la composición del hidrogel mejora la capacidad de hincharse, lo cual es de gran importancia ya que esta propiedad es esencial para facilitar la difusión de agentes bioactivos en el medio (58).

12.4 FT-IR

Se encontraron espectros FT-IR que verificaron el acoplamiento entre los componentes del hidrogel del grupo positivo, tal como lo ha reportado anteriormente Ling et al., donde se observo una vibración de deformación característica del grupo carbonilo (C=O) la cual apareció alrededor de 1650 cm^{-1} , debido a la formación del enlace amida se demostró que la L-Arginina se acopló con éxito con el quitosano (50).

Además, este hallazgo se contrastó con lo reportado por Martins et al., donde se observo una banda de absorción alrededor de 1560 cm^{-1} la cual se le asigna al grupo guanidina, que es parte de la estructura química de la L-Arginina que tambien se encuentra dentro de los espectros del hidrogel del grupo control, sin embargo, de acuerdo a la literatura, este fenómeno se debe diferenciar entre el grupo control y grupo positivo, al observar los espectros obtenidos, es decir, al ser cadena lateral de la L-Arginina el espectro para el grupo positivo resulta en bandas de orden

reducido, tal como se presentó en los resultados obtenidos para la prueba experimental de este estudio (59).

12.5 HEMOCOMPATIBILIDAD

En algunas circunstancias, los hidrogeles pueden entrar en contacto directo con la sangre, lo que subraya la importancia de realizar pruebas de hemocompatibilidad para garantizar su seguridad en aplicaciones *in vivo* (60). Investigaciones previas realizadas por Malette et al., y Klokkevold et al., han destacado el potencial del quitosano para promover la coagulación sanguínea (61, 62), sin embargo, estudios como el de Yang et al., han demostrado que una solución de ácido acético con quitosano puede inhibir el proceso de coagulación sanguínea, lo que podría ser beneficioso si se desea evitar la formación de coágulos (63). Estos hallazgos sugieren que el peso molecular y el grado de desacetilación son factores críticos que influyen en las propiedades hemostáticas del quitosano. En este estudio se observaron resultados que respaldan este fenómeno, ya que el grupo control mostró Tiempos de Protrombina y Tiempo de Tromboplastina Tisular Activada más prolongados, así como un mayor porcentaje de hemólisis inducida en la superficie por el quitosano, como sugiere Song et al., esto puede ser debido a las interacciones electrostáticas entre el quitosano y los eritrocitos (64).

Además, nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por Song et al., ya que la adición de L-Arginina a la formulación del hidrogel mostró una mejora en la coagulación sanguínea, lo que sugiere un beneficio potencial para un biomaterial que podría estar en contacto con la sangre. Sin embargo, se necesitan investigaciones más detalladas para comprender mejor el impacto de la L-Arginina en la interacción del quitosano con el sistema de coagulación sanguínea (64).

12.6 LIBERACIÓN

Para analizar la presencia de aminoácidos en una muestra, las metodologías más utilizadas son la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la Cromatografía de Gases (CG), como menciona Ferré et al. (65). Sin embargo, estas técnicas pueden presentar ciertas limitaciones (66). En este estudio, se simuló el medio acuoso de la cavidad oral, donde el hidrogel del grupo positivo estaría en contacto con saliva artificial. Es importante considerar que el método por HPLC podría verse afectado al realizar el análisis en este medio acuoso. Según lo reportado por Wolfender et al., dos factores que controlan la sensibilidad del detector son el coeficiente de extinción del analito en la fase estacionaria y la longitud de la columna del HPLC, la cual puede ser afectada por factores como el pH, la concentración de sal y el solvente, lo que provoca desplazamientos en los espectros o retención de los analitos en la fase estacionaria (66). Por lo tanto, es recomendable evitar analitos con baja absorbancia, como los tampones fosfato (presente en la saliva artificial), y que no son óptimos para sistemas como el HPLC (66).

