

SEP

SES

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**



**Instituto Tecnológico de Tijuana**

**Centro de Graduados e Investigación en Química**

TRABAJO DE TESIS

**“Apósitos citocompatibles de quitosano-gelatina para aplicaciones biomédicas”**

Presentado por

I.Q. Saúl Alan Miranda Ibarra

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN QUÍMICA**

Director de Tesis

Dr. Manuel Alatorre Meda

Co-Directora de Tesis

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

TIJUANA, B.C.

ENERO DEL 2022



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 11/enero/2022  
Oficio No. 012/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 "Apósitos citocompatibles de quitosano-gelatina para aplicaciones biomédicas", presentado por la C. Saul Alan Miranda Ibarra, (con número de control M20210033), 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**

*Manuel Alatorre Meda*  
**DR. MANUEL ALATORRE MEDA**  
Presidente

*Gerardo Aguirre Hernández*

**DR. GERARDO AGUIRRE HERNANDEZ**  
Secretario del Jurado

*Eustolia Rodríguez Velázquez*

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

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



Calzada del Tecnológico s/n Esq. Av. Castillo de Chapultepec  
y calle Cuauhtémoc, Fracc. Tomás Aquino C.P. 22414,  
Tijuana, Baja California.  
(664) 607400 Ext. 101 / e-mail: dir\_tijuana@tecnm.mx  
tecnm.mx | tijuana.tecnm.mx



Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California,

27/enero/2022

OFICIO No. 015/DBPI/2022

Asunto: **Autorización de Impresión de Tesis**

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

En lo referente al trabajo de tesis, "Apósitos citocompatibles de quitosano-gelatina para aplicaciones biomédicas". Presentado por C. Saúl Alan Miranda Ibarra, alumno de la Maestría en Ciencias en Química con numero de control M20210033; 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



Calsada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotsin,  
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 Flores**  
Año de Magón  
PRELUDIO DE LA REVOLUCIÓN PROGRESIVA



# 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, SAÚL ALAN MIRANDA IBARRA, alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Química con número de control M20210033, 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 "Apósitos citocompatibles de quitosano-gelatina para aplicaciones biomédicas" 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. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

SAÚL ALAN MIRANDA IBARRA



*Para mi hermano y mi padre*

*Un abrazo hasta el cielo*

## Contenido

Carta de liberación de tesis.....	ii
Carta de autorización de impresión emitida por la DEPI.....	iii
Carta de cesión de derechos.....	iv
Dedicatorias.....	v
Contenido.....	vi
Lista de simbolos.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
Agradecimientos.....	xiii
Reconocimientos institucionales.....	xiv
Resumen.....	xv
Hoja de publicaciones producto de la tesis.....	xvii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Justificación.....</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 aplicaciones biomédicas.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.1 Quitosano.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.2 Gelatina.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Hidrogeles.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2.1 Efecto del entrecruzante.....</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Apósitos de hidrogel y su impacto en la cicatrización de la piel.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4 Hipótesis.....</b>	<b>13</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>14</b>

4.1	Síntesis de apósitos .....	14
4.2	Caracterización química de los apósitos y sus precursores .....	15
4.3	Caracterización de la topografía y rugosidad de los apósitos. ....	17
4.4	Evaluación de las propiedades de hinchamiento de los apósitos.....	19
4.5	Evaluación de las propiedades mecánicas de los apósitos .....	21
4.6	Evaluación de citocompatibilidad, adhesión y proliferación celular de los apósitos .....	24
V.	EXPERIMENTAL.....	28
5.1	Síntesis de apósitos .....	28
5.2	Caracterización química de los apósitos y materiales precursores .....	29
5.3	Caracterización de la topografía y rugosidad de los apósitos .....	29
5.4	Evaluación de las propiedades de hinchamiento de los apósitos.....	30
5.5	Evaluación de las propiedades mecánicas de los apósitos .....	30
5.6	Evaluación de la citocompatibilidad, adhesión y proliferación celular de los apósitos .....	31
VI.	CONCLUSIONES .....	33
VII.	REFERENCIAS.....	34
	ANEXOS.....	38

