

SEP

SES

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Tijuana

Centro de Graduados e Investigación en Química

Trabajo de tesis

**“Membranas de quitosano y alginato de doble red con potencial aplicación en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa”**

Presentado por

I.Q. Melanie Zavala Ayala

Para obtener el grado de:

Maestra en ciencias en química

Director de tesis:

Dr. Manuel Alatorre Meda

Codirectora:

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

Tijuana, B. C.

Enero de 2022



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 11/enero/2022

Oficio No. 011/CG/2022

Asunto: Se autoriza impresión de trabajo de tesis

**GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**  
**PRESENTE**

Los que suscriben tienen a bien informar que el manuscrito de tesis titulado "Membranas de quitosano y alginato de doble red con potencial aplicación en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa", presentado por la C. Melanie Zavala Ayala, (con número de control M20210030), cumple con los requisitos de calidad y formato para tesis de Maestría en Ciencias en Química. Por consiguiente, se aprueba y autoriza al interesado para que proceda a la impresión del mismo.

**A T E N T A M E N T E**

  
**DR. MANUEL ALATORRE MEDA**  
Presidente

  
**DRA. KARLA ALEJANDRA ESPINOZA DUEÑAS**  
Secretario del Jurado

  
**DRA. EUSTOLIA RODRIGUEZ VELAZQUEZ**  
Vocal del Jurado

C.p. Oficina de Titulación  
C.p. Expediente  
C.p. Interesado  
MAM/KAED/ERV



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Av. Castillo de Chapultepec  
y calle Cuahquestra, Fracc. Tomás Aquino C.P. 22414,  
Tijuana, Baja California.  
1664 | 6038400 Ext. 101 / e-mails: dir\_tijuana@tecnm.mx  
tecnm.mx | tijuna.tecnm.mx





**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California,

27/enero/2022

OFICIO No. 014/DEPI/2022

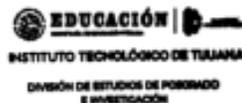
Asunto: **Autorización de Impresión de Tesis**

**MARIBEL GUERRERO LUIS**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE**

En lo referente al trabajo de tesis, "Membranas de quitosano y alginato de doble red con potencial aplicación en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa". Presentado por C. Melanie Bavala Ayala, alumna de la Maestría en Ciencias en Química con número de control M20210030; informo a usted que a solicitud del comité de tutorial, tengo a bien Autorizar la impresión de Tesis, atendiendo las disposiciones de los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México.

Sin más por el momento le envié un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
Excelencia en Educación Tecnológica.



**GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO**  
**JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo

GHE/lap



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,  
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400  
Est. 101

e-mail: dir.tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | Tijuana.tecnm.mx



**2022** *Ricardo*  
**Flores**  
AÑO DE  
**Magón**  
PRESENCIA DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA



Instituto Tecnológico de Tijuana

## INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA

### DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

#### CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tijuana, B.C. del 12 de enero del 2022, MELANIE ZAVALA AYALA, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Química con número de control M20210030, manifiesta que es autor del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. MANUEL ALATORRE MEDA y la Dra. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ, y cede los derechos del trabajo intitulado *"Membranas de quitosano y alginato de doble red con potencial aplicación en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa"* al Tecnológico Nacional de México/IT Tijuana para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, figuras, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico: [manuel.alatorre@tectijuana.edu.mx](mailto:manuel.alatorre@tectijuana.edu.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MELANIE ZAVALA AYALA



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin, Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400 Est. 101  
e-mail: [dir\\_tijuana@tecnm.mx](mailto:dir_tijuana@tecnm.mx) | [tecnm.mx](http://tecnm.mx) | [Tijuana.tecnm.mx](http://Tijuana.tecnm.mx)



## Contenido

Carta de liberación de tesis .....	ii
Carta de autorización de impresión .....	iii
Carta de cesión de derechos.....	iv
Lista de abreviaturas .....	vii
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas .....	x
Anexos .....	xi
Agradecimientos .....	xii
Reconocimientos institucionales .....	xiii
Resumen .....	xiv
Publicaciones producto de la tesis .....	xv
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Planteamiento.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Objetivo general.....</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Objetivos específicos .....</b>	<b>3</b>
<b>III. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Biopolímeros en TERM.....</b>	<b>4</b>
3.1.1 CHI .....	5
3.1.2 ALG .....	10
<b>3.2 Hidrogeles PEC .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Hidrogeles de doble red .....</b>	<b>13</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>

<b>4.1</b>	<b>Caracterización mecánica de hidrogeles CHI-ALG PEC</b> .....	17
<b>4.2</b>	<b>Caracterización fisicoquímica de hidrogeles CHI-ALG PEC</b> .....	20
4.2.1	Determinación del grado de desacetilación del CHI .....	21
<b>4.3</b>	<b>Caracterización mecánica de hidrogeles CHI-ALG DN</b> .....	22
<b>4.4</b>	<b>Caracterización de las propiedades de superficie</b> .....	24
<b>4.5</b>	<b>Caracterización de las propiedades biológicas</b> .....	25
4.5.1	Citocompatibilidad .....	25
4.5.2	Adhesión y proliferación celular .....	26
<b>V.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	29
<b>5.1</b>	<b>Reactivos y solventes</b> .....	29
<b>5.2</b>	<b>Síntesis de hidrogeles CHI-ALG PEC</b> .....	29
<b>5.3</b>	<b>Síntesis de hidrogeles CHI-ALG DN</b> .....	30
<b>5.4</b>	<b>Técnicas analíticas</b> .....	30
5.4.1	Pruebas mecánicas .....	31
5.4.2	FTIR-ATR .....	32
5.4.3	Microscopía de fuerza atómica .....	32
<b>5.5</b>	<b>Pruebas biológicas</b> .....	32
5.5.1	Ensayos de citocompatibilidad .....	32
5.5.2	Adhesión y proliferación celular .....	33
<b>5.6</b>	<b>Análisis estadísticos</b> .....	34
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	35
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	36
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	40

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ALG	Alginato de sodio
CHI	Quitosano
DA	Grado de acetilación
DDA	Grado de desacetilación
DMEM	Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
E	Módulo de elasticidad
ECM	Matriz extracelular
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier
FTIR-ATR	FTIR de Reflectancia Total Atenuada
G	Ácido $\alpha$ -L-gulurónico
GA	Glutaraldehído
GA/NH <sub>2</sub>	Razón glutaraldehído/unidad repetitiva de quitosano
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
M	Ácido $\beta$ -D-manurónico
PECs	Complejos de polielectrolitos
PS	Fuerza de punción en la rotura
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TERM	Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa
TPP	Tripolifosfato de sodio

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química del CHI .....	6
<b>Figura 2.</b> Curva de calibración de A) $A_{1320}/A_{3450}$ y B) $A_{1320}/A_{1420}$ en función del grado de acetilación (DA).....	8
<b>Figura 3.</b> Diagrama de Carga vs. Desplazamiento de membranas reticuladas mediante la técnica de deposición química de vapor (A) y química en solución (B). El recuadro en (B) muestra un acercamiento de la curva CH04GA-S mostrando las tres zonas típicas de los materiales frágiles: la elástica (zona I), plástica (zona II), y deformaciones por fractura (zona III).....	9
<b>Figura 4.</b> Micrografía confocal de las membranas sembradas con dos líneas celulares (izquierda) y perfiles de topografía (derecha) .....	10
<b>Figura 5.</b> Estructura química del ALG .....	11
<b>Figura 6.</b> Esquema de la estructura de los PEC CHI/ALG.....	13
<b>Figura 7.</b> Esquema de la síntesis de hidrogeles CHI DN .....	15
<b>Figura 8.</b> Ensayo célula viva/célula muerta para viabilidad celular de los hidrogeles CHI DN .....	16
<b>Figura 9.</b> Curvas de carga vs. desplazamiento de hidrogeles CHI-ALG PEC a diferentes proporciones CHI:ALG .....	18
<b>Figura 10.</b> Resultados del análisis estadístico de A) Módulo de elasticidad, B) Fuerza de punción en la rotura, y C) Área bajo la curva de membranas CHI-ALG PEC. * Indica los datos en donde se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).....	19
<b>Figura 11.</b> Espectros de FTIR-ATR de A) CHI nativo, B) ALG nativo, C) hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2.....	20
<b>Figura 12.</b> Espectro de FTIR-ATR del CHI nativo .....	22
<b>Figura 13.</b> Curvas representativas de carga vs. desplazamiento de hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 a distintas relaciones GA/NH <sub>2</sub> .....	23
<b>Figura 14.</b> Perfiles de topografía de A) hidrogeles PEC 1:2, B) hidrogeles DN 1:2 (GA/NH <sub>2</sub> =4 mol%), y C) hidrogeles DN 1:2 (GA/NH <sub>2</sub> =14 mol%). D) Rugosidad de hidrogeles PEC e hidrogeles DN (GA/NH <sub>2</sub> =4 y 14 mol%).....	25

**Figura 15.** Citocompatibilidad de hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2 e hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 (GA/NH<sub>2</sub> = 4 y 14 mol%) ..... 26

**Figura 16.** Microscopía óptica de ensayos de adhesión y proliferación celular sobre la superficie de hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2 e hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 de GA/NH<sub>2</sub> = 4 mol% ..... 27

**Figura 17.** Imágenes de microscopia de fluorescencia confocal de ensayos de adhesión celular sobre la superficie hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 (GA/NH<sub>2</sub> = 4 mol%) 28

**Figura 18.** Cámaras para la reticulación en vapor ..... 30

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Módulo elástico (E), Fuerza de punción en la fractura (PS) y área bajo la curva de hidrogeles PEC a diferentes proporciones CHI:ALG .....	18
<b>Tabla 2.</b> Módulo elástico (E), Fuerza de punción en la rotura (PS) y área bajo la curva de hidrogeles CHI-ALG- DN 1:2 a diferentes relaciones GA/NH <sub>2</sub> .....	23

## Anexos

<b>Anexo 1.</b> Resultados del análisis estadístico ANOVA para valores calculados de E de hidrogeles CHI-ALG PEC.....	40
<b>Anexo 2.</b> Resultados del análisis estadístico ANOVA para valores calculados de PS de hidrogeles CHI-ALG PEC.....	41
<b>Anexo 3.</b> Resultados del análisis estadístico ANOVA para valores calculados de área bajo la curva de los gráficos de carga vs. desplazamiento de hidrogeles CHI-ALG PEC .....	42

## Agradecimientos

Al Tecnológico Nacional de México y el Instituto Tecnológico de Tijuana por abrirme las puertas a esta oportunidad. Y al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización del posgrado.

A mi comité tutelar por todo el apoyo, el tiempo prestado y la enorme cantidad de enseñanzas.

Al doctor Ignacio Rivero, usted es la razón que haya ingresado y permanecido en el programa de posgrado.

A mi madre, María Elena Ayala López, por su apoyo incondicional durante toda mi vida. Y a mi hermana Alyson que siempre me ha motivado a ser la mejor versión de mí.

A mis amigas, María del Carmen Corral y Samantha Ríos por estar siempre ahí para mí en los momentos más difíciles. A Vanessa, Ashlie, Natalia y Columba por todo lo que hacen, son unas mujeres increíbles y las admiro muchísimo.

Finalmente, a mis compañeros de laboratorio Michelle y Saúl, porque ustedes hicieron el trabajo mil veces más divertido. Y a mis compañeros de generación Adrián, Eduardo, Brandon, Gonzalo, Víctor y Saúl, por su gran compañerismo y apoyo en los momentos difíciles de estudio.

## Reconocimientos institucionales

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de Cultivo Celular y Microscopía Confocal del Grupo de Biomateriales y Nanomedicina del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana, bajo la dirección de:

**Dr. Manuel Alatorre Meda**

Y la codirección de:

**Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez**

Se agradece el financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para la realización de los estudios de posgrado (No. de registro 1032953) y el desarrollo de esta investigación a través de los proyectos No. INFR-2015-251863 y PDCPN-2015-89.

Asimismo, el suscrito agradece al Instituto Tecnológico de Tijuana por el apoyo brindado para la realización de estos estudios.

## Resumen

### **“Membranas de quitosano y alginato de doble red con potencial aplicación en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa”**

Por:

**I.Q. Melanie Zavala Ayala**

**Dr. Manuel Alatorre Meda**

Director de tesis

**Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez**

Codirectora de tesis

Los hidrogeles de doble red (DN, por sus siglas en inglés) han sido ampliamente estudiados en el contexto de la biomedicina debido a sus extraordinarias propiedades mecánicas. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos se utiliza por lo menos un polímero de origen sintético, lo cual puede representar desafíos en términos de biocompatibilidad y biodegradabilidad. En este proyecto se sintetizaron hidrogeles de doble red a partir de dos polímeros naturales, quitosano (CHI) y alginato (ALG), mediante la complejación de los polielectrolitos, seguida de un entrecruzamiento covalente de la red de CHI con glutaraldehído (GA) para producir la DN. Las proporciones CHI:ALG y GA/NH<sub>2</sub> que resultaron en las mejores propiedades mecánicas fueron elucidadas; así como la topografía, citocompatibilidad y adhesión celular.

## Publicaciones producto de la tesis

Presentación oral “*Double network chitosan-alginate hydrogel membranes for cell culture*” en el “XII Simposio Internacional: Investigación Química en la Frontera” del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana, llevado a cabo del 17 al 19 de noviembre de 2021 en Tijuana, Baja California, México.