La saliva artificial utilizada en este estudio, según lo reportado por Mystkowska et al., posee componentes de soluciones tampón a base de fosfatos, entre otros, por lo que se optó por la Cromatografía de Capa Fina (TLC) (67). En comparación con el HPLC, la TLC presenta ventajas como su conveniencia y simplicidad, la amplia variedad de reactivos disponibles para la detección visual en la placa, el bajo consumo de disolvente, la posibilidad de analizar varias placas en un tanque con la misma fase móvil, la flexibilidad en la elección de fases estacionarias y móviles, así como la disponibilidad de placas desechables, de acuerdo a lo reportado por Mohammad et al. (68).

Este método fue seleccionado para este estudio, Shinhbabu et al., concluyeron que la TLC es una herramienta importante para la identificación de aminoácidos mediante la revelación cromatográfica con diferentes agentes reactivos, como la ninhidrina. Además, permite determinar los aminoácidos según el Factor de Retención, que sirve para comparar la distancia recorrida por el estándar del aminoácido con la distancia recorrida de la fase móvil. Sin embargo, en este estudio no fue posible determinar un estándar específico debido a la presencia de compuestos en la muestra como ácido acético, agua destilada, hidróxido de sodio y quitosano con diferentes afinidades por la fase estacionaria y móvil, lo que resulta en grados de retención y migración que harían imposible determinar su Factor de Retención con base al estándar, por lo que se decidió determinar la presencia del aminoácido a partir de la revelación cromatográfica por ninhidrina (48). Vazquez et al., han demostrado que la presencia de L-Arginina en la muestra de interés, se puede evidenciar a partir de un color violáceo rosado en el grupo positivo, similar a los hallazgos obtenidos en su estudio, lo que indica que las sustancias que contienen al menos un grupo amino y un carboxilo libre reaccionan con la ninhidrina (69). Esto también se observó en las placas estándar donde se disolvió L-Arginina en agua destilada y saliva artificial, a pesar de que finalmente no pudieron ser utilizadas como referente.

Con base en lo anterior, se sugiere realizar pruebas piloto para otras estrategias que permitan determinar la cinética de liberación de la L-Arginina contenida en el hidrogel de quitosano, posiblemente al modificar la solución acuosa en la que se embebe el hidrogel durante la TLC para la fase experimental, aunque eso no eliminaría las variables relacionadas a los componentes que permiten elaborar el hidrogel, una alternativa adicional sería, evaluar técnicas de cuantificación de L-Arginina relacionadas con actividad enzimática o el uso de espectrofotometría (65). Sin embargo, a pesar de que la presencia de L-Arginina se determinó de manera cualitativa, se alcanza el objetivo de este estudio, que era evidenciar su liberación por el hidrogel de quitosano, por lo tanto, los hallazgos obtenidos indican que el hidrogel del grupo positivo podría utilizarse en estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar su efecto en la aceleración del movimiento dental ortodóncico.

13. CONCLUSIONES

Se logró elaborar un hidrogel de quitosano con la capacidad de liberar un principio activo (L-Arginina).

Las pruebas de caracterización permitieron evidenciar aquellas propiedades deseables para un sistema de liberación de principios activos como los hidrogeles.

La liberación de L-Arginina no pudo ser cuantificada en diversos intervalos de tiempo pero se alcanza el objetivo de demostrar su liberación y se estableció el precedente para mejorar la técnica de TLC.

Las pruebas de hemocompatibilidad, sugieren que los hidrogeles elaborados en este estudio podrían ser utilizados no sólo de manera tópica sino también en un contexto en el que sea indispensable su contacto con tejidos profundos.

Los resultados de la prueba de hinchamiento del hidrogel, sugieren que la liberación de la L-Arginina podría ser controlada y estable durante al menos 8 horas.

Los análisis FT-IR confirmaron una interacción óptima entre los componentes.