## Lista de símbolos

<b>ADA</b>	Dialdehído de alginato
<b>AFM</b>	Microscopía de fuerza atómica
<b>BA</b>	Ácido benzoico
<b>CH</b>	Quitosano
<b>CVD</b>	Deposición química de vapor
<b>D</b>	Difusión aparente
<b>DA</b>	Grado de acetilación
<b>E</b>	Módulo de elasticidad
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>FE-SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier
<b>FTIR-ATR</b>	FTIR por reflexión total atenuada
<b>GA</b>	Glutaraldehído
<b>GE</b>	Gelatina
<b>K</b>	Coefficiente de partición
<b>K<sub>eq</sub></b>	Constante de hinchamiento en el equilibrio
<b>P</b>	Permeabilidad
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PE</b>	2-feniletanol
<b>Ph</b>	Ácido ftálico
<b>PS</b>	Esfuerzo en el punto de fractura
<b>RMN-H</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>S/R</b>	Sin reticular químicamente
<b>TPP</b>	Tripolifosfato de sodio
<b>W<sub>eq</sub></b>	Grado de hinchamiento en el equilibrio



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b>	Estructura química del quitosano	5
<b>Figura 2.</b>	Estructura química de a) glioxal, b) epíclorhidrina y c) glutaraldehído	5
<b>Figura 3.</b>	Estructura química de la gelatina	6
<b>Figura 4.</b>	Micrografías SEM de los cortes transversales de hidrogeles. (A y B) materiales sin entrecruzar, (C y D) con 30 min de inmersión en TPP; (E y F) 1 h de inmersión en TPP y (G y H) 2 h de inmersión en TPP.	7
<b>Figura 5.</b>	Degradación de los hidrogeles en solución de colagenasa	8
<b>Figura 6.</b>	Efecto del tiempo de reticulación en hidrogeles para la proliferación en cultivos celulares	9
<b>Figura 7.</b>	Permeabilidad de la membrana CTS00 con solutos como BA, Ph, PE y SA en distintos medios salinos.	9
<b>Figura 8.</b>	Permeabilidad (a), coeficiente de partición (b) y difusión aparente (c) del ácido salicílico en soluciones de PBS y solución amortiguadora TRIS-Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> en función del grado de reticulación	10
<b>Figura 9.</b>	Histología de secciones de herida pigmentadas con hematoxilina y eosina en los bordes de la herida en (a) sin aplicar hidrogel a 150x y (b) aplicando hidrogel a 300x en el quinto día de observación. Fotografías de heridas en el quinto día de observación; sin aplicar hidrogel (c) y aplicando hidrogel (d).	11
<b>Figura 10.</b>	Histología de secciones de herida pigmentadas con hematoxilina y eosina en la sección transversal de la herida en (a), 60x y (b), 150x en el quinto día de observación. Fotografías de heridas en el quinto día de observación; sin aplicar hidrogel (c) y aplicando hidrogel (d).	12
<b>Figura 11.</b>	Histología de secciones de herida pigmentadas con hematoxilina y eosina en los bordes de la herida en (a) aplicando hidrogel a 15x y (b) sin aplicar hidrogel a 15x en el quinto día de observación. Fotografías de heridas en el quinto día de observación; sin aplicar hidrogel (c) y aplicando hidrogel (d).	12
<b>Figura 12.</b>	Evolución de la reticulación del hidrogel	14
<b>Figura 13.</b>	Sistemas reticulados	15

<b>Figura 14.</b>	a) Espectros de FT-IR normalizados de muestras significativas. b) Acercamiento sobre las bandas de interés. c) Área bajo la banda de interés	16
<b>Figura 15.</b>	Mecanismo de reacción en la formación de bases de Schiff	17
<b>Figura 16.</b>	Imágenes de AFM de membranas a) CH 2:0 GE CVD, b) CH 2:4 GE, c) CH 2:4 GE CVD.	18
<b>Figura 17.</b>	Rugosidad en la superficie de las membranas obtenidas de la región X-Y 10 x 10 $\mu\text{m}$	18
<b>Figura 18.</b>	Curvas de hinchamiento de los apósitos de hidrogel	19
<b>Figura 19.</b>	Gráfica de cinética de hinchamiento de segundo orden	20
<b>Figura 20.</b>	Curva de constante de hinchamiento en el equilibrio vs concentración de gelatina en el sistema	20
<b>Figura 21.</b>	Curva de grado de hinchamiento en el equilibrio vs concentración de gelatina en el sistema	21
<b>Figura 22.</b>	a) Gráficas de esfuerzo-desplazamiento de membranas CH 2:0 GE – CH 2:4 GE reticulados en solución con 1 % v/v de GA. Análisis estadístico de apósito respecto a b) fuerza en la fractura, c) pendiente en la región elástica y d) Área bajo la curva.	22
<b>Figura 23.</b>	Gráfica de esfuerzo-desplazamiento de membranas CH 2:4 GE a distintas concentraciones de GA (0-1 % v/v).	23
<b>Figura 24.</b>	Gráfica de esfuerzo-desplazamiento de membranas CH 2:0 GE a CH 2:4 GE mediante CVD en 0.05% de GA.	24
<b>Figura 25.</b>	Muestras de lixiviados a) CH 2:4 GE 1% v/v de GA en solución y b) CH 2:4 GE CVD 0.05% v/v GA durante 24 h.	25
<b>Figura 26.</b>	Porcentaje de viabilidad celular de la membrana CH 2:4 GE CVD 0.05% GA a distintos tiempos de incubación	25
<b>Figura 27.</b>	Adhesión y proliferación celular sobre membranas CH 2:4 GE y CH 2:4 GE CVD a 24 h	26
<b>Figura 28.</b>	Micrografías de fluorescencia confocal de células xxxx después de 24 h de sembrarlas en la superficie de la membrana seleccionada. Las células vivas (teñidas	27