Ponencia “*Double network chitosan-alginate hydrogel membranes with potential application in TERM*” en el “4to Coloquio en Materiales de Interés Biotecnológico (CMIB–2021): *Perspectivas en la Salud Humana*” de la Universidad de Sonora, llevado a cabo el 2 y 3 de diciembre de 2021 en Ciudad Obregón, Sonora, México.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Existen múltiples causas para la pérdida de órganos y tejidos, desde lesiones traumáticas hasta numerosas enfermedades degenerativas. Si bien la medicina actual cuenta con protocolos para el tratamiento de estas afecciones, las soluciones que proporciona son imperfectas y frecuentemente derivan en complicaciones graves. Algunos de los problemas más frecuentes son la compatibilidad de donantes, rechazo del sistema inmunitario, infecciones y cantidad limitada de tejido, entre otras.<sup>1</sup>

Aunado a esto, según un estudio realizado por Argüero-Sánchez y colaboradores, entre los años 2007 y 2018, la tasa de pacientes en espera de trasplante en México aumentó un 309%,<sup>2</sup> mientras que la tasa de donantes por millón de población permaneció en 4.3 (pmp), muy por debajo de la media de América Latina (8.2 pmp).<sup>3</sup> Todo esto ha impulsado el desarrollo de alternativas como órganos mecánicos artificiales, xenotrasplantes y la ingeniería de tejidos.<sup>4</sup>

La ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (TERM, por sus siglas en inglés) es una disciplina relativamente nueva con un enfoque interdisciplinario que integra conocimientos de áreas como la bioingeniería, medicina y ciencia de los materiales, con el objetivo de crear sustitutos biológicos a través de la combinación de andamios, células y moléculas biológicamente activas para la regeneración o creación de tejidos funcionales.<sup>5,6</sup>

Los hidrogeles de doble red (DN, por sus siglas en inglés) son sistemas reticulados especializados, constituidos por redes interpenetradas con reticulación de distinta naturaleza: una con reticulación covalente y la otra con reticulación no covalente. Se diferencian de las redes interpenetradas y semi interpenetradas (IPNs y semi-IPNs, por sus siglas en inglés) ya que las primeras se tratan de dos redes entrecruzadas de manera covalente, y las segundas constan de una red meramente enredada o dispersa en la otra reticulada covalentemente.

En cuanto a los hidrogeles DN, generalmente se trata de un primer polímero con gran rigidez, de alto peso molecular y altamente entrecruzado de manera covalente, combinado con un segundo de menor peso molecular, menor grado de reticulación (no covalente) y propiedades más elásticas.<sup>7</sup> Estos hidrogeles de doble red han ganado interés en la comunidad

científica gracias a que poseen alta resistencia a la fractura, lo cual los vuelve candidatos excepcionales como andamios celulares para aplicaciones en TERM.<sup>8</sup>

Algunos de los materiales más ampliamente estudiados para la elaboración de andamios celulares son los polisacáridos. Éstos son polímeros de origen natural, por lo que poseen propiedades idóneas para aplicaciones en TERM, ya que son fácilmente modificables química y bioquímicamente, son altamente estables, biocompatibles, hidrofílicos, tienen la capacidad de formar geles y frecuentemente son biodegradables en condiciones fisiológicas. Además, los polisacáridos son capaces de promover funciones biológicas importantes, tales como la señalización celular, reconocimiento inmunológico, cicatrización de heridas y regeneración de tejidos.<sup>9,10</sup>

Algunos de los polisacáridos más utilizados para aplicaciones en TERM son el quitosano (CHI) y el alginato (ALG). El CHI se obtiene de la desacetilación parcial o por hidrólisis enzimática de la quitina. La quitina es un polisacárido natural y es el polímero más abundante después de la celulosa, éste se encuentra en el exoesqueleto de artrópodos y en la pared celular de hongos y levaduras.<sup>11</sup>

El CHI está compuesto por unidades repetitivas de D-glucosamina y N-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$  (1-4).<sup>11</sup> Por otra parte, el ALG es un polisacárido derivado de las algas marinas. Se trata de un copolímero aniónico compuesto por bloques de residuos de  $\beta$ -D-manuronato y  $\alpha$ -L-guluronato unidos igualmente por enlaces  $\beta$  (1-4).<sup>12</sup>

En el presente proyecto se plantea la síntesis y caracterización de membranas producidas a base de los polímeros naturales CHI y ALG mediante la metodología DN para su aplicación tentativa como andamios celulares para cultivo celular y regeneración tisular.

## **II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

### **2.1 Planteamiento**

Andamios celulares de la naturaleza propuesta brindan el potencial de desplegar perfiles de biocompatibilidad y biodegradabilidad sobresalientes, además de exhibir propiedades mecánicas y de superficie modulables. Lo anterior sin mencionar que la metodología de elaboración es amigable tanto con el cuerpo humano como con el medio ambiente.

### **2.2 Objetivo general**

El objetivo general del presente proyecto es sintetizar membranas de CHI y ALG siguiendo la metodología DN y evaluar su aplicación como sustratos para sembrado y proliferación celular.

### **2.3 Objetivos específicos**

- Elaborar membranas de CHI y ALG de doble red variando las proporciones de los polisacáridos
- Caracterizar las propiedades mecánicas mediante pruebas de punción
- Caracterizar las propiedades químicas y de superficie de las membranas mediante ensayos de FTIR-ATR y AFM
- Evaluar la viabilidad celular mediante microscopía óptica y confocal
- Realizar pruebas de citocompatibilidad mediante ensayos ELISA
- Efectuar estudios de adhesión y proliferación celular

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Biopolímeros en TERM

La TERM es una disciplina que ha surgido como alternativa a los trasplantes de órganos y tejidos. Ésta se enfoca en la creación de sustitutos biológicos que sirvan para restaurar, mantener o mejorar la función de tejidos u órganos completos. Esto se logra mediante la combinación de andamios celulares, células vivas y algunas moléculas bioactivas. Comúnmente se emplean dos estrategias distintas para TERM, la primera consiste en tomar una biopsia de células sanas autógenas del paciente, las cuales son sembradas en andamios poliméricos biocompatibles y estériles. Una vez que las células alcanzan cierto grado de proliferación, los materiales son implantados en el paciente.<sup>13</sup>

Estos andamios celulares son matrices extracelulares (ECM, por sus siglas en inglés) exógenas, con propiedades mecánicas similares a las del tejido a reemplazar y que favorece la adhesión y proliferación celular y generalmente son cargados con sustancias bioactivas, como factores de crecimiento. En etapas tempranas posteriores a la implantación, los andamios proporcionan una matriz 3D temporal definida, la cual soporta y dirige el crecimiento celular. Posteriormente, a medida que avanza el proceso de curación, el andamio implantado debería degradarse o reabsorberse mientras se forma el tejido nuevo.<sup>6</sup>

Una segunda estrategia para la TERM implica la utilización de andamios acelulares para el tratamiento de heridas superficiales. Los andamios acelulares son colocados sobre el tejido dañado y provocan su regeneración actuando como puentes entre los segmentos rotos. De la misma manera que los andamios celulares, los andamios acelulares guían la reparación del tejido presentando propiedades mecánicas y de superficie ajustables que en conjunto promueven la adhesión y proliferación de las células.

Sea cual sea el tipo de andamio que se elabore, existen ciertas propiedades de los tejidos a los que los andamios deben adaptarse. Asimismo, estos pueden tomar distintas arquitecturas según la aplicación deseada, como membranas, tubos, geles, o matrices 3D. La arquitectura del andamio debe permitir la intrusión celular, un correcto intercambio de nutrientes y materiales de desecho y la formación de una nueva red capilar. En particular, la

microporosidad es importante para el crecimiento capilar y las interacciones entre las células y la matriz, mientras que la macroporosidad es importante para el correcto suministro de nutrientes y la eliminación de productos de desecho del metabolismo celular.<sup>1</sup>

Algunos de los materiales más utilizados para la elaboración de andamios en TERM son los polímeros de origen natural, también conocidos como biopolímeros. Los biopolímeros son polímeros producidos por células de organismos vivos, éstas los producen para la formación de su ECM, lo cual convierte a los biopolímeros en sustancias bastante afines a células y moléculas endógenas y por lo general son biocompatibles y biodegradables.

Los polisacáridos, son una especie de biopolímeros. Se trata de polímeros de origen natural constituidos por monosacáridos, azúcares simples unidos entre sí por enlaces glicosídicos. Los polisacáridos poseen una amplia variedad de propiedades, una gran versatilidad química, la capacidad para unirse a señales bioquímicas y la capacidad de ajustar tanto propiedades mecánicas como la biodegradabilidad.<sup>14,6</sup>

Entre los polisacáridos más utilizados para la elaboración de andamios celulares están el CHI, ALG, colágeno, glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico (HA), dextrano, heparina y almidón, entre otros. Los polisacáridos de interés para este proyecto son el CHI y el ALG. A continuación, se hablará un poco sobre ambos.

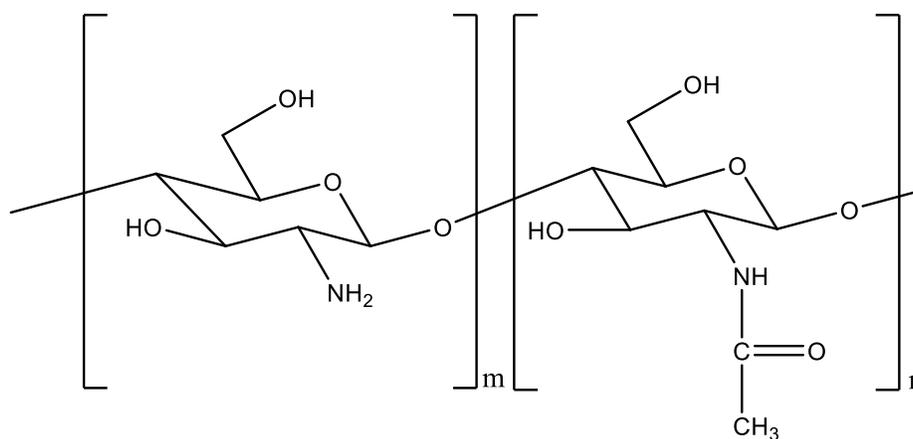
### 3.1.1 CHI

El CHI es un polisacárido que se obtiene a partir de la desacetilación o hidrólisis enzimática de la quitina. La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, se puede encontrar en el exoesqueleto de artrópodos, en conchas de crustáceos y cutículas de insectos. El CHI, aunque también encontrado en la pared celular de hongos y levaduras, es producido de manera industrial por hidrólisis alcalina de la quitina.<sup>15</sup>

Químicamente hablando, el CHI se compone por unidades de D-glucosamina, con unidades residuales de N-acetil-D-glucosamina interdispersadas de manera aleatoria (Figura 1). El tipo de quitosano puede ser identificado por la fracción de unidades desacetiladas o acetiladas residuales en las cadenas poliméricas, estos datos son conocidos como grado de desacetilación (DDA) y grado de acetilación (DA), respectivamente; y son de gran

importancia en el estudio de materiales elaborados con CHI, ya que la composición influye en gran medida en las propiedades fisicoquímicas como solubilidad, reactividad, biodegradabilidad, e incluso, la respuesta celular.<sup>16</sup>

También dictado por el DA, el CHI posee grupos amino con valores de pKa de alrededor de 6.3-6.5, lo cual lo vuelve soluble en soluciones ácidas diluidas y además lo convierte en un bioadhesivo en condiciones fisiológicas. La presencia de estos grupos amino protonables le brinda al CHI la capacidad de formar complejos polielectrolíticos (PEC, por sus siglas en inglés).



**Figura 1.** Estructura química del CHI

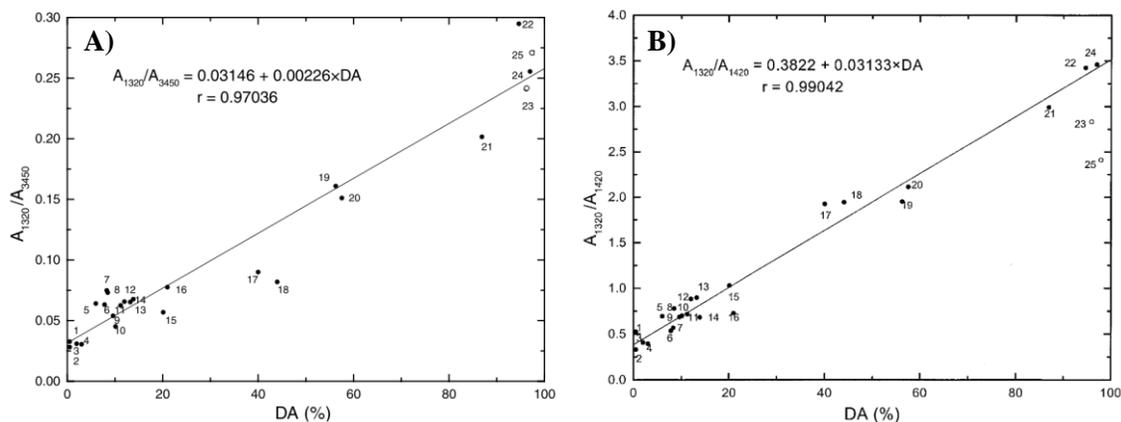
Puesto que la composición del CHI suele variar en gran medida por la fuente y el organismo del que se aísla, así como el proceso de preparación del mismo, existen múltiples métodos para la determinación del DA o DDA. Las técnicas analíticas más utilizadas incluyen la Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR), la Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ), espectrofotometría de UV, titulación potenciométrica, titulación ácido-base y espectroscopía Raman, entre otras.<sup>17</sup> La elección de la técnica de caracterización más adecuada para cada caso particular no suele ser tarea fácil, ya que la variación en los métodos de aislamiento y preparación del CHI, así como la variación en su composición suscitan que algunos métodos no funcionen del todo bien para

ciertas muestras en particular, y esto se ve reflejado en la gran cantidad de métodos distintos que se han desarrollado para la determinación de estos parámetros.