Se sugieren pruebas cuantitativas adicionales para determinar la cantidad exacta de L-Arginina liberada.

El hidrogel de quitosano podría ser una opción segura y prometedora para la ortodoncia acelerada.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliva N, Conde J, Wang K, Artzi N. Designing Hydrogels for On-Demand Therapy. *Acc. Chem. Res.* 2017. 16;50(4):669–79.
2. Kaith BS, Singh A, Sharma AK, Sud D. Hydrogels: Synthesis, Classification, Properties and Potential Applications—A Brief Review. *J Polym Environ.* 2021. 21;29(12):3827–41.
3. Omar J, Ponsford D, Dreiss CA, Lee T, Loh XJ. Supramolecular Hydrogels: Design Strategies and Contemporary Biomedical Applications. *Chem. Asian J.* 2022 19;17(9).
4. Bernhard S, Tibbitt MW. Supramolecular engineering of hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021 171:240-256.
5. Cascone S, Lamberti G. Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. *Int. J. Pharm.* 2020 573:118803.
6. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(1):89–100.
7. Notario-Pérez F, Martín-Illana A, Cazorla-Luna R, Ruiz-Caro R, Veiga MD. Applications of Chitosan in Surgical and Post-Surgical Materials. *Marine Drugs.* 2022 15;20(6):396.
8. Seidi F, Khodadadi Yazdi M, Jouyandeh M, Dominic M, Naeim H, Nezhad MN, et al. Chitosan-based blends for biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021 183:1818–50.
9. Lang X, Wang T, Sun M, Chen X, Liu Y. Advances and applications of chitosan-based nanomaterials as oral delivery carriers: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020 154:433–45.
10. Haines RJ, Pendleton LC, Eichler DC. Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2011;2(1):8–23.
11. Park HY, Kim SW, Seo J, Jung YP, Kim H, Kim AJ, et al. Dietary Arginine and Citrulline Supplements for Cardiovascular Health and Athletic Performance: A Narrative Review. *Nutrients.* 2023 3;15(5):1268.
12. Adebayo A, Varzideh F, Wilson S, Gambardella J, Eacobacci M, Jankauskas SS, et al. L-Arginine and COVID-19: An Update. *Nutrients.* 2021 5;13(11):3951.
13. Talebian R, Jafari F, Dehpour AR, Gruber R. Effects of Lithium Chloride and Nitric Oxide Inhibitor on Orthodontic Tooth Movement in the Rat. *J Appl Sci.* 2021 16;11(8):3607.
14. Król M, Kepinska M. Human Nitric Oxide Synthase—Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 1;22(1):56.
15. Baky NAA, Zaidi ZF, Fatani AJ, Sayed-Ahmed MM, Yaqub H. Nitric oxide pros and cons: The role of L-arginine, a nitric oxide precursor, and idebenone, a coenzyme-Q analogue in ameliorating cerebral hypoxia in rat. *Brain Res Bull.* 2010 83(1-2):49–56.
16. Sun Y, Fu J, Lin F, Li S, Du J, Liu Y, et al. Force-Induced Nitric Oxide Promotes Osteogenic Activity during Orthodontic Tooth Movement in Mice. *Stem Cells Int.* 2022 2022:1–10.
17. S. Susan Baloul. Osteoclastogenesis and Osteogenesis during Tooth Movement. *Front. Oral Biol.* 2015 24;75–9.