con calceína AM) aparecen en verde y las células muertas (teñidas con yoduro de propidio) aparecen en rojo. Las barras de escala para la superficie y el zoom son de 200 y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

**Figura 29.** Diagrama de flujo del proceso para la preparación de hidrogeles mediante la técnica de evaporación del solvente 29

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Módulo de elasticidad (E) y punto de fractura (PS) de membranas CH 2:0 GE al CH 2:4 GE reticulados en solución con 1 %v/v GA	22
<b>Tabla 2.</b>	Módulo de elasticidad (E) y punto de fractura (PS) de membranas CH 2:4 GE reticulados a distintas concentraciones de GA (0-1 %v/v)	23
<b>Tabla 3.</b>	Módulo de elasticidad (E) y punto de fractura (PS) de membranas CH 2:4 GE reticulados por CVD con 0.05 %v/v GA.	23

## **Agradecimientos**

A Dios, por darme vida y la oportunidad de poder realizar este proyecto con el cual me puedo sentir realizado tanto académica y profesionalmente.

A mis asesores, Dr. Manuel Alatorre Meda, y Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez, por brindarme su gran confianza, apoyo constante durante la realización de este trabajo, así como por darme la oportunidad de permitirme contribuir en su grupo de investigación.

A los integrantes de mi comité por haber dedicado su tiempo en la revisión de este trabajo: Dr. Gerardo Aguirre Hernández.

A todos y cada uno de los profesores que estuvieron proporcionando su conocimiento y apoyo académico.

A mis compañeros de laboratorio que estuvieron apoyándome y no menospreciando cualquier duda que tuviese, así como a mis amigos y compañeros de grupo que me motivaron a seguir adelante y que compartieron experiencias conmigo.

Finalmente, y de manera especial para los que ya no están con nosotros, a mis familiares que siempre estuvieron ahí para mí ante cualquier situación.

## **Reconocimientos institucionales**

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de Cultivo Celular y Microscopia Confocal del Grupo de Biomateriales y Nanomedicina del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana, bajo la dirección del Dr. Manuel Alatorre Meda y la codirección de la Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez.

Se agradece el apoyo brindado por el CONACyT para la realización de estudios de posgrado (No. De registro 1037712) 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**

### **“Apósitos citocompatibles de quitosano-gelatina para aplicaciones biomédicas”**

por

**Saúl Alan Miranda Ibarra**

Maestro en Ciencias en Química

Instituto Tecnológico de Tijuana, 2022

**Dr. Manuel Alatorre Meda**

Director de tesis

**Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez**

Co-directora

Una de las causas más comunes de muerte durante la etapa de recuperación de una lesión cutánea es la necrosis de la zona dañada, esto debido al poco cuidado que se le da a la herida. En los últimos años, la ingeniería de tejidos ha desarrollado materiales que propician un ambiente adecuado para que se lleve a cabo el proceso de cicatrización. Dentro de los materiales recientemente desarrollados se encuentran los apósitos, los cuales son hidrogeles que ayudan a absorber los exudados durante la cicatrización y brindan además la posibilidad de liberar sustancias bioactivas al sitio de la herida.

En este trabajo se prepararon apósitos citocompatibles de hidrogel mediante la técnica de moldeo y evaporación de solvente, en donde se utilizaron soluciones poliméricas de quitosano (CH) y gelatina (GE). Para volver al hidrogel más rígido y consistente, se reticuló con glutaraldehído (GA). Como variables de experimentación se exploraron distintas concentraciones de GE y GA, así como dos mecanismos de reticulación (en disolución y por CVD) Cada uno de los apósitos fueron caracterizados en términos de su composición química, topografía, rugosidad, hinchamiento, propiedades mecánicas, citocompatibilidad, adhesión y proliferación celular.