La espectroscopía de Infrarrojo (IR) ha sido la técnica más ampliamente utilizada para la determinación del DA y DDA, y frecuentemente es utilizada como punto de comparación con otras técnicas analíticas. Se trata de una técnica sumamente atractiva, ya que no es destructiva, es rápida, sensible, de bajo costo, adecuada para muestras solubles y no solubles, y no requiere una preparación específica de la muestra. El uso del IR para este propósito requiere la construcción de una línea de calibración utilizando las proporciones de las absorbancias ( $A$ ) de una banda de medición (BM), la cual cambie de intensidad a medida que cambia el DA, con respecto a una banda de referencia (BR) que no cambie de intensidad con el DA, contra valores estándar de DA. Las absorbancias de BM y BR son determinadas mediante la metodología de la línea base.<sup>18</sup>

Las BM más comúnmente utilizadas han sido la banda de estiramiento de carbonilo (amida I) y la señal de flexión del enlace NH de amida II, las cuales muy claramente cambian de intensidad con el DA. Sin embargo, estas señales están afectadas por proteínas remanentes y por la unión del calcio a la matriz de quitina y quitosano. Por otro lado, las BR más comúnmente utilizadas son correspondientes a los estiramientos de enlaces OH y CH en 3448 y 2877  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.<sup>16</sup>

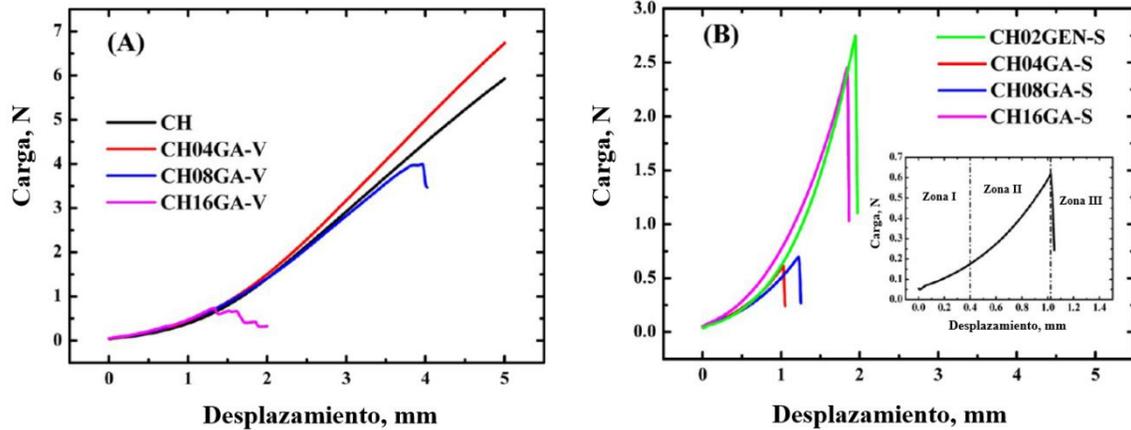
Rinaudo y colaboradores evaluaron la utilización de las bandas encontradas en 1650 y 1320  $\text{cm}^{-1}$  para la medición del DA y las bandas ubicadas en 3450 y 1420  $\text{cm}^{-1}$  como referencia interna. La relación de las  $A$  de las bandas seleccionadas se calibró usando  $^1\text{H}$  líquido y  $^{13}\text{C}$  CP-MAS en estado sólido como técnicas absolutas. En este estudio, se encontró que relaciones de absorción de las bandas que involucran la banda de referencia en 3450  $\text{cm}^{-1}$  tuvieron un ajuste más pobre. La proporción de absorbancias  $A_{1320}/A_{1420}$  muestra mayor concordancia entre los valores de DA absolutos y estimados, observado en los valores de  $r$  y en el error experimental más estrecho independientemente de la técnica y estado del material (Figura 2).<sup>18</sup>



**Figura 2.** Curva de calibración de A)  $A_{1320}/A_{3450}$  y B)  $A_{1320}/A_{1420}$  en función del grado de acetilación (DA)

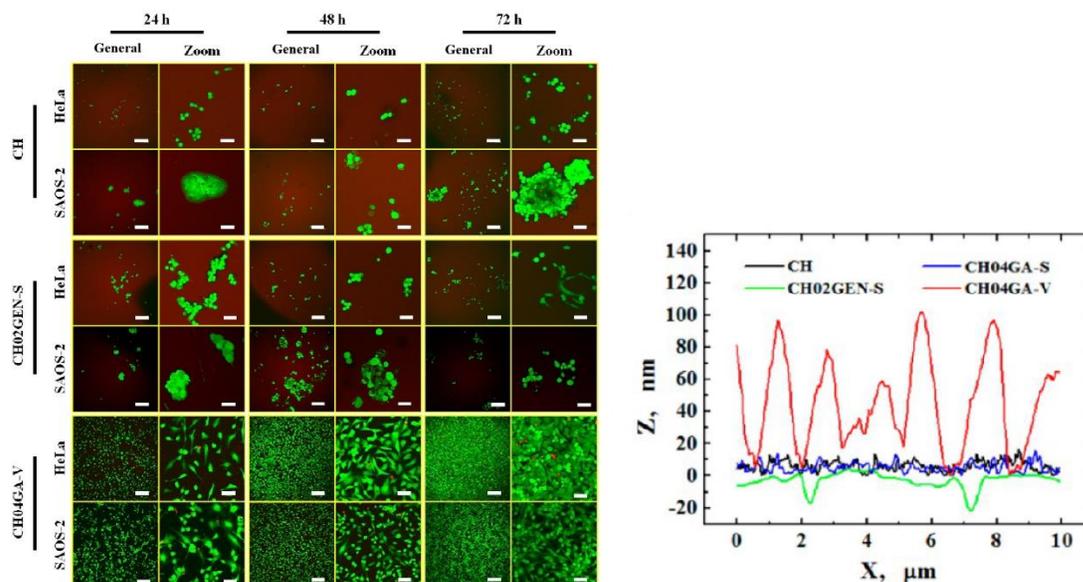
Hasta la actualidad, el CHI se ha utilizado para la elaboración de una gran cantidad de materiales con aplicaciones biomédicas. Hoy en día existen numerosos materiales a base de CHI en el mercado tales como *Chitoflex*<sup>®</sup>, *Chitopack C*<sup>®</sup>, *Chitopoly*<sup>®</sup>, *Chitosan Skin*<sup>®</sup> y *Chitoseal*<sup>®</sup>, entre otros.<sup>11</sup>

En un estudio reportado por Rodríguez-Velázquez y colaboradores se revela un método simple y novedoso para incrementar la afinidad celular de membranas de CHI mediante la reticulación superficial con vapor de glutaraldehído (GA). Estas membranas fueron caracterizadas en términos de sus propiedades mecánicas mediante ensayos de punción utilizando una membrana de CHI sin reticular como control y haciendo la comparación con membranas reticuladas mediante una metodología en solución utilizando un reticulante natural llamado Genipin. El estudio reveló un comportamiento meramente elástico y plástico para las membranas reticuladas con 4% mol de GA. Aquellas reticuladas con un porcentaje mayor llegaron al punto de fractura al igual que las que fueron reticuladas con Genipin; sin embargo, las primeras llegaron a soportar una carga mucho mayor antes de llegar al punto de fractura (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de Carga vs. Desplazamiento de membranas reticuladas mediante la técnica de deposición química de vapor (A) y química en solución (B). El recuadro en (B) muestra un acercamiento de la curva CH04GA-S mostrando las tres zonas típicas de los materiales frágiles: la elástica (zona I), plástica (zona II), y deformaciones por fractura (zona III)

Las membranas de quitosano entrecruzadas con GA en vapor también fueron sembradas con dos líneas celulares: HeLa (cáncer cervicouterino) y SAOS-2 (osteosarcoma) con la finalidad de evaluar la citocompatibilidad y la adhesión y proliferación celular. El ensayo de calceína-AM/ioduro de propidio reveló que aquellas membranas entrecruzadas con vapor de GA presentan la mejor adhesión celular (células teñidas de verde) en comparación con las otras membranas (Figura 4). Asimismo, se llevaron a cabo estudios de AFM con la finalidad de medir la topografía y rugosidad de las membranas. Se observó una rugosidad aumentada en las membranas reticuladas con un porcentaje molar de 4% de vapor de glutaraldehído (Figura 4). Los autores mencionan que esta rugosidad conferida por el entrecruzamiento superficial con vapor de glutaraldehído fue la variable experimental que favoreció la adhesión y proliferación celular.<sup>19</sup>



**Figura 4.** Micrografía confocal de las membranas sembradas con dos líneas celulares (izquierda) y perfiles de topografía (derecha)

### 3.1.2 ALG

El ALG es un polisacárido bastante abundante en la naturaleza, está presente en la ECM de las algas marinas marrones y como polisacárido capsular en las bacterias del suelo.<sup>20</sup> Éste es ampliamente utilizado en diversas industrias como la textil, alimentaria, papelera, cosmética, biomédica y farmacéutica debido a su gran capacidad para retener agua y sus propiedades reológicas como gelación, viscosificación y estabilización de dispersiones. Adicionalmente, el ALG es biocompatible, de bajo costo, posee propiedades cicatrizantes, y su capacidad para la retención de agua lo vuelve muy apropiado como matriz de inmovilización para diversas aplicaciones, tales como la liberación o suministro de fármacos, genes, o células en TERM.<sup>21</sup>

Los alginatos son sales de ácido algínico que están compuestas por residuos de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) y ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) unidos de manera  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$ , respectivamente (Figura 5) de secuencias variables dependiendo del organismo y del tejido del que se aísla. Las cadenas están formadas de segmentos aleatorios de bloques G y M que se intercalan con segmentos de bloques MG. Los alginatos en general son moléculas rígidas

debido a la rigidez de los anillos de azúcares y a la restricción de movimiento alrededor del enlace glicosídico. Además, la repulsión electrostática de los grupos cargados negativamente contribuye aún más a la rigidez de las cadenas. Igualmente, es conocido que además de la fuerza iónica, la composición del alginato tiene gran influencia en la rigidez de las cadenas aumentando en el orden  $GM < MM < GG$ . De la misma manera, las propiedades mecánicas y fisicoquímicas del ALG también dependen fuertemente de las secuencias de estos bloques.<sup>22</sup>

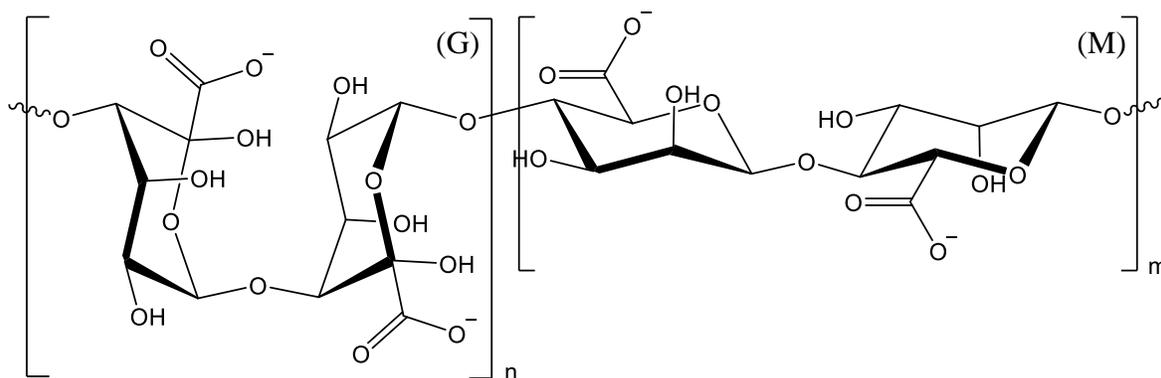


Figura 5. Estructura química del ALG

Puesto que las propiedades de los alginatos están determinadas en gran medida por la cantidad relativa de los tres tipos de bloques presentes en el copolímero, la relación M/G es un parámetro importante para la naturaleza de los materiales sintetizados a partir de ALG. Se ha reportado en la literatura que geles obtenidos de ALGs con bajas proporciones M/G presentan comportamientos frágiles, mientras que proporciones M/G altas producen materiales más elásticos.<sup>23</sup>

Por otro lado, la gelación del ALG depende de las interacciones de los bloques G con iones positivos, generalmente  $Ca^{2+}$ , esto provoca asociaciones cadena-cadena y la formación de zonas de unión. Se ha observado un aumento en el enlace selectivo del ion  $Ca^{2+}$  a medida que aumenta la cantidad de bloques G, mientras que los bloques poli-M y GM muestran menor selectividad hacia este ion. El enlace se produce a través de la formación de estructuras tipo “caja de huevos” que ocurren en regiones con alto contenido de bloques G.<sup>20</sup>

### 3.2 Hidrogeles PEC

Los hidrogeles son redes entrecruzadas de polímeros hidrófilos que tienen la capacidad de retener grandes volúmenes de agua, desde un 10-20%, hasta miles de veces su peso seco en agua.<sup>24</sup> Por lo general, los hidrogeles se clasifican en dos: hidrogeles *reversibles* o “físicos”, e hidrogeles *permanentes* o “químicos”. Se les llama hidrogeles físicos cuando las cadenas se encuentran unidas entre sí por entrelazamiento molecular y/o fuerzas secundarias como interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno o fuerzas hidrofóbicas. Por otro lado, son hidrogeles *permanentes* cuando las redes poliméricas se encuentran entrecruzadas de manera covalente.<sup>24</sup>

En hidrogeles reticulados, las cadenas poliméricas se encuentran conectadas por agentes reticulantes, lo que conduce a la formación de una red 3D. Los agentes reticulantes son moléculas de pesos moleculares mucho menores al peso de las cadenas entre dos reticulaciones consecutivas. Las propiedades de los hidrogeles reticulados dependen principalmente del grado de reticulación, es decir, la relación molar de agente reticulante entre la unidad repetitiva del polímero.<sup>25</sup>

Los hidrogeles físicos suelen no ser homogéneos, ya que suelen crearse sitios de mayor enredamiento molecular o dominios asociados de manera iónica o hidrofóbica que crean inhomogeneidades. Extremos de cadenas sueltas o bucles en las cadenas también pueden representar defectos en los hidrogeles físicos. Cuando se mezclan polielectrolitos de cargas opuestas, estos pueden gelificar o precipitar, dependiendo de sus concentraciones, fuerza iónica y pH de la solución. Los materiales resultantes de este entrecruzamiento iónico se conocen como coacervados, complejos de poliiones o polielectrolitos (PECs, por sus siglas en inglés).