18. Dolce C, Scott Malone J, Wheeler TT. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Semin Orthod.* 2002 8(1):6–12.
19. Meeran N. Cellular response within the periodontal ligament on application of orthodontic forces. *J Indian Soc Periodontol.* 2013 17(1):16.
20. Shirazi S, Phimon Atsawasuan. *Advances in Orthodontic Tooth Movement: Gene Therapy and Molecular Biology Aspect.* 2018; 5:1-22.
21. Li Y, Jacox LA, Little SH, Ko CC. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2018 34(4):207–14.
22. Baniwal SK, Shah PK, Shi Y, HaDuong JH, DeClerck YA, Gabet Y, et al. Runx2 promotes both osteoblastogenesis and novel osteoclastogenic signals in ST2 mesenchymal progenitor cells. *Osteoporos Int.* 2011 1;23(4):1399–1413.
23. Ooi CH, Ling YP, Abdullah WZ, Mustafa AZ, Pung SY, Yeoh FY. Physicochemical evaluation and *in vitro* hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 2019 30;30(4).
24. Montero OG, Dib A, Dipp FA, Aristizábal JF, Moyaho M de los Á, Salas MF, et al. Use of Hydrogels to Regulate Orthodontic Tooth Movement in Animal Models: A Systematic Review. *J Appl Sci.* 2022 1;12(13):6683.
25. Cerda-Cristerna BI, Flores H, Pozos-Guillén A, Pérez E, Sevrin C, Grandfils C. Hemocompatibility assessment of poly (2-dimethylamino ethylmethacrylate) (PDMAEMA)-based polymers. *J Control Release.* 2011 153(3):269–277.
26. Hayashi K, Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Mitani H. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002 122(3):306–9.
27. Akin E, A. Umit Gurton, Hüseyin Ölmez. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. 2004 1;126(5):608–14.
28. Yu Y, Yuk H, Parada GA, Wu Y, Liu X, Nabzdyk CS, et al. Multifunctional “Hydrogel Skins” on Diverse Polymers with Arbitrary Shapes. *Adv. Mat.* 2018 20;31(7):1807101.
29. Caló E, Khutoryanskiy VV. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* 2015 Apr;65(1):252–67.
30. Bahram M, Mohseni N, Moghtader M. *An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications;* 2016.
31. Aswathy SH, Narendrakumar U, Manjubala I. Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon.* 2020 Apr;6(4): e03719.
32. Sousa J, Adria E, Oliveira Alves, Barroso L, Rosane. Oral or topical administration of L-arginine changes the expression of TGF and iNOS and results in early wounds healing. *Acta Cir Bras.* 2016 1;31(9):586–96.
33. Nilforoushan D, Manolson MF. Expression of Nitric Oxide Synthases in Orthodontic Tooth Movement. *Angle Orthod.* 2009 1;79(3):502–8.
34. Padisar P, Hashemi R, Naseh M, Abde B, Mohammadi M. Assessment of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 6 level in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a randomized split-mouth clinical trial. *J. Electron.* 2018 25;10(8):7146–54.
35. Asefi S, Seifi M, Fard G, Lotfi A. Innovative evaluation of local injective gel of curcumin on the orthodontic tooth movement in rats. *J. Dent. Res.* 2018 15(1):40.