## **Hoja de publicaciones producto de la tesis**

Presentación oral en XII Simposio Internacional de Investigación Química en la Frontera titulado “Chitosan-gelatin membranes for wound dressing: effect of gelation on the swelling equilibrium” con ID 159.

Presentación oral en 4to Coloquio en Materiales de Interés Biotecnológico: “Perspectivas en la Salud Humana” titulado “Chitosan-gelatin cytocompatible dressings: synthesis and biological evaluation” con ID CMIB-MJI-2021-06.

## I. INTRODUCCIÓN

Una lesión es un daño que ocurre en el cuerpo y este puede ser causado por quemaduras, golpes, accidentes, entre otros. Las heridas son lesiones que dañan al tejido cutáneo, subcutáneo e inclusive muscular de cierta área en el cuerpo humano. La recuperación de una herida implica la ocurrencia de un proceso en varias etapas: la coagulación, inflamación, proliferación y cicatrización.<sup>1</sup> La coagulación tiene como función detener la hemorragia de la zona afectada. Consecuentemente, en la etapa de inflamación, se lleva a cabo un proceso exudativo en el cual las células inflamatorias producen enzimas lisosomales, así como especies reactivas de oxígeno las cuales ayudan a propiciar un ambiente antibacteriano. Seguido de esto, es en la etapa de proliferación donde los queratinocitos se estiran y contraen para formar una barrera en la parte superior de la herida que no permite el contacto con bacterias y especies exógenas durante el desarrollo y la expansión de los fibroblastos. Por último, la cicatrización de la herida culmina con la etapa de maduración que tiene como objetivo alcanzar el esfuerzo tensil máximo de la zona recuperada después de la degradación, organización y resintetización de la matriz extracelular.<sup>2-4</sup>

Para llevar a cabo este proceso, es necesario que el área dañada cuente con un ambiente en donde el pH, humedad y presión de oxígeno sean los adecuados, así como una atmosfera antimicrobiana.<sup>5,6</sup> El organismo puede propiciar este ambiente, además de presentar respuesta rápida en la cicatrización de heridas con áreas pequeñas, sin embargo, es difícil llevar a cabo este procedimiento cuando el área de la herida es relativamente grande. En busca de nuevos tratamientos para la regeneración cutánea, de unos años a la fecha se ha explorado el desarrollo de apósitos de hidrogel con distintas propiedades, en particular películas delgadas, rugosas y resistentes capaces de propiciar la adhesión y propagación de células de la dermis.<sup>7-12</sup>

Un hidrogel es una red polimérica tridimensional capaz de retener su peso en agua para después liberarlo o difundirlo al exterior. Es debido a esta peculiaridad que los apósitos de hidrogel son muy atractivos para el tratamiento de heridas, ya que al mismo tiempo de propiciar la retención de sus exudados son capaces de liberar fármacos al estar en contacto directo con ellas. Entre los distintos materiales poliméricos a partir de los cuales se pueden sintetizar los apósitos de hidrogel se destacan los biopolímeros naturales, mismos que se pueden obtener de

distintas fuentes como el almidón (tubérculos), algas (alginato) bacterias (dextrano), plantas y derivados (celulosa), etc. De particular atención para este proyecto serán el quitosano (CH) y la gelatina (GE) que se distinguen por su citocompatibilidad y biodegradabilidad (además de otras propiedades importantes que serán descritas más adelante).

En este trabajo se prepararon apósitos de hidrogel a partir de soluciones poliméricas de CH y GE reticulados con GA, variando la concentración de GE y el agente reticulante glutaraldehído (GA), así como el método de reticulación (en disolución y por deposición química de vapor CVD). Los hidrogeles sintetizados se caracterizaron mediante espectroscopia de infrarrojo por reflexión total atenuada (FTIR-ATR), microscopía de fuerza atómica (AFM), gravimetría (ensayos de hinchamiento) ensayos mecánicos de punción, y ensayos biológicos de sembrado celular, tinción celular, ELISA y microscopías óptica y de fluorescencia confocal. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de los resultados por el método de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con métodos posthoc Tukey y Bonferroni.