Los PECs generalmente se obtienen de mezclar simultáneamente polielectrolitos de carga opuesta en solución, en ausencia de cualquier reticulante químico. Al contrario de los hidrogeles químicos, los PECs suelen ser no tóxicos y biocompatibles, ya que los entrecruzantes químicos con frecuencia pueden presentar toxicidad, en caso de que existan trazas o residuos de los mismos en el material antes de su administración.

Gierszewska y colaboradoras reportan la síntesis de membranas de hidrogel de CHI y ALG mediante complejación de polielectrolitos, seguida de un reforzamiento con tripolifosfato de sodio (TPP). Estas membranas fueron caracterizadas en términos de sus propiedades físicas y químicas, poniendo especial interés en el hinchamiento para una potencial aplicación en liberación de fármacos. La Figura 6 muestra una representación esquemática de la estructura de los hidrogeles CHI/ALG elaborados vía PEC.

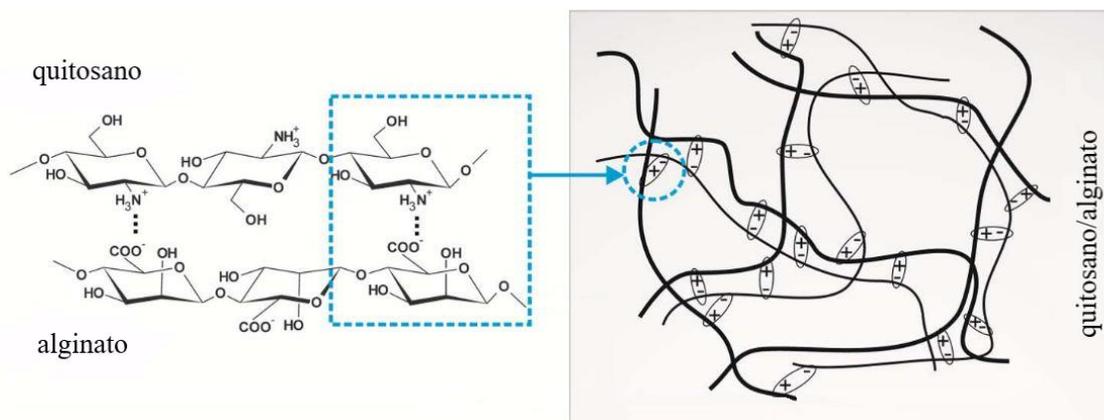


Figura 6. Esquema de la estructura de los PEC CHI/ALG

Por otro lado, Chen y colaboradores reportan la síntesis de membranas de CHI recubiertas con ALG para la regeneración guiada de tejido. Estas mostraron un mayor contenido de agua (71.8%) al ser comparadas con membranas de CHI (61.8%). Consecuentemente, estas membranas ALG/CHI se volvieron más rígidas y presentaron una fuerza y módulo de Young mayores.<sup>26</sup>

### 3.3 Hidrogeles de doble red

Los hidrogeles DN han surgido como una mejora a los hidrogeles IPN y semi-IPN. Un hidrogel semi-IPN resulta de la reticulación covalente de un polímero y el enredamiento físico (sin reticulación) de un segundo polímero. Este tipo de hidrogeles (semi-IPN) son relativamente resistentes a estrés mecánico debido a la naturaleza covalente de la red

polimérica de uno de los polímeros. Sin embargo, presentan respuesta de fractura ante cargas de moderadas a altas.<sup>25</sup>

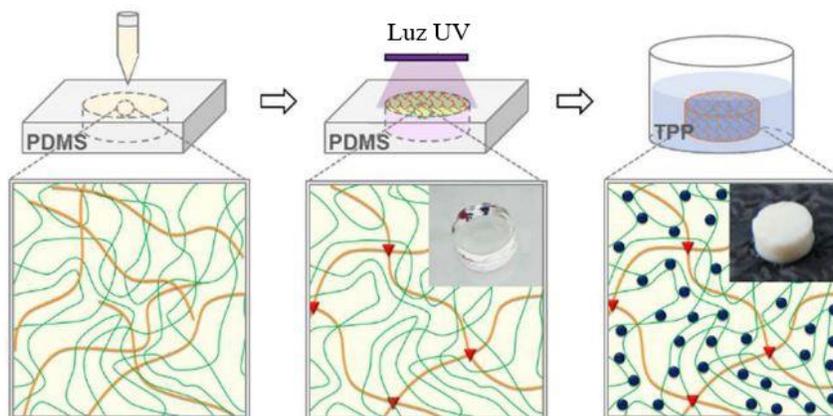
Por otro lado, los hidrogeles IPN resultan de la reticulación covalente, conjunta de dos polímeros; estos sistemas son robustos mecánicamente hablando, sin embargo, también presentan respuesta de fractura ante esfuerzos de moderados a relativamente altos.<sup>27</sup>

Como alternativa, los hidrogeles DN se componen de dos redes reticuladas independientemente. Una primera red polimérica reticulada de manera covalente, y una segunda reticulada de manera no covalente o física. Esta diferencia estructural propicia una mejora sustancial en la resistencia mecánica puesto que la segunda red tiene la capacidad de disipar energía al reorganizarse.<sup>7</sup>

Sin embargo, la mayoría de los hidrogeles DN estudiados en la actualidad, contienen polímeros sintéticos como componente principal e indispensable, lo cual puede resultar en mala biocompatibilidad y biodegradabilidad y limita sus aplicaciones en TERM.

Por otro lado, es más complejo diseñar hidrogeles a base de biopolímeros que posean alta dureza debido a la capacidad de diseño relativamente pobre al trabajar con polímeros naturales.<sup>28</sup> Sin embargo, en años recientes, varios grupos han logrado sintetizar hidrogeles duros basados en biopolímeros.

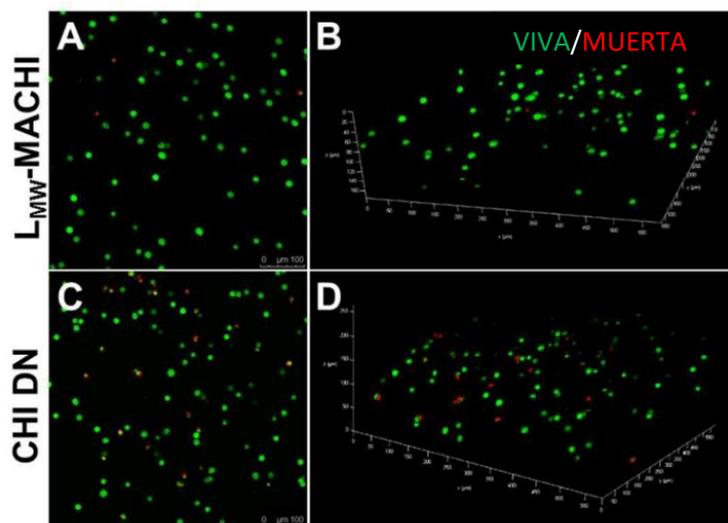
Un ejemplo es el trabajo elaborado por Costa y Mano,<sup>29</sup> en el cual se reporta la síntesis de un hidrogel DN altamente robusto a partir de un único precursor, CHI, combinando mecanismos de reticulación químicos y físicos. La Figura 7 muestra el esquema general de la síntesis de los hidrogeles DN.



**Figura 7.** Esquema de la síntesis de hidrogeles CHI DN

Dos derivados del CHI (CHI de bajo peso molecular funcionalizado con grupos metacrilato (LMW-MACHI) y CHI de peso molecular medio (MMW-CHI)) fueron mezclados con un fotoiniciador (I2959) y una base débil ( $\beta$ -glicerolfosfato). Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de reticulación dual, en el que los grupos metacrílicos del LMW-MACHI fueron expuestos a rayos UV para su reticulación covalente; seguido de reticulación iónica de las especies amina protonadas en el MMW-CHI tras la inmersión del hidrogel en una solución de TPP.

Los hidrogeles resultantes CHI DN poseían una composición y morfología homogéneas, no se fracturaron tras una deformación del 90% y presentaron una resistencia a la compresión de 19.48 MPa. Además, los hidrogeles CHI DN presentaron una alta viabilidad celular tras 24 h de cultivo en condiciones fisiológicas, tal como fue demostrado mediante el ensayo de célula viva/célula muerta (Figura 8).



**Figura 8.** *Ensayo célula viva/célula muerta para viabilidad celular de los hidrogeles CHI DN*

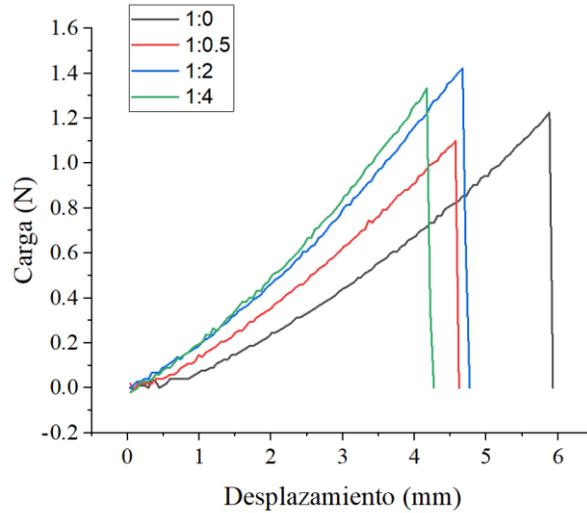
## IV. RESULTADOS

Este proyecto se divide en dos etapas. La primera etapa se enfoca en la síntesis de hidrogeles CHI-ALG mediante una metodología de complejación de polielectrolito (PEC), así como la caracterización de los hidrogeles sintetizados y los polisacáridos precursores. Las actividades realizadas en esta etapa incluyen la síntesis de hidrogeles CHI-ALG PEC a diferentes proporciones CHI:ALG (i), la evaluación de las propiedades mecánicas de los mismos (ii) y la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los precursores e hidrogeles elaborados (iii).

La segunda etapa está enfocada en la preparación de hidrogeles CHI-ALG DN mediante la reticulación covalente de la red de CHI con glutaraldehído (GA) en fase vapor de los hidrogeles PEC previamente sintetizados, así como la caracterización mecánica, fisicoquímica y biológica de los mismos. Las actividades realizadas en esta etapa incluyen la síntesis de los hidrogeles CHI-ALG PEC (i), la reticulación covalente en fase vapor con GA para formar los hidrogeles CHI-ALG DN (ii), la evaluación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles DN (iii), la caracterización de las propiedades de superficie mediante AFM (iv) y la evaluación de las propiedades biológicas mediante ensayos de citocompatibilidad, adhesión y proliferación celular (v).

### 4.1 Caracterización mecánica de hidrogeles CHI-ALG PEC

Para la elección de las mejores condiciones de preparación de los hidrogeles DN, se realizaron ensayos mecánicos de punción en hidrogeles CHI-ALG PEC sintetizados a diferentes proporciones CHI:ALG. La Figura 9 muestra las curvas de carga vs. desplazamiento representativas de los hidrogeles CHI-ALG PEC estudiados, comparadas con una membrana de CHI nativo (proporción CHI:ALG 1:0). Se puede apreciar en el gráfico que aparentemente los hidrogeles con mejor respuesta mecánica después de la membrana de CHI nativo son los de proporción CHI:ALG 1:2. Sin embargo, la curva de la proporción 1:4 se observa bastante cercana.



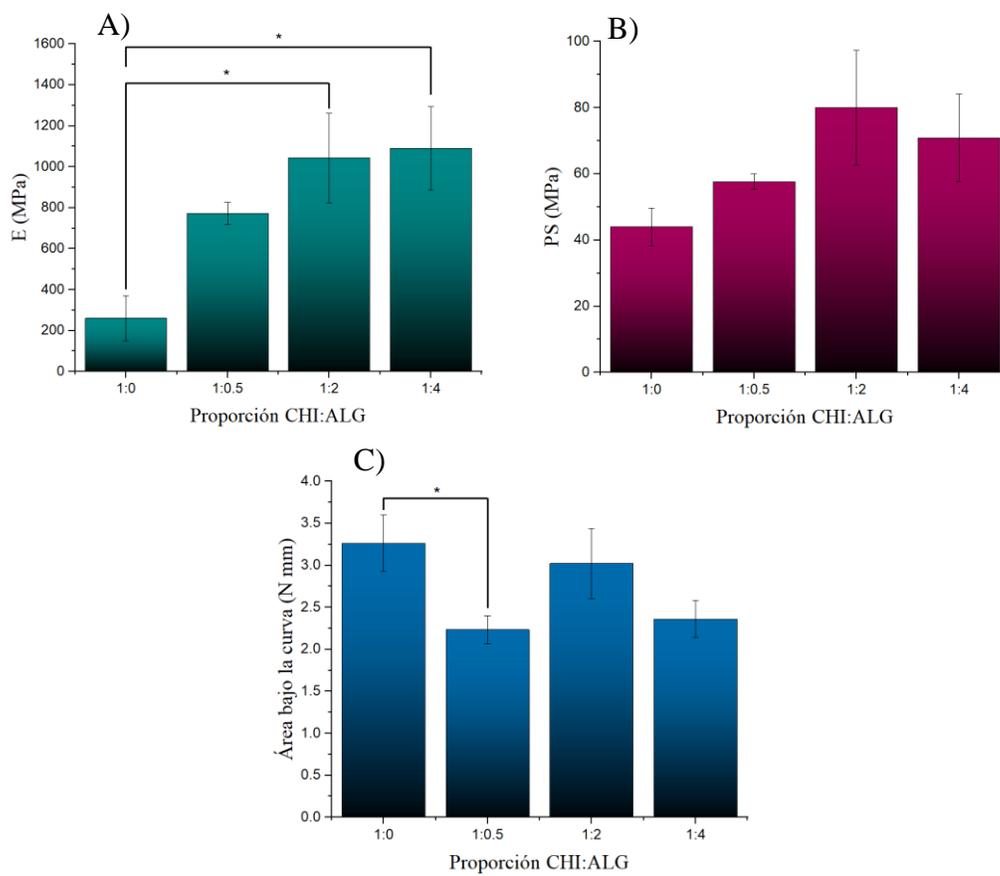
**Figura 9.** Curvas de carga vs. desplazamiento de hidrogel CHI-ALG PEC a diferentes proporciones CHI:ALG

**Tabla 1.** Módulo elástico (E), Fuerza de punción en la fractura (PS) y área bajo la curva de hidrogel PEC a diferentes proporciones CHI:ALG

Muestra	E [MPa]	PS [MPa]	Área bajo la curva [N mm]
<b>1:0</b>	260.10 ± 135.35	43.94 ± 6.92	3.26 ± 0.416
<b>1:0.5</b>	773.23 ± 62.61	57.66 ± 2.69	2.23 ± 0.194
<b>1:2</b>	1043.2 ± 268.01	79.99 ± 21.22	3.02 ± 0.515
<b>1:4</b>	1090.5 ± 250.53	70.78 ± 16.22	2.36 ± 0.271

Se calculó el módulo de elasticidad (E), fuerza de punción en la fractura (PS) y área bajo la curva de todas las muestras procesadas a partir de las curvas obtenidas y las dimensiones de cada muestra, utilizando las ecuaciones 1 y 2 (ver sección experimental). Los resultados se muestran en a Tabla 1.