36. Gong C, Shi S, Dong P, Kan B, Gou M, Wang X, et al. Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. *Int. J. Pharm.* 2009 Jan 5;365(1-2):89–99.
37. Xu J, Strandman S, Zhu JXX, Barralet J, Cerruti M. Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. *Biomaterials.* 2015 37:395–404.
38. Sobczak-Kupiec A, Malina D, Piatkowski M, Krupa-Żuczek K, Wzorek Z, Tylińczak B. Physicochemical and Biological Properties of Hydrogel/Gelatin/Hydroxyapatite PAA/G/HAp/AgNPs Composites Modified with Silver Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2012 1;12(12):9302–11.
39. Liu J, Zhou F, Guo R, Jiang Y, Fan X, He A, et al. Analysis of an Alanine/Arginine Mixture by Using TLC/FTIR Technique. *J Spectrosc.* 2014 28;2014: e925705.
40. Sámano-Valencia C, Martínez-Castañón GA, Martínez-Martínez RE, Loyola-Rodríguez JP, Reyes-Macías JF, Ortega-Zarzosa G, et al. Bactericide efficiency of a combination of chitosan gel with silver nanoparticles. *Mater Lett.* 2013 106:9 413–416.
41. Habib A, Sathish V, Mallik S, Khoda B. 3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel. *Materials.* 2018 20;11(3):454.
42. Innovation with Integrity FT-IR VERTEX 70v FT-IR Spectrometer [Internet]. 2021. Available from: www.bruker.com/optics
43. Karpushkin E, Dušková-Smrčková M, Šlouf M, Dušek K. Rheology and porosity control of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Polymer (Guildf).* 2013 54(2):661–72.
44. Designation: F 756-00 Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials 1 Available from: www.astm.org
45. HEMOGLOBIN DRABKIN Safety Data Sheet Available from: www.spinreact.com
46. SPINREACT. Determinación del Tiempo de Protrombina Available from: www.spinreact.com
47. SPINREACT. Determinación cuantitativa del Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) Available from: www.spinreact.com
48. Sinhababu A. Modified Ninhydrin reagent for the detection of amino acids on TLC plates. *Int. J. Appl. Nat. Sci.* 2013 1;5(1):125–127.
49. Rahnema H, Nouri Khorasani S, Aminoroaya A, Molavian MR, Allafchian A, Khalili S. Facile preparation of chitosan-dopamine-inulin aldehyde hydrogel for drug delivery application. *Int J Biol Macromol.* 2021 185:716–724.
50. Ling Z, Deng J, Zhang Z, Sui H, Shi W, Yuan B, et al. Spatiotemporal manipulation of L-arginine release from bioactive hydrogels initiates rapid skin wound healing accompanied with repressed scar formation. *Appl Mater Today.* 2021 24(101116):101116.
51. He M, Potuck A, Zhang Y, Chu C-C. Arginine-based polyester amide/polysaccharide hydrogels and their biological response. *Acta Biomater* 2014 10(6):2482–94.
52. Roda A, Santos F, Chua YZ, Kumar A, Do HT, Paiva A, et al. Unravelling the nature of citric acid:l-arginine:water mixtures: the bifunctional role of water. *Phys Chem Chem Phys* 2021 23(2):1706–17
53. ESPECTRO FT-IR L-ARGININA Available from: www.sigmaaldrich.com

54. ESPECTRO FT-IR QUITOSANO Available from: www.sigmaaldrich.com
55. Amanpreet M. Buccoadhesive Drug Delivery System- A Review. *World J Pharm Pharm Sci* 2017 378–403.
56. Govindaraj P, Raghavachari D. Fabrication of macroporous soft hydrogels of Chitosan scaffolds by hydrothermal reaction and cytotoxicity to 3T3 L1 cells. *J Polym Res.* 2021 28(3).
57. Li Q, Yang D, Ma G, Xu Q, Chen X, Lu F, et al. Synthesis and characterization of chitosan-based hydrogels. *Int J Biol Macromol* 2009 44(2):121–7.
58. Udhayakumar S, Shankar KG, Sowndarya S, Venkatesh S, Muralidharan C, Rose C. L-Arginine intercedes bio-crosslinking of a collagen–chitosan 3D-hybrid scaffold for tissue engineering and regeneration: *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. *RSC Adv.* 2017 7(40):25070–88.
59. Martins A, Facchi S, Follmann H, Pereira A, Rubira A, Muniz E. Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: A review. *Int J Mol Sci* 2014 15(11):20800–32.
60. Herrera-Guardiola S, Valencia CH, Casillas-Santana MÁ, Dipp-Velázquez FA, Aristizábal-Pérez JF. Evaluation of cellular viability in chitosan/L-arginine hydrogels. *Polim Med* 2024 54(1):0–0.
61. Malette. United States Patent. Method of achieving hemostasis 1983. Available from:www.patentimages.storage.googleapis.com/b5/a7/a6/641ba720418bc3/U_S4394373.pdf
62. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, Bertolami CN. Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49(8):858–863.
63. Yang J, Tian F, Wang Z, Wang Q, Zeng Y-J, Chen S-Q. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008 84B(1):131–137.
64. Song L, Zhu D, Liu L, Dong X, Zhang H, Leng X. Evaluation of the coagulation properties of arginine-chitosan/DNA nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010 95B(2):374–379.
65. Ferré S, González-Ruiz V, Guillarme D, Rudaz S. Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019 15;1132:121819
66. Wolfender JL. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. *Planta Med.* 2009 14;75(07):719–34.
67. Mystkowska J, Car H, Dąbrowski JR, Romanowska J, Klekotka M, Milewska AJ. Artificial Mucin-based Saliva Preparations - Physicochemical and Tribological Properties. *Oral Health Prev Dent.* 2018 16(2):183–93.
68. Mohammad A, Moheman A, El-Desoky G. Amino acid and vitamin determinations by TLC/HPTLC: review of the current state. *Open Chem.* 2012 1;10(3):731–50.
69. Vázquez-Jorge IYG, Guerra-Molina DL, Quintana-Tamayo IJF, Ramírez-Arzuaga MJ, Fernando-Ballesteros LR, Vázquez-Jorge DY. Physical-chemistry characterization and protein content of fluids extracts of the mangrove oyster (*Crassostrea rizophorae*). *Rev cuba quím.* 2014 26(1):66–74.