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1 Justificación

Las heridas son lesiones que dañan la piel y otros tejidos del cuerpo, los cuales son causados como resultado de un accidente, incisión quirúrgica, entre otros. El cuerpo humano tiene la capacidad de llevar a cabo la cicatrización de heridas en áreas relativamente pequeñas, aunque para áreas mayores es necesario observar un control en las condiciones de cicatrización, primordialmente para evitar la infección de la misma. En el contexto de la ingeniería de tejidos, a la fecha se han desarrollado materiales biocompatibles, biodegradables y no tóxicos, los cuales propician este tipo de ambientes de cicatrización y que también presentan la posibilidad de ser cargados con algún fármaco de interés para su difusión controlada. Para que un biomaterial pueda ser considerado en la práctica clínica, este debe ser validado como efectivo, seguro y costeable. Derivado de esta necesidad, surge el interés de este proyecto por desarrollar un sistema con tales características.

### 2.2 Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es desarrollar apósitos citocompatibles a base de CH y GE para aplicaciones biomédicas.

### 2.3 Objetivos específicos

- Sintetizar apósitos de CH y GE por la técnica de moldeo y evaporación de solvente, explorando como variables las concentraciones de GE y GA (agente reticulante), así como el mecanismo de reticulación (en disolución y por CVD).
- Caracterizar los apósitos de hidrogel y materiales precursores en términos de su estructura y composición química por FTIR-ATR.
- Evaluar los apósitos de hidrogel en términos de sus propiedades fisicoquímicas y de superficie por ensayos de hinchamiento y AFM.
- Evaluar apósitos seleccionados en términos de sus propiedades biológicas por ensayos de sembrado celular, tinción celular, ELISA y microscopías óptica y de fluorescencia confocal.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Biopolímeros en aplicaciones biomédicas

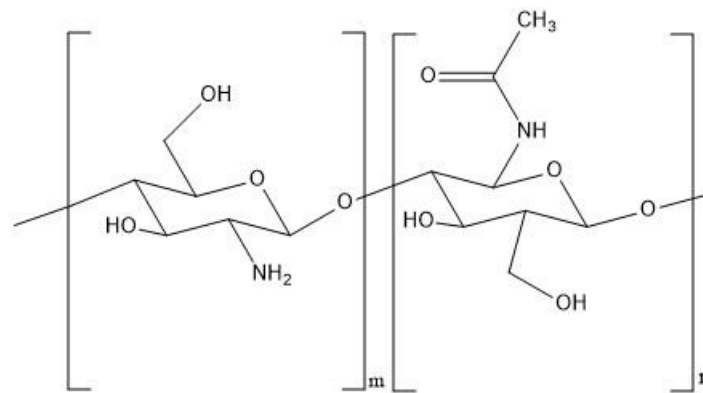
Los biopolímeros son polímeros de origen natural compuestos por series de unidades de monosacáridos (monómeros) que se mantienen unidos mediante enlaces glucosídicos. Los biopolímeros están fácilmente disponibles a partir de diversas fuentes, como las algas (alginato), plantas (almidón), animales (quitosano) y microorganismos (dextrano). Como se reportó en la literatura reciente, pueden modificarse fácilmente química y bioquímicamente y son altamente estables, seguros, no tóxicos, hidrófilos, formadores de gel y, lo que es más importante, a menudo biodegradables, lo que respalda su uso cada vez mayor en aplicaciones de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Además, dentro del cuerpo humano realizan funciones biológicas únicas, desde la señalización celular hasta el reconocimiento inmunológico.<sup>13</sup>

Ejemplos de biopolímeros empleados de forma recurrente para producir vehículos o dispositivos para la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa incluyen al quitosano, dextrano, ácido hialurónico, alginato, heparina, gelatina, almidón, entre otros, los cuales están presentes en la matriz extracelular de células y tejidos. Dos de los biopolímeros más estudiados en la actualidad para aplicaciones biomédicas son el CH y la GE.