Utilizando estos datos se llevó a cabo el análisis estadístico ANOVA, acompañado de las pruebas de Tukey y Bonferroni, para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes formulaciones. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 10 y Anexos 1-3.

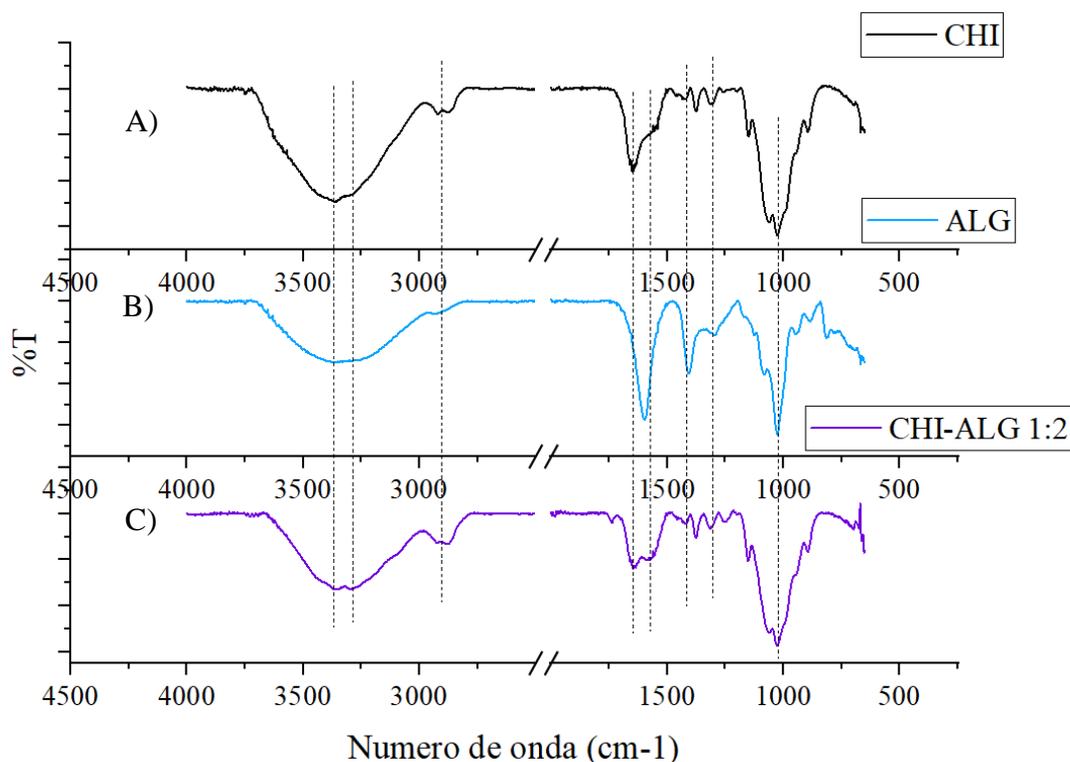


**Figura 10.** Resultados del análisis estadístico de A) Módulo de elasticidad, B) Fuerza de punción en la rotura, y C) Área bajo la curva de membranas CHI-ALG PEC. \* Indica los datos en donde se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )

En cuanto al módulo de elasticidad (Figura 10 A), solamente se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las membranas de proporción CHI:ALG 1:0 y 1:2 y entre las membranas de 1:0 y 1:4. En el caso de la fuerza de punción en la fractura (Figura 10 B) no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ninguna de las diferentes membranas, sin embargo, en ese caso la formulación que proporciona la mejor respuesta mecánica resulta ser la de proporción 1:2. Finalmente, el análisis del área bajo la curva (análogo al módulo de tenacidad) mostró una diferencia estadísticamente significativa entre las membranas de proporción 1:0 y 1:0.5. Con esto se concluyó que la membrana CHI-ALG PEC sintetizada con proporciones 1:2 resulta ser la que posee propiedades mecánicas más prometedoras y fue seleccionada para la preparación de los hidrogeles CHI-ALG DN.

## 4.2 Caracterización fisicoquímica de hidrogeles CHI-ALG PEC

Se caracterizaron los polvos de los polisacáridos nativos e hidrogeles PEC mediante Espectroscopía de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FT-IR) acoplada a una sonda de Reflectancia Total Atenuada (ATR), los espectros obtenidos se observan en la Figura 11.



**Figura 11.** Espectros de FTIR-ATR de A) CHI nativo, B) ALG nativo, C) hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2

Se pueden observar picos típicos para ambos polisacáridos, como la banda de estiramiento -OH que aparece entre  $3720$  y  $2980\text{ cm}^{-1}$ , que, en el caso del CHI, esta banda se solapa con la señal de  $-\text{NH}_2$ . También se observa la banda correspondiente a los enlaces C-H entre  $2912$  y  $2862\text{ cm}^{-1}$ , y la banda correspondiente al enlace C-O en  $1020\text{ cm}^{-1}$ .<sup>30,19</sup> Estas bandas se repiten en el espectro del hidrogel CHI-ALG PEC, lo cual era esperado, ya que al haber interacción iónica entre ambos polisacáridos no ocurre ningún cambio en la estructura química de ellos.

En el espectro del CHI se observa un pico característico de amida tipo I en  $1641\text{ cm}^{-1}$ , el hombro que se aprecia en  $1560\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a una amida tipo II.<sup>31</sup> En el caso del ALG aparece una banda aproximadamente en  $1594\text{ cm}^{-1}$  y otra en  $1406\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los estiramientos asimétrico y simétrico de los grupos  $\text{COO}^-$ , respectivamente.<sup>21,32</sup> En el caso del hidrogel CHI-ALG PEC se aprecia un decremento en la intensidad de la banda de amida I, mientras que la banda de amida II incrementa ligeramente. Una posible explicación para este fenómeno podría ser debido a la interacción iónica de estos grupos con el ALG, el cuál posee carga negativa en los grupos carboxilo.

#### 4.2.1 Determinación del grado de desacetilación del CHI

El espectro FTIR-ATR del CHI también fue de utilidad en la determinación del DDA del mismo. Para ello, se realizó un análisis análogo al reportado por Rinaudo y colaboradores, en el cual se utilizan las bandas ubicadas en  $1420\text{ cm}^{-1}$ , como pico de referencia, y la banda en  $1320\text{ cm}^{-1}$ , característica de los grupos  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CO}$ ; para la medición del grado de acetilación del CHI.<sup>18</sup>

En el caso de los espectros obtenidos para este proyecto, la técnica utilizada proporciona un espectro ligeramente desplazado debido a la naturaleza de la misma, por lo que en este caso los picos utilizados como BR y BM se encuentran en  $1425$  y  $1309\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (Figura 12). Se utilizó el mismo tratamiento que el descrito por Rinaudo y colaboradores para el establecimiento de la línea base. Los cálculos fueron realizados utilizando las ecuaciones 3 y 4.

Tras el análisis de los espectros, se encontró que el DDA del CHI utilizado para la elaboración de los hidrogeles es del 65%.

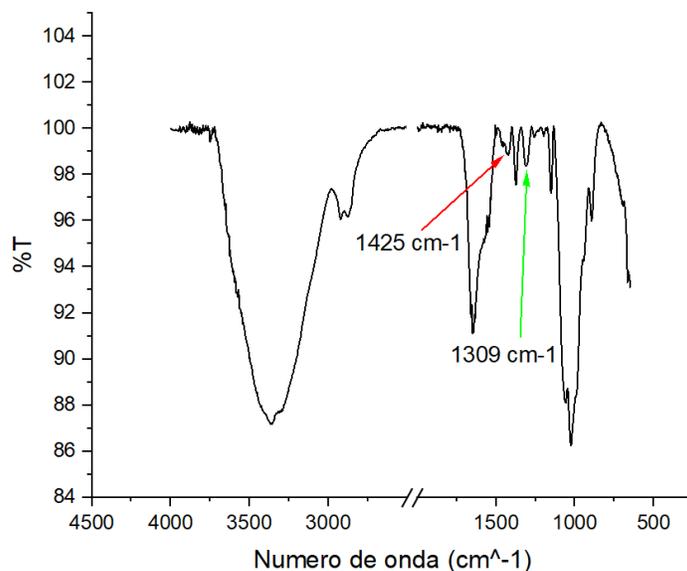
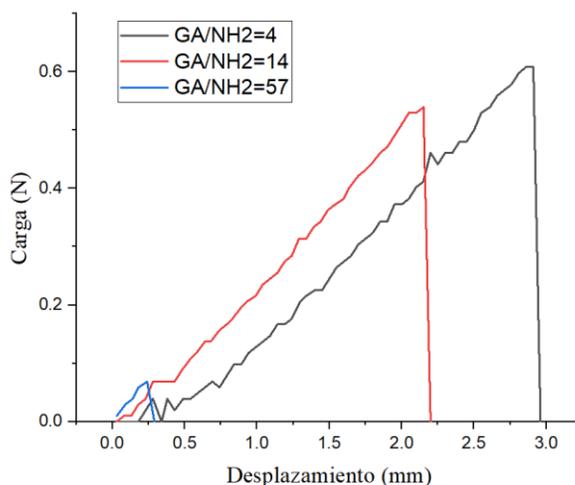


Figura 12. Espectro de FTIR-ATR del CHI nativo

### 4.3 Caracterización mecánica de hidrogeles CHI-ALG DN

Tras la elección de la mejor proporción CHI:ALG para los hidrogeles PEC, se procedió con la elaboración de los mismos, para posteriormente reticularlos de manera covalente con GA en vapor para la formación de la doble red (hidrogeles CHI-ALG DN). Para ello los xerogeles se introdujeron en cámaras previamente cargadas con diferentes cantidades de GA a las relaciones GA/NH<sub>2</sub> deseadas, de acuerdo a lo descrito en la sección experimental. De la misma manera que con los hidrogeles PEC, se evaluaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles CHI-ALG DN mediante ensayos de punción. En la Figura 13 se muestran las curvas representativas de carga vs. desplazamiento de los hidrogeles previamente mencionados.



**Figura 13.** Curvas representativas de carga vs. desplazamiento de hidrogel CHI-ALG DN 1:2 a distintas relaciones  $GA/NH_2$

En este caso, se puede observar claramente que la relación  $GA/NH_2$  que produce la mejor respuesta mecánica es la de 4 mol%, y conforme aumenta la proporción de GA, las membranas se vuelven más quebradizas. Este resultado está de acuerdo con lo reportado en la literatura, ya que se ha observado que relaciones molares altas del agente reticulante tienden a producir materiales más rígidos y quebradizos.<sup>19</sup>

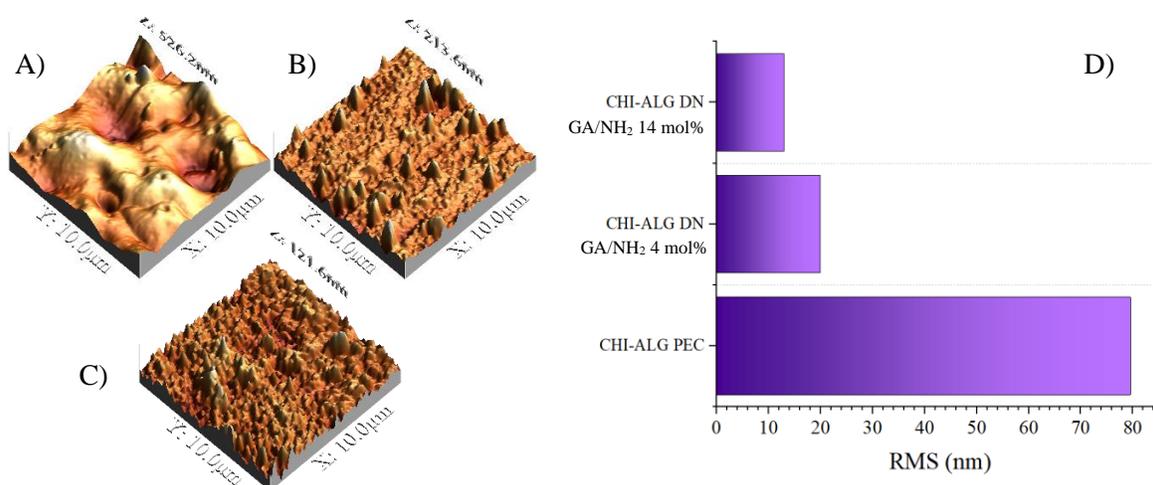
De la misma manera, se obtuvieron los valores de E, PS y área bajo la curva de los hidrogel sintetizados, los resultados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Módulo elástico (E), Fuerza de punción en la rotura (PS) y área bajo la curva de hidrogel CHI-ALG DN 1:2 a diferentes relaciones  $GA/NH_2$

Muestra	E [MPa]	PS [MPa]	Área bajo la curva [N mm]
<b>GA/NH<sub>2</sub> 4 mol%</b>	357.45 ± 163.01	136.57 ± 11.57	0.76 ± 0.008
<b>GA/NH<sub>2</sub> 14 mol%</b>	821.10 ± 150.51	100.77 ± 11.48	0.53 ± 0.264
<b>GA/NH<sub>2</sub> 57 mol%</b>	1201.84	10.59	0.01

#### 4.4 Caracterización de las propiedades de superficie

La caracterización de las propiedades de superficie se realizó mediante AFM, se obtuvieron los perfiles de topografía y rugosidad de hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2, así como hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 de GA/NH<sub>2</sub> = 4 y 14 mol%. Los perfiles de topografía se muestran en la Figura 14 (A-C). En las imágenes se puede apreciar claramente que el hidrogel con mayor rugosidad es el hidrogel CHI-ALG PEC, lo cual se confirma con el gráfico de rugosidad (Figura 14-D). También se observa claramente como la rugosidad de los hidrogeles disminuye a medida que aumenta la proporción del agente reticulante en los hidrogeles CHI-ALG DN. Una explicación para este fenómeno podría ser que, el entrecruzamiento iónico que ocurre entre los dos polielectrolitos es más débil y desordenado, dando lugar a crestas altas y valles. En nuestra opinión, estos rasgos topográficos se modificaron con el reordenamiento espacial de las cadenas poliméricas debido al entrecruzamiento del CHI promovido por el GA, cerrando lo que se aprecia como poros ciegos en el hidrogel CHI-ALG PEC, dando lugar a una estructura visiblemente más reticulada, como se observa en los paneles B y C de la Figura 14.