15. ANEXOS

15.1 CONSENTIMIENTOS INFORMADOS PARA REALIZAR PRUEBAS DE HEMOCOMPATIBILIDAD.

Universidad Veracruzana
Región Orizaba-Córdoba
Facultad de Odontología

Consentimiento informado para participación en una investigación

1. Información sobre la investigación

Esta carta tiene como objetivo que usted conozca el motivo por el cual se realiza el estudio llamado *“Evaluación de la coagulación y de la hemólisis causada por un hidrogel de quitosano cargado con L-Arginina al 10%”*. El hidrogel de quitosano es un gel hecho con una sustancia llamada quitosano, un hidrogel es similar a una gelatina como las que se preparan para comer. Pero este gel no es para comer, sino que es para investigarlo en un laboratorio. El hidrogel de quitosano contiene L-Arginina que es una sustancia natural llamada aminoácido y que forma parte de las sustancias naturales en el cuerpo. El hidrogel con L-Arginina se hace y se investiga con la intención de saber si puede aplicarse en tratamientos dentales, en específico, en tratamientos del área de ortodoncia. La ortodoncia es el área que previene y trata las enfermedades de malposición del diente. El hidrogel de quitosano con L-Arginina podría llegar a mejorar el tratamiento de ortodoncia haciendo que los dientes se muevan fácilmente y se coloquen en una posición adecuada.

El hidrogel de quitosano con L-Arginina no se aplicará en humanos en este momento, eso sucederá solamente si el hidrogel pasa muchas pruebas. Para investigar el hidrogel de quitosano con L-Arginina es necesario que primero se hagan pruebas de laboratorio. En este estudio se harán pruebas para saber si el hidrogel de quitosano cargado con L-Arginina tiene un efecto en la coagulación de la sangre. La coagulación de la sangre es el proceso natural con el cual el cuerpo humano detiene el sangrado cuando hay una herida. Entonces, el hidrogel de quitosano con L-Arginina se pondrá en contacto con sangre humana para saber si el hidrogel retrasa o acelera el tiempo en que sucede la coagulación. Esto se evaluará con pruebas de laboratorio en las que se usará sangre humana pero el hidrogel de quitosano con L-Arginina no será aplicado en humanos.

El hidrogel de quitosano con L-Arginina también será puesto en contacto con sangre humana para saber si causa hemólisis. La hemólisis es un indicador que se usa para saber si un material daña a los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos son las células que transportan el oxígeno con ayuda de la hemoglobina. Cuando los glóbulos rojos se rompen liberan hemoglobina, ese proceso de deterioro de los glóbulos rojos se puede identificar por la medición de la hemólisis.