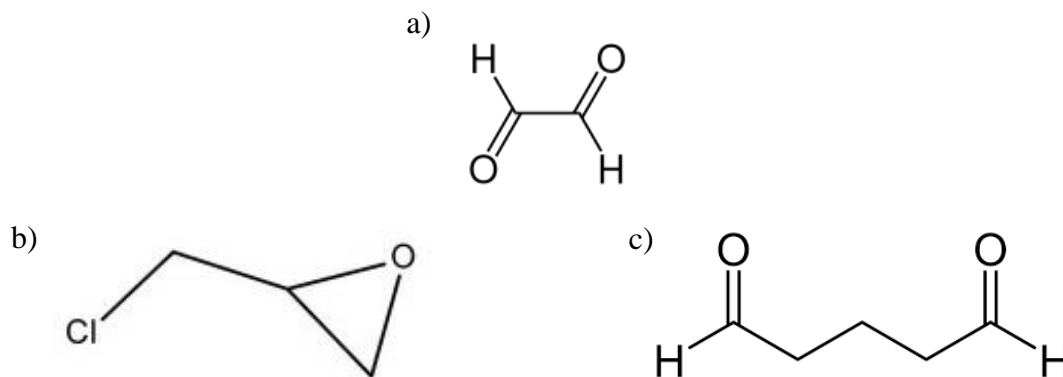
##### 3.1.1 Quitosano

El CH es un polisacárido biocompatible y biodegradable constituido por unidades de  $\beta$ -1,4-anhidroglucosamino y N-acetil- $\beta$ -1,4-anhidroglucosamino (Figura 1), proveniente de la desacetilación parcial de la quitina (que es extraído de cáscaras de crustáceos), ya sea por medio alcalino o por hidrólisis enzimática. El CH es identificado por la fracción de residuos de las unidades N-acetilglucosamino en la cadena polimérica que se designa por el grado de acetilación (DA). El DA influye de manera importante en las propiedades fisicoquímicas del CH, como la solubilidad, reactividad, biodegradabilidad y la respuesta celular.<sup>14,15</sup> También dictado por el DA, el CH posee aminas alifáticas que pueden ser protonadas por ácidos, presentando valores de pKa de entre 6.3-6.5.<sup>16</sup> Importante, la presencia de grupos amino en la estructura del biopolímero le provee catiónicidad y consecuentemente la capacidad de formar complejos de polielectrolitos y derivados de nitrógeno.<sup>17,18</sup> Este biopolímero presentan biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como de toxicidad nula y antimicrobial.

Debido a lo anterior, el CH se ha estado utilizando en ingeniería de tejidos ya sea en geles, membranas, nanofibras, micropartículas, nanopartículas, andamios, esponjas, etc.<sup>11</sup> Por su naturaleza química, el CH presenta propiedades mecánicas pobres, las cuales pueden ser mejoradas utilizando un entrecruzante como glioxal (Figura 2 a) , epiclorhidrina (Figura b) o glutaraldehído (Figura 2 c) y mezclándolo con otros biopolímeros.<sup>19</sup>



**Figura 1.** Estructura química del quitosano.



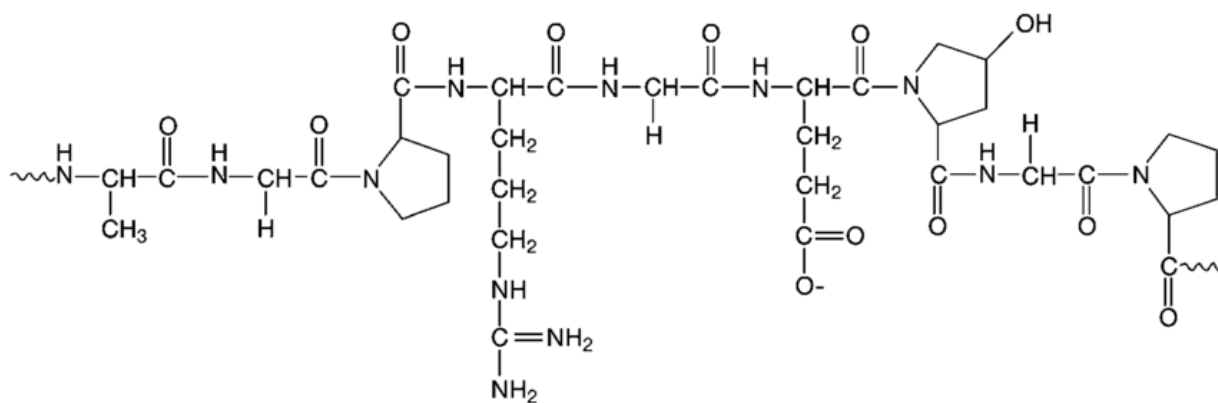
**Figura 2.** Estructura química de a) glioxal, b) epiclorhidrina y c) glutaraldehído.

### 3.1.2 Gelatina

Por otra parte, la GE es un polipéptido obtenido a partir de la desnaturalización del colágeno de tipo I y este mismo se puede obtener de distintas fuentes tanto de origen marino, bovino, porcino, aviario, etc.<sup>20</sup> Dependiendo del tratamiento que se lleve a cabo para su desnaturalización, se obtienen dos tipos de GE: en la extracción ácida se obtiene GE de tipo A y en la extracción alcalina se obtiene GE de tipo B. Se reportado que la GE de tipo A tiene su

punto isoeléctrico de pH 7-9 y la GE de tipo B presenta su punto isoeléctrico de pH 4.8-5.11.<sup>21,22</sup> La GE está constituida comúnmente por 18 aminoácidos los cuales se ordenan o se encuentran en mayor proporción que otros dependiendo de la fuente de origen (Figura 3).