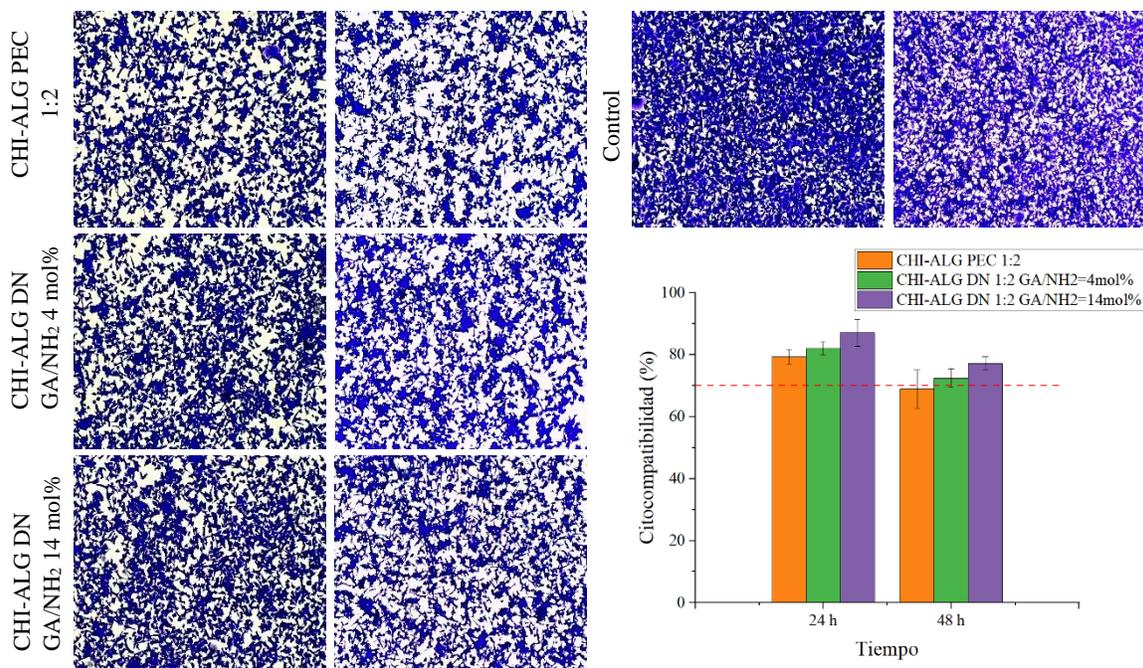


**Figura 14.** Perfiles de topografía de A) hidrogeles PEC 1:2, B) hidrogeles DN 1:2 ( $GA/NH_2=4$  mol%), y C) hidrogeles DN 1:2 ( $GA/NH_2=14$  mol%). D) Rugosidad de hidrogeles PEC e hidrogeles DN ( $GA/NH_2=4$  y  $14$  mol%)

## 4.5 Caracterización de las propiedades biológicas

### 4.5.1 Citocompatibilidad

Se realizaron pruebas de citocompatibilidad por lixiviados, esta prueba consiste en colocar los materiales sintetizados en condición de xerogel (previamente secados y esterilizados) en medio de cultivo celular (DMEM), las muestras luego son colocadas en un baño de vaivén para imitar condiciones fisiológicas y así lixivie cualquier material remanente que pudiera resultar tóxico para las células. Se agregan los lixiviados a células previamente sembradas en placas de cultivo y se incuban nuevamente por 24 y 48 h. Pasado este tiempo las células son fijadas y teñidas con una solución de cristal violeta para cuantificar de manera colorimétrica la abundancia de las mismas, en contraste con un control positivo en medio sin alteraciones. El experimento se realizó con células MDA-MB-231 (cáncer de mama), las micrografías de las células cultivadas en presencia de lixiviados de los distintos materiales de interés se muestran en la Figura 15.



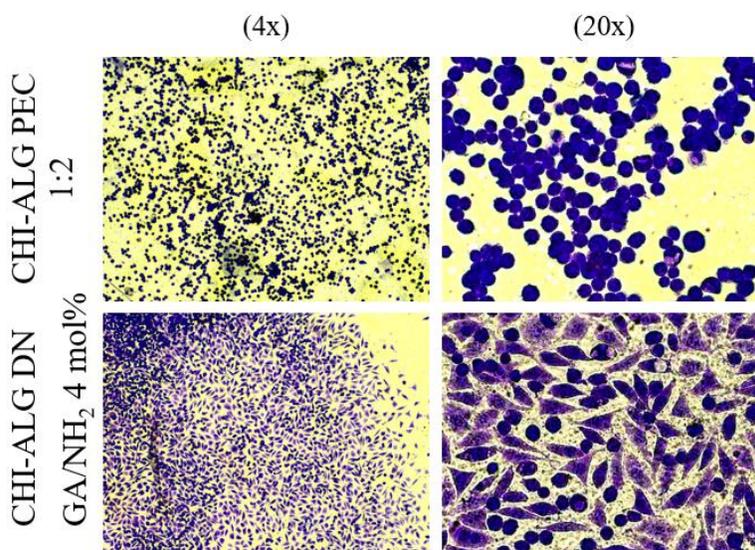
**Figura 15.** Citocompatibilidad de hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2 e hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 ( $GA/NH_2 = 4$  y  $14 \text{ mol\%}$ )

Como se puede apreciar en las micrografías, existe buena proliferación celular en todos los casos, que es solo ligeramente menor al control, lo cual es completamente normal. La cuantificación colorimétrica confirmó lo observado anteriormente, todas las formulaciones estudiadas superan el 70% de citocompatibilidad, el cuál es el mínimo establecido para considerar a un biomaterial como biocompatible.<sup>33</sup>

#### 4.5.2 Adhesión y proliferación celular

Previo al ensayo de célula viva/célula muerta de calceína-AM:ioduro de propidio, se realizó una prueba preliminar sobre la superficie de hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2 e hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 ( $GA/NH_2 = 4 \text{ mol\%}$ ) utilizando tinción con cristal violeta para la observación de las células mediante microscopía óptica. Para ello, se sembraron células de tejido blando (fibroblastos) directamente sobre los hidrogeles previamente esterilizados e hidratados con PBS y medio de cultivo, los fibroblastos se incubaron por 24 h y luego se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con una solución de GA. Después se tiñeron

las células con una solución de cristal violeta y se observaron en un microscopio óptico, las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 16.



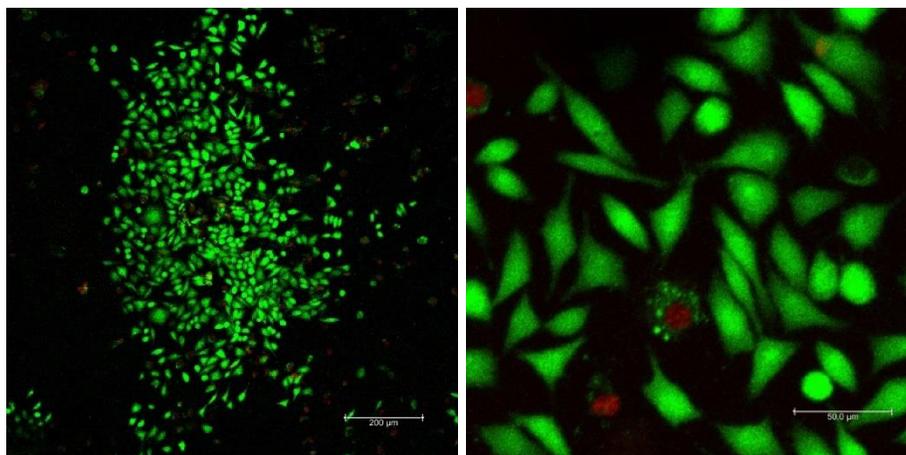
**Figura 16.** Microscopía óptica de ensayos de adhesión y proliferación celular sobre la superficie de hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2 e hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 de  $GA/NH_2 = 4 \text{ mol\%}$

Las micrografías revelan una excelente afinidad hacia ambos materiales, se puede observar buena proliferación en ambos casos. Sin embargo, en el caso del hidrogel CHI-ALG DN esta es incluso mejor, revelado por la morfología estirada que presentan los fibroblastos en la micrografía a 20x. Este hecho es un tanto interesante, ya que se esperaba una mayor afinidad hacia el hidrogel más rugoso (CHI-ALG PEC) puesto que se ha observado este comportamiento con anterioridad. Sin embargo, una explicación para este comportamiento podría ser que, al tratarse de células epiteliales, éstas prefieran una superficie más lisa pero que posee bastantes sitios de anclaje.<sup>34,35</sup>

Posterior a las pruebas preliminares con cristal violeta, se llevó a cabo el ensayo de célula viva/célula muerta para la evaluación de la adhesión y proliferación celular sobre la superficie de hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 ( $GA/NH_2 = 4 \text{ mol\%}$ ). Este ensayo utiliza calceína-AM y yoduro de propidio para la tinción de las células. La calceína-AM, que no es fluorescente, se convierte en calceína al ser metabolizada en el citoplasma de las células

metabólicamente activas (células viables) pintándolas de verde. En caso de existir células cuya membrana celular esté comprometida o rota (células no viables), entonces el yoduro de propidio es capaz de atravesar hasta el núcleo, tiñéndolo de rojo.

El experimento se llevó a cabo utilizando fibroblastos, éstos fueron sembrados directamente sobre hidrogeles CHI-ALG DN y se incubaron durante 24 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se agregó la solución de calceína-AM: yoduro de propidio en PBS y se incubó en condiciones de oscuridad para ser fotografiadas inmediatamente después. La Figura 17 muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia confocal.



**Figura 17.** *Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de ensayos de adhesión celular sobre la superficie hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 ( $GA/NH_2 = 4 \text{ mol}\%$ )*

Las imágenes revelan una afinidad grande hacia los hidrogeles estudiados, donde se aprecia el predominio de células viables teñidas en verde que concuerdan con el 80% de citocompatibilidad observado anteriormente. Asimismo, la morfología estirada exhibida por las células es una característica muy importante de la línea celular utilizada (fibroblastos L-929), lo cual revela a estos hidrogeles como óptimos para su utilización en cultivo celular.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Reactivos y solventes

Todos reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich. A continuación, se enlistan todos los reactivos y solventes utilizados.

Reactivos	Solventes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quitosano de medio peso molecular</li> <li>• Alginato de sodio</li> <li>• Glutaraldehído</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua destilada</li> <li>• Etanol</li> <li>• Ácido acético</li> </ul>

### 5.2 Síntesis de hidrogeles CHI-ALG PEC

La síntesis de hidrogeles CHI-ALG se llevó a cabo vía complejación de polielectrolitos (PEC, por sus siglas en inglés) de manera secuencial. Primeramente, se disolvió CHI de peso molecular medio en una solución 1% v/v de ácido acético para crear una solución de CHI 1% p/v. Se vertieron 3 mL de esta solución en moldes circulares de poliestireno de 3.4 cm de diámetro y se dejaron secar al aire completamente para obtener membranas circulares de CHI, las cuales fueron posteriormente neutralizadas durante 10 min con 25 mL de una solución de NaOH 0.1 M y luego se enjuagaron con 50 mL de agua destilada por 10 min.

Una vez neutralizadas, se procedió con la difusión del segundo polisacárido en la matriz de CHI. Para ello, se sumergieron las membranas de CHI en soluciones de ALG a diferentes concentraciones (0.5, 2 y 4% p/v) por 6 h para asegurar la difusión del ALG. Una vez transcurrido este tiempo, se enjuagaron las membranas en 50 mL de agua destilada por 10 min y se dejaron secar al aire completamente.

### 5.3 Síntesis de hidrogeles CHI-ALG DN

Para la formación de la doble red, se entrecruzó la red de CHI de manera covalente utilizando glutaraldehído en fase vapor, siguiendo la metodología reportada por Rodríguez Velázquez y colaboradores.<sup>19</sup> Para ello, se montaron los xerogeles CHI-ALG PEC en soportes de acero inoxidable, los cuales se introdujeron en cámaras creadas con las bases de cajas Petri de 3 cm (Figura 18) previamente cargadas con diferentes cantidades de GA 25% v/v. Las cámaras se sellaron con Parafilm y se introdujeron a un horno a 50 °C por 45 min. Una vez transcurrido este tiempo, se dejaron los xeogeles al aire para que volatilizara cualquier rastro de GA.