Resumiendo, en este estudio se pondrá en contacto el hidrogel de quitosano con sangre humana para investigar si el hidrogel causa un efecto en la coagulación de la sangre o si causa daño a los glóbulos rojos y produce hemólisis.

En base con lo anterior, el objetivo del estudio es medir el tiempo de coagulación y medir el porcentaje de hemólisis. La necesidad de hacer esto es saber si el hidrogel afecta en las funciones de la sangre, si el hidrogel afecta en la coagulación y causa hemólisis, podría ser un hidrogel que no es adecuado para seguirse investigando.

**Universidad Veracruzana
Región Orizaba-Córdoba
Facultad de Odontología**

Consentimiento informado para participación en una investigación

La solicitud que se hace para usted en relación con el estudio es la de solicitar su participación en la donación de una cantidad de sangre de 25 mililitros de sangre, esto es aproximadamente el volumen de agua que cabe en un vaso de los llamados tequileros.

Este estudio no tiene un beneficio directo en usted, es un estudio que solamente investiga si el hidrogel de quitosano con L-Arginina afecta la sangre. Sin embargo, el beneficio es para el aprendizaje sobre el hidrogel que en un futuro podría ser aplicado en personas y en esas personas tendría beneficios. La investigación en el área de materiales dentales requiere de estos primeros pasos siempre. La cantidad de sangre que usted donará no representa una pérdida de sangre importante porque su cuerpo tiene entre 4 y 5.5 litros de sangre si usted es hombre o entre 4 y 5 litros si usted es mujer, de manera que la cantidad a donar es poca si se compara con el total de sangre. Una persona experta en extraer sangre será quien le saque la sangre del brazo por medio de una inyección, esto procedimiento dura menos de dos minutos. El riesgo de sentir un malestar por la donación es un riesgo mínimo. Luego de que le saquen la sangre podría ser que aparezca una marca en su brazo, o incluso puede aparecer un moretón, aunque es poco probable que eso suceda pues la persona es experta en sacar sangre.

Si usted acepta participar como donante, puede retirarse de donar sangre en el momento en que usted así lo quiera, no estará obligado(a) a donar sangre si firma esta carta. Su participación es voluntaria y confidencial. Su identidad no será revelada ni publicada en la información que se origine de la investigación. La información entre otra puede aparecer en tesis, artículos científicos, conferencias, etc.; sus datos no aparecerán en ninguna de esas publicaciones. Si usted quiere, podrá conocer los resultados del estudio haciendo la petición al investigador para contacto.

Un investigador que participa en el estudio estará presente en el momento que usted haga la donación de sangre. El investigador estará pendiente de que todo el proceso de la donación de sangre se desarrolle de manera adecuada. Usted podrá comunicarle en cualquier momento si quiere retirar su participación como donante, si se retira, no habrá ninguna situación negativa hacia usted.

Usted podrá contactar al investigador de apoyo en cualquier momento.

Dr. José Luis Suárez Franco
jsuarez@uv.mx
Teléfono: 272 727 53 50

Mtra. Lizzet Yadira Harrison Urcid
lharrison@uv.mx
Teléfono: 272 727 53 50

**Universidad Veracruzana
Región Orizaba-Córdoba
Facultad de Odontología**

Consentimiento informado para participación en una investigación

2. Consentimiento para participar en el estudio

Por medio de la presente, doy mi consentimiento para participar en este estudio habiendo leído, entendido y comprendido la información sobre la investigación. Así mismo, habiendo aclarado mis dudas en relación con la información sobre la investigación. Conozco la información sobre las personas a quienes puedo contactar en caso de que requiera ayuda o asistencia en lo que se refiere a mi participación en este estudio.

Nombre y Firma del participante
Fecha

Nombre y firma del testigo 1
Fecha

Nombre y firma del testigo 2
Fecha

De conformidad con los artículos 21 y 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, el participante tendrá un duplicado de este consentimiento.