Asimismo, es comúnmente representada como un oligopéptido de glicina, prolina e hidroxiprolina.<sup>23,24</sup> Sin embargo, este biopolímero cuenta con grupos colgantes que pueden tener interacción con grupos reticulantes. Los grupos amino de la lisina son los previstos y espacialmente habilitados para interaccionar, ya que estos se encuentran en la posición  $\epsilon$  de la estructura del aminoácido, lo cual deja al grupo amino expuesto hacia el solvente. Además cabe destacar que, por el pH fisiológico de la GE en aplicación, el grupo amino de la lisina queda cargado positivamente debido al pKa de 10.5 con el que cuenta.<sup>25</sup> La GE presenta excelentes propiedades tanto de biodegradabilidad como de formación de películas, sin embargo, su aplicación se ve limitada debido a sus limitadas propiedades mecánicas y su rápida disolución en medio acuosos. Al igual que el CH, las propiedades de la GE también se pueden mejorar utilizando un entrecruzante y mezclándola con otros polímeros.<sup>26,27</sup>



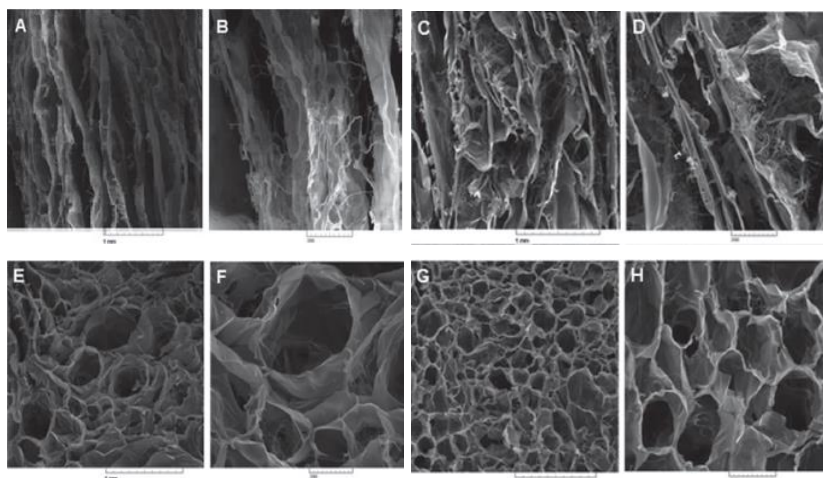
**Figura 3.** Estructura química de la gelatina.

### 3.2 Hidrogeles

Un ambiente con pH, humedad, ambiente antiséptico y de presión de oxígeno apropiados acelera el proceso de cicatrización de una herida; este tipo de ambientes puede ser procurado con la utilización de apósitos de hidrogel.<sup>28</sup> Estos materiales pueden funcionar además como vehículos para la liberación controlada de fármacos, lo cuales son una alternativa para regular

la biodisponibilidad de los agentes terapéuticos al mismo tiempo de absorber exudados de una herida. Dependiendo de la formulación del agente terapéutico y la aplicación, el fármaco puede ser liberado desde unas horas hasta meses.<sup>29</sup>

Para sustentar este proyecto, se realizó una revisión bibliográfica sobre la preparación de hidrogeles de CH y GE reticulados. Rusanu y colaboradores sintetizaron apósitos de hidrogel con CH y GE.<sup>30</sup> Se prepararon por separado soluciones acuosas de CH y GE de 2 %p/p en 1 %p/v en CH<sub>3</sub>COOH. Se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones poliméricas por 6 h a 25 °C y las mezclas resultantes fueron liofilizadas. El material fue inmerso en una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) al 1 %p/p y puesto en contacto con el reticulante en intervalos de 0, 30, 60 y 120 min.

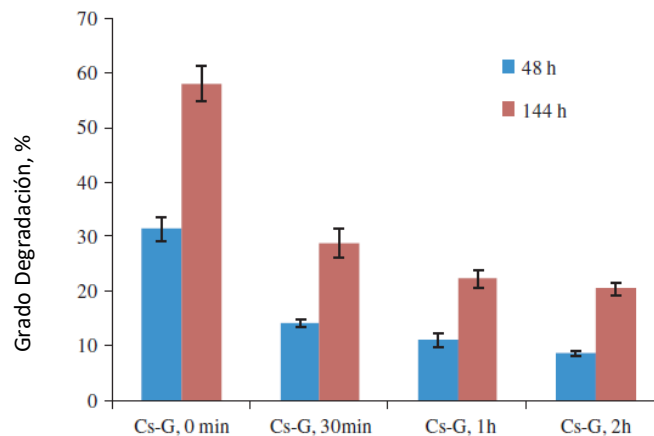


**Figura 4.** Micrografías SEM de los cortes transversales de hidrogeles. (A y B) materiales sin entrecruzar, (C y D) con 30 min de inmersión en TPP; (E y F) 1 h de inmersión en TPP y (G y H) 2 h de inmersión en TPP.