Las cantidades de GA utilizadas se midieron con base en la unidad desacetilada del CHI, se utilizaron GA/NH<sub>2</sub> = 4, 14 y 57 mol%.



Figura 18. Cámaras para la reticulación en vapor

### 5.4 Técnicas analíticas

La caracterización de los reactivos utilizados y de los hidrogeles sintetizados se realizó en el Laboratorio de Cultivo Celular y Microscopía Confocal del Centro de Graduados e Investigación en Química (CGIQ) del Instituto Tecnológico de Tijuana (ITT), campus Otay. A continuación, se enlistan los análisis realizados:

- La caracterización de las propiedades mecánicas se llevó a cabo utilizando un texturómetro Brookfield CT3 10K

- La caracterización FT-IR fue realizada utilizando un espectrómetro Perkin Elmer 400 acoplado a una sonda de ATR
- La caracterización de la topografía y rugosidad de los hidrogeles sintetizados se midió con AFM empleando un equipo Nanosurf en modo de contacto.
- La lectura colorimétrica de las placas de cultivo y las micrografías ópticas de las células se obtuvieron con un lector de placas Bio Rad iMark y con un microscopio binocular vertical compuesto Olympus CKX53 con cámara digital EP50, respectivamente
- Las micrografías de fluorescencia confocal de las células se obtuvieron utilizando un microscopio confocal de fluorescencia Leica modelo TCS-SP8.

#### 5.4.1 Pruebas mecánicas

Los ensayos mecánicos de punción se llevaron a cabo a temperatura ambiente en condiciones no estériles. Para esto, xerogeles CHI-ALG PEC 1:2 y CHIL-ALG DN 1:2 se hidrataron en 50 mL de agua destilada 24 h previas al ensayo.

Se utilizó una sonda de 2 mm de diámetro y 10 mm de longitud, a una velocidad de 0.5 mm/s con un “trigger” de 20 g, llegando hasta un 100% de deformación.

Los datos proporcionados por el equipo fueron analizados con el programa OriginPro 2021. Se calcularon los datos de E, PS y área bajo la curva de todas las muestras procesadas utilizando las siguientes ecuaciones:

$$E = \frac{m}{16w} \left( \frac{L}{h} \right)^3 \quad (1)$$

$$PS = \frac{3F_B L}{4wh^2} \quad (2)$$

En donde  $m$  es la pendiente de la parte elástica de la curva de carga vs. desplazamiento,  $L$ ,  $w$  y  $h$  son la longitud, anchura y grosor de los hidrogeles respectivamente, y  $F_B$  es la carga registrada en la rotura.<sup>19</sup>

### 5.4.2 FTIR-ATR

Se obtuvieron espectros de entre 4000 y 650  $\text{cm}^{-1}$  de los polisacáridos CHI y ALG nativos e hidrogeles CHI-ALG PEC, con una sensibilidad de 4.0  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros obtenidos se analizaron en el programa Origin Lab.

Para la determinación del DDA del CHI utilizado en la elaboración de los hidrogeles se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$A_{1309}/A_{1425} = 0.3822 + 0.03133 DA \quad (3)$$

$$DDA = 100 - DA \quad (4)$$

En donde  $A_{1309}/A_{1425}$  es la relación entre las absorbancias de la BM sobre la BR.

### 5.4.3 Microscopía de fuerza atómica

La caracterización de las propiedades de superficie de xerogeles CHI-ALG PEC y CHI-ALG DN se estudió mediante AFM. Se obtuvieron imágenes de 10 x 10  $\mu\text{m}$ , mismas que fueron analizadas en el programa WSxM para obtener los perfiles de topografía y rugosidad.

## 5.5 Pruebas biológicas

### 5.5.1 Ensayos de citocompatibilidad

Las pruebas de citocompatibilidad se realizaron de acuerdo a la norma estandarizada ISO:10993-5:2019.<sup>36</sup> Primeramente se tomaron 20 mg de cada xerogel preparado, previamente esterilizado, se introdujeron en 2 mL de medio de cultivo y se pusieron en agitación de vaivén a 37 °C y 70 rpm durante 48 h para producir lixiviados. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de los lixiviados a células MDA-MB-231 (cáncer de mama) previamente sembradas (15,000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, 24 h a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ ) y se incubó a 24 y 48 h en condiciones de cultivo.

Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con 10  $\mu\text{L}$  de una solución de GA 11% v/v (15 min en agitación). Posteriormente se realizaron dos lavados con 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada y luego se tiñeron las células con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de cristal violeta 0.1% (15 min en agitación). Se realizaron tres lavados adicionales con agua tras la tinción y se dejó secar las placas completamente.

Para la cuantificación de la citocompatibilidad se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido acético al 10% v/v a cada pocillo previo a la lectura de la placa; se empleó el mismo solvente como blanco de control. Se midió la absorbancia a 595 nm y se realizaron 6 réplicas por experimento.

Para la determinación de la citocompatibilidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Citocompatibilidad (\%)} = \left( \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (5)$$

En donde  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia obtenida de cada muestra en particular y  $A_{\text{control}}$  es el promedio de las absorbancias obtenidas de las células control (sin ningún tipo de tratamiento).

### 5.5.2 Adhesión y proliferación celular

Previo a los ensayos de célula viva/célula muerta, se realizaron pruebas preliminares de adhesión y proliferación celular sobre la superficie de hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2 e hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 (GA/NH<sub>2</sub> = 4 mol%). Para ello, primero se cortaron los xerogeles en cuadrados de 1.5 cm, éstos fueron esterilizados con etanol al 70%. Una vez estériles, se colocaron en una placa de 12 pocillos estéril y se lavaron dos veces con 1.5 mL de PBS, después se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y se incubó a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 15 min. Posteriormente se sembraron células de tejido blando (fibroblastos) sobre la superficie de los hidrogeles a una proporción de 50,000 células/cm<sup>2</sup> y se incubó por 24 h en condiciones de cultivo. Pasadas las 24 h, se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con una solución de GA al 11% (15 min en agitación). Una vez fijadas las células se realizaron dos lavados con 1.5 mL de agua y posteriormente se tiñeron las células utilizando una solución de cristal violeta (15 min en agitación). Se realizaron dos lavados con agua para

eliminar los rastros del cristal violeta y, finalmente, se observaron las células utilizando un microscopio óptico.

Los ensayos de célula viva/célula muerta de adhesión y proliferación celular se llevaron a cabo sobre hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 (GA/NH<sub>2</sub> = 4 mol%). Primeramente, se cortaron los xerogeles en cuadros de 1.5 cm y se esterilizaron con etanol al 70%. Una vez estériles, se colocaron en placas de 12 pocillos y se lavaron con 1.5 mL de PBS por 5 min. Se desechó el PBS y se añadieron 1.5 mL más para lavar por segunda vez durante 15 min en condiciones de cultivo. Tras los 15 min se desechó nuevamente el PBS y se añadieron 800 µL de medio de cultivo y se incubó por 30 min para impregnar la membrana. Tras este tiempo se sembraron los fibroblastos sobre la superficie de los hidrogeles a razón de 50,000 células/cm<sup>2</sup> y se incubaron por 30 min para promover la adhesión. Posteriormente se agregó 1 mL más de medio de cultivo puro y se incubó a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h.

Pasadas las 24 h se retiró el medio de cultivo y se agregaron 40 µL de una solución de calceína-AM:ioduro de propidio en PBS (98:1:1 PBS/calceína-AM/ioduro de propidio) y se incubó por 10 min en condiciones de oscuridad para ser fotografiadas inmediatamente después utilizando un microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS-SP8. Las imágenes se registraron a longitudes de onda de excitación/emisión de 488/495-595 nm para la detección de calceína (canal verde) y 552/590-700 nm para la detección del ioduro de propidio (canal rojo).

## 5.6 Análisis estadísticos

Se llevó a cabo el análisis estadístico ANOVA de una vía con los datos obtenidos del procesamiento de las pruebas mecánicas, el cuál se complementó con las pruebas de Tukey y Bonferroni. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0.05$ .

## VI. CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar hidrogeles CHI-ALG PEC y CHI-ALG DN de manera exitosa.
2. Ambos tipos de hidrogeles (CHI-ALG PEC y CHI-ALG DN) mostraron propiedades mecánicas prometedoras para aplicaciones en TERM en regeneración de tejido suave.
3. Todos los sistemas estudiados presentaron citocompatibilidades por encima del 70%, lo cual los convierte en aptos para el sembrado celular.
4. El hidrogel de mayor interés (CHI-ALG DN 1:2 GA/NH<sub>2</sub> 4 mol %) presentó un 82% de citocompatibilidad.
5. Los hidrogeles CHI-ALG PEC 1:2 resultaron ser los de mayor rugosidad, con valores de 80 nm.
6. Se observó una disminución bastante pronunciada en la topografía de los sistemas tras el entrecruzamiento en fase vapor con GA a 20 nm para los hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 GA/NH<sub>2</sub> 4 mol% y 13 nm para el hidrogel CHI-ALG DN 1:2 GA/NH<sub>2</sub> 14 mol%.
7. Los hidrogeles CHI-ALG DN 1:2 GA/NH<sub>2</sub> 4 mol% presentaron la mejor adhesión y proliferación celular de todos los sistemas estudiados.

## VII. REFERENCIAS

- (1) Haycock, J. W. Chapter 1 and Techniques. *3D Cell Cult. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **2011**, 695, 1–15.
- (2) Argüero-Sánchez, R.; Sánchez-Ramírez, O.; Olivares-Durán, E. M. Deceased Donation and Organ Transplantation in Mexico. Analysis of 12 Years and Seven Strategic Proposals. *Cir. y Cir. (English Ed.)* **2020**, 88, 254–262.
- (3) Reyes-Acevedo, R.; Obrador, G. T.; Alberú-Gómez, J.; Gracida-Juárez, C.; André Madrigal, J.; Aburto-Morales, S. Current State and Challenges for Organ Donation and Transplantation in Mexico. *Transplantation* **2019**, 103, 648–650.
- (4) Kim, B. W. Clinical Regenerative Medicine in Urology. *Clin. Regen. Med. Urol.* **2017**, 1–285.
- (5) Malafaya, P. B.; Silva, G. A.; Reis, R. L. Natural-Origin Polymers as Carriers and Scaffolds for Biomolecules and Cell Delivery in Tissue Engineering Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59, 207–233.
- (6) Rodriguez-Velazquez, E.; Alatorre-Meda, M.; F. Mano, J. Polysaccharide-Based Nanobiomaterials as Controlled Release Systems for Tissue Engineering Applications. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, 21, 4837–4850.
- (7) Na, Y. H.; Kurokawa, T.; Katsuyama, Y.; Tsukeshiba, H.; Gong, J. P.; Osada, Y.; Okabe, S.; Karino, T.; Shibayama, M. Structural Characteristics of Double Network Gels with Extremely High Mechanical Strength. *Macromolecules* **2004**, 37, 5370–5374.
- (8) Shin, H.; Olsen, B. D.; Khademhosseini, A. The Mechanical Properties and Cytotoxicity of Cell-Laden Double-Network Hydrogels Based on Photocrosslinkable Gelatin and Gellan Gum Biomacromolecules. *Biomaterials* **2012**, 33, 3143–3152.
- (9) Caridade, S. G.; Monge, C.; Gilde, F.; Boudou, T.; Mano, J. F.; Picart, C. Free-Standing Polyelectrolyte Membranes Made of Chitosan and Alginate. *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1653–1660.

- (10) Yang, Z.; Peng, H.; Wang, W.; Liu, T. Crystallization Behavior of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Layered Double Hydroxide Nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *116*, 2658–2667.
- (11) Muzzarelli, R. A. A. Chitins and Chitosans for the Repair of Wounded Skin, Nerve, Cartilage and Bone. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 167–182.
- (12) Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Kim, S. K. Chitosan-Alginate Biocomposite Containing Fucoidan for Bone Tissue Engineering. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 300–316.
- (13) Berthiaume, F.; Maguire, T. J.; Yarmush, M. L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 403–430.
- (14) Da Câmara, P. C. F.; Balaban, R. C.; Hedayati, M.; Popat, K. C.; Martins, A. F.; Kipper, M. J. Novel Cationic Tannin/Glycosaminoglycan-Based Polyelectrolyte Multilayers Promote Stem Cells Adhesion and Proliferation. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 25836–25846.
- (15) Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. Controlling Cell Adhesion and Degradation of Chitosan Films by N-Acylation. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5872–5878.
- (16) Duarte, M. L.; Ferreira, M. C.; Marvão, M. R.; Rocha, J. An Optimised Method to Determine the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan by FTIR Spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *31*, 1–8.
- (17) Sivashankari, P. R.; Prabakaran, M. Deacetylation Modification Techniques of Chitin and Chitosan. In *Chitosan Based Biomaterials*; Elsevier, 2017; Vol. 1, pp 117–133.
- (18) Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F. M.; Argüelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. *Polymer (Guildf)*. **2001**, *42*, 3569–3580.
- (19) Rodríguez-Velázquez, E.; Silva, M.; Taboada, P.; Mano, J. F.; Suárez-Quintanilla, D.; Alatorre-Meda, M. Enhanced Cell Affinity of Chitosan Membranes Mediated by

- Superficial Cross-Linking: A Straightforward Method Attainable by Standard Laboratory Procedures. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 291–301.
- (20) Hecht, H.; Srebnik, S. Structural Characterization of Sodium Alginate and Calcium Alginate. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 2160–2167.
- (21) Monteiro, R. T.; Andrade, F. K.; Vasconcelos, N. F.; Nogueira, K. A. B.; Petrilli, R.; Vieira, R. S. Production and Characterization of Alginate Bilayer Membranes for Releasing Simvastatin to Treat Wounds. *Biointerphases* **2020**, *15*, 041002.
- (22) Fertah, M.; Belfkira, A.; Dahmane, E. montassir; Taourirte, M.; Brouillette, F. Extraction and Characterization of Sodium Alginate from Moroccan *Laminaria Digitata* Brown Seaweed. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S3707–S3714.
- (23) Penman, A.; Sanderson, G. R. A Method for the Determination of Uronic Acid Sequence in Alginates. *Carbohydr. Res.* **1972**, *25*, 273–282.
- (24) Hoffman, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23.
- (25) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19–34.
- (26) Chen, T. W.; Chang, S. J.; Niu, G. C. C.; Hsu, Y. T.; Kuo, S. M. Alginate-Coated Chitosan Membrane for Guided Tissue Regeneration. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *102*, 4528–4534.
- (27) Utracki, L. A.; Wilkie, C. A. Polymer Blends Handbook. In *Polymer Blends Handbook*; 2014; pp 1–2378.
- (28) Yu, H. C.; Zhang, H.; Ren, K.; Ying, Z.; Zhu, F.; Qian, J.; Ji, J.; Wu, Z. L.; Zheng, Q. Ultrathin  $\kappa$ -Carrageenan/Chitosan Hydrogel Films with High Toughness and Antiadhesion Property. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 9002–9009.
- (29) Costa, A. M. S.; Mano, J. F. Highly Robust Hydrogels via a Fast, Simple and Cytocompatible Dual Crosslinking-Based Process. *Chem. Commun.* **2015**, *51*,

15673–15676.

- (30) Paluszkiwicz, C.; Stodolak, E.; Hasik, M.; Blazewicz, M. FT-IR Study of Montmorillonite-Chitosan Nanocomposite Materials. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *79*, 784–788.
- (31) Marchessault, R. H.; Pearson, F. G.; Liang, C. Y. Infrared Spectra of Crystalline Polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *45*, 499–507.
- (32) Tam, S. K.; Dusseault, J.; Polizu, S.; Ménard, M.; Hallé, J. P.; Yahia, L. Physicochemical Model of Alginate-Poly-L-Lysine Microcapsules Defined at the Micrometric/Nanometric Scale Using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6950–6961.
- (33) Schafer, S.; Al-Qaddo, H.; Gosau, M.; Smeets, R.; Hartjen, P.; Friedrich, R. E.; Nada, O. A.; Vollkommer, T.; Rashad, A. Cytocompatibility of Bone Substitute Materials and Membranes. *In Vivo (Brooklyn)*. **2021**, *35*, 2035–2040.
- (34) Wirth, C.; Comte, V.; Lagneau, C.; Exbrayat, P.; Lissac, M.; Jaffrezic-Renault, N.; Ponsonnet, L. Nitinol Surface Roughness Modulates in Vitro Cell Response: A Comparison between Fibroblasts and Osteoblasts. *Mater. Sci. Eng. C* **2005**, *25*, 51–60.
- (35) Brunette, D. M.; Kenner, G. S.; Gould, T. R. L. Grooved Titanium Surfaces Orient Growth and Migration of Cells from Human Gingival Explants. *J. Dent. Res.* **1983**, *62*, 1045–1048.
- (36) (CSA), C. S. A. ISO 10993-5 in Vitro Cytotoxicity. *Int. Organ.* **2009**, *2007*, 1–11.

## VIII. ANEXOS

Bonferroni Test		MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Módulo de elasticidad, 0.5%	Módulo de elasticidad, 0%	513.13106	203.18632	2.52542	0.28202	0.05	0	-197.33311	1223.59523
Módulo de elasticidad, 1%	Módulo de elasticidad, 0%	477.76634	217.21532	2.19951	0.50129	0.05	0	-281.7518	1237.28449
Módulo de elasticidad, 1%	Módulo de elasticidad, 0.5%	-35.36471	203.18632	-0.17405	1	0.05	0	-745.82888	675.09946
Módulo de elasticidad, 2%	Módulo de elasticidad, 0%	783.18644	217.21532	3.60558	0.04129	0.05	1	23.66829	1542.70458
Módulo de elasticidad, 2%	Módulo de elasticidad, 0.5%	270.05538	203.18632	1.3291	1	0.05	0	-440.40879	980.51955
Módulo de elasticidad, 2%	Módulo de elasticidad, 1%	305.4201	217.21532	1.40607	1	0.05	0	-454.09805	1064.93824
Módulo de elasticidad, 4%	Módulo de elasticidad, 0%	830.41373	217.21532	3.823	0.02828	0.05	1	70.89558	1589.93187
Módulo de elasticidad, 4%	Módulo de elasticidad, 0.5%	317.28267	203.18632	1.56154	1	0.05	0	-393.1815	1027.74684
Módulo de elasticidad, 4%	Módulo de elasticidad, 1%	352.64738	217.21532	1.62349	1	0.05	0	-406.87076	1112.16553
Módulo de elasticidad, 4%	Módulo de elasticidad, 2%	47.22729	217.21532	0.21742	1	0.05	0	-712.29086	806.74543

Tukey Test		MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Módulo de elasticidad, 0.5%	Módulo de elasticidad, 0%	513.13106	203.18632	3.57148	0.1541	0.05	0	-143.97752	1170.23964
Módulo de elasticidad, 1%	Módulo de elasticidad, 0%	477.76634	217.21532	3.11057	0.24875	0.05	0	-224.71228	1180.24496
Módulo de elasticidad, 1%	Módulo de elasticidad, 0.5%	-35.36471	203.18632	0.24614	0.99976	0.05	0	-692.47329	621.74387
Módulo de elasticidad, 2%	Módulo de elasticidad, 0%	783.18644	217.21532	5.09906	0.02723	0.05	1	80.70782	1485.66506
Módulo de elasticidad, 2%	Módulo de elasticidad, 0.5%	270.05538	203.18632	1.87963	0.68035	0.05	0	-387.0532	927.16396
Módulo de elasticidad, 2%	Módulo de elasticidad, 1%	305.4201	217.21532	1.98848	0.63651	0.05	0	-397.05852	1007.89872
Módulo de elasticidad, 4%	Módulo de elasticidad, 0%	830.41373	217.21532	5.40654	0.01908	0.05	1	127.93511	1532.89235
Módulo de elasticidad, 4%	Módulo de elasticidad, 0.5%	317.28267	203.18632	2.20834	0.54789	0.05	0	-339.82591	974.39125
Módulo de elasticidad, 4%	Módulo de elasticidad, 1%	352.64738	217.21532	2.29596	0.51334	0.05	0	-349.83124	1055.126
Módulo de elasticidad, 4%	Módulo de elasticidad, 2%	47.22729	217.21532	0.30748	0.99942	0.05	0	-655.25133	749.70591

Anexo 1. Resultados del análisis estadístico ANOVA para valores calculados de E de hidrogeles CHI-ALG PEC

Bonferroni Test								
	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Fuerza de punción en la rotura, 0.5%	13.71982	11.33038	1.21089	1	0.05	0	-25.89815	53.33778
Fuerza de punción en la rotura, 0%								
Fuerza de punción en la rotura, 1%	4.43998	12.11269	0.36656	1	0.05	0	-37.9134	46.79337
Fuerza de punción en la rotura, 0%								
Fuerza de punción en la rotura, 1%	-9.27983	11.33038	-0.81902	1	0.05	0	-48.8978	30.33814
Fuerza de punción en la rotura, 0.5%								
Fuerza de punción en la rotura, 2%	36.04471	12.11269	2.97578	0.12614	0.05	0	-6.30868	78.3981
Fuerza de punción en la rotura, 0%								
Fuerza de punción en la rotura, 2%	22.32489	11.33038	1.97036	0.74486	0.05	0	-17.29307	61.94286
Fuerza de punción en la rotura, 0.5%								
Fuerza de punción en la rotura, 2%	31.60472	12.11269	2.60923	0.24291	0.05	0	-10.74867	73.95811
Fuerza de punción en la rotura, 1%								
Fuerza de punción en la rotura, 4%	26.83517	12.11269	2.21546	0.48751	0.05	0	-15.51822	69.18856
Fuerza de punción en la rotura, 0%								
Fuerza de punción en la rotura, 4%	13.11535	11.33038	1.15754	1	0.05	0	-26.50261	52.73332
Fuerza de punción en la rotura, 0.5%								
Fuerza de punción en la rotura, 4%	22.39519	12.11269	1.8489	0.91506	0.05	0	-19.9582	64.74857
Fuerza de punción en la rotura, 1%								
Fuerza de punción en la rotura, 4%	-9.20954	12.11269	-0.76032	1	0.05	0	-51.56293	33.14385
Fuerza de punción en la rotura, 2%								

Tukey Test								
	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Fuerza de punción en la rotura, 0.5%	13.71982	11.33038	1.71245	0.74578	0.05	0	-22.92286	50.36249
Fuerza de punción en la rotura, 0%								
Fuerza de punción en la rotura, 1%	4.43998	12.11269	0.51839	0.99556	0.05	0	-34.73268	43.61265
Fuerza de punción en la rotura, 0%								
Fuerza de punción en la rotura, 1%	-9.27983	11.33038	1.15827	0.91929	0.05	0	-45.9225	27.36284
Fuerza de punción en la rotura, 0.5%								
Fuerza de punción en la rotura, 2%	36.04471	12.11269	4.20839	0.07598	0.05	0	-3.12796	75.21737
Fuerza de punción en la rotura, 0%								
Fuerza de punción en la rotura, 2%	22.32489	11.33038	2.78651	0.33942	0.05	0	-14.31778	58.96756
Fuerza de punción en la rotura, 0.5%								
Fuerza de punción en la rotura, 2%	31.60472	12.11269	3.69	0.13553	0.05	0	-7.56794	70.77739
Fuerza de punción en la rotura, 1%								
Fuerza de punción en la rotura, 4%	26.83517	12.11269	3.13313	0.24321	0.05	0	-12.33749	66.00784
Fuerza de punción en la rotura, 0%								
Fuerza de punción en la rotura, 4%	13.11535	11.33038	1.63701	0.77402	0.05	0	-23.52732	49.75803
Fuerza de punción en la rotura, 0.5%								
Fuerza de punción en la rotura, 4%	22.39519	12.11269	2.61474	0.39575	0.05	0	-16.77748	61.56785
Fuerza de punción en la rotura, 1%								
Fuerza de punción en la rotura, 4%	-9.20954	12.11269	1.07526	0.93683	0.05	0	-48.3822	29.96313
Fuerza de punción en la rotura, 2%								

Anexo 2. Resultados del análisis estadístico ANOVA para valores calculados de PS de hidrogeles CHI-ALG PEC

Bonferroni Test		MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Área bajo la curva, 0.5%	Área bajo la curva, 0%	-1.03219	0.26398	-3.91005	0.02434	0.05	1	-1.95523	-0.10914
Área bajo la curva, 1%	Área bajo la curva, 0%	-1.69741	0.28221	-6.01472	8.73949E-4	0.05	1	-2.68419	-0.71063
Área bajo la curva, 1%	Área bajo la curva, 0.5%	-0.66522	0.26398	-2.51996	0.28478	0.05	0	-1.58827	0.25782
Área bajo la curva, 2%	Área bajo la curva, 0%	-0.24469	0.28221	-0.86703	1	0.05	0	-1.23146	0.74209
Área bajo la curva, 2%	Área bajo la curva, 0.5%	0.7875	0.26398	2.98316	0.12449	0.05	0	-0.13554	1.71055
Área bajo la curva, 2%	Área bajo la curva, 1%	1.45273	0.28221	5.14769	0.00319	0.05	1	0.46595	2.4395
Área bajo la curva, 4%	Área bajo la curva, 0%	-0.90517	0.28221	-3.20744	0.08344	0.05	0	-1.89195	0.08161
Área bajo la curva, 4%	Área bajo la curva, 0.5%	0.12702	0.26398	0.48116	1	0.05	0	-0.79603	1.05006
Área bajo la curva, 4%	Área bajo la curva, 1%	0.79224	0.28221	2.80729	0.17051	0.05	0	-0.19453	1.77902
Área bajo la curva, 4%	Área bajo la curva, 2%	-0.66048	0.28221	-2.3404	0.39145	0.05	0	-1.64726	0.32629

Tukey Test		MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Área bajo la curva, 0.5%	Área bajo la curva, 0%	-1.03219	0.26398	5.52965	0.01655	0.05	1	-1.88591	-0.17846
Área bajo la curva, 1%	Área bajo la curva, 0%	-1.69741	0.28221	8.50611	6.63074E-4	0.05	1	-2.61008	-0.78474
Área bajo la curva, 1%	Área bajo la curva, 0.5%	-0.66522	0.26398	3.56376	0.15539	0.05	0	-1.51895	0.1885
Área bajo la curva, 2%	Área bajo la curva, 0%	-0.24469	0.28221	1.22617	0.9031	0.05	0	-1.15736	0.66799
Área bajo la curva, 2%	Área bajo la curva, 0.5%	0.7875	0.26398	4.21882	0.07508	0.05	0	-0.06622	1.64123
Área bajo la curva, 2%	Área bajo la curva, 1%	1.45273	0.28221	7.27993	0.00235	0.05	1	0.54006	2.3654
Área bajo la curva, 4%	Área bajo la curva, 0%	-0.90517	0.28221	4.536	0.05221	0.05	0	-1.81784	0.0075
Área bajo la curva, 4%	Área bajo la curva, 0.5%	0.12702	0.26398	0.68047	0.98757	0.05	0	-0.72671	0.98074
Área bajo la curva, 4%	Área bajo la curva, 1%	0.79224	0.28221	3.97011	0.09942	0.05	0	-0.12043	1.70491
Área bajo la curva, 4%	Área bajo la curva, 2%	-0.66048	0.28221	3.30983	0.20315	0.05	0	-1.57315	0.25219

**Anexo 3.** Resultados del análisis estadístico ANOVA para valores calculados de área bajo la curva de los gráficos de carga vs. desplazamiento de hidrogeles CHI-ALG PEC