El material fue liofilizado y se caracterizó su morfología y los efectos del entrecruzamiento con TPP mediante microscopía electrónica de barrido. Los hidrogeles reticulados con TPP presentan una estructura más uniforme y con poros esféricamente delimitados (Figura 4). En la Figura 5 se observa el grado de degradación que tuvieron los hidrogeles reticulados con tiempo de inmersión de 0, 30, 60 y 120 min en la solución de colagenasa por 48 y 144 h. Se observó que hay un mayor grado de degradación del hidrogel con el tiempo de incubación con la enzima,

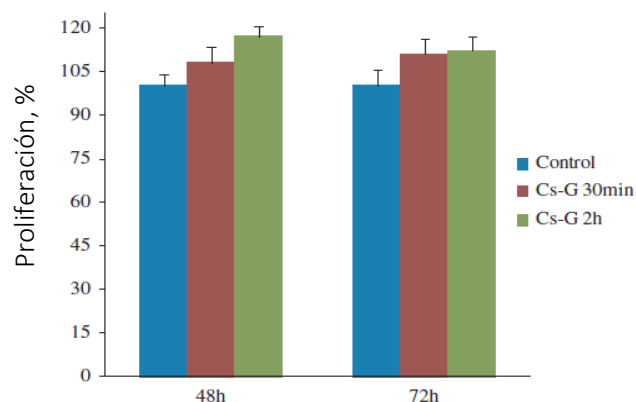


sin embargo, cabe destacar también que a medida que se incrementa el tiempo de inmersión del hidrogel en TPP tiende a generar una resistencia mayor a la degradación.



**Figura 5.** Degradación de los hidrogeles en solución de colagenasa.

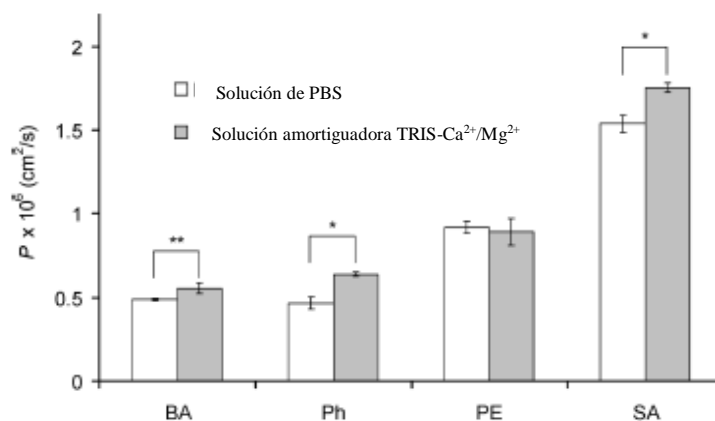
La carga del fármaco, Norfloxacin por sus propiedades antibacteriales, fue llevada a cabo mediante el mecanismo de Korsmeyer y Peppas, sumergiendo muestras de hidrogel seco (20 mg) en 5 mL de una solución al 2 %p/p del fármaco a temperatura ambiente por 72 h.<sup>31</sup> Los resultados muestran un intervalo de eficiencia de carga del 59.5 hasta 82.27% (hidrogeles reticulados de 2 h a 30 min con TPP). Estos resultados sugieren que la eficiencia en el proceso de incorporación de fármacos a los hidrogeles depende directamente de la estructura, porosidad e interconexión de poros, todos ellos gobernados por el grado de reticulación. Los perfiles de liberación del fármaco denotan una eficiencia hasta del 66.85% en 24 h. Por último, los hidrogeles se caracterizaron por ensayos de citotoxicidad en donde los hidrogeles de control, 30 min y 2 h de reticulación fueron mantenidos en un cultivo con fibroblastos durante 48 y 72 h.<sup>32</sup> En ambos se observa un efecto de la matriz polimérica debido a la gran proliferación celular que hay en el hidrogel de 2 h de reticulación comparado con los demás (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto del tiempo de reticulación en hidrogeles para la proliferación en cultivos celulares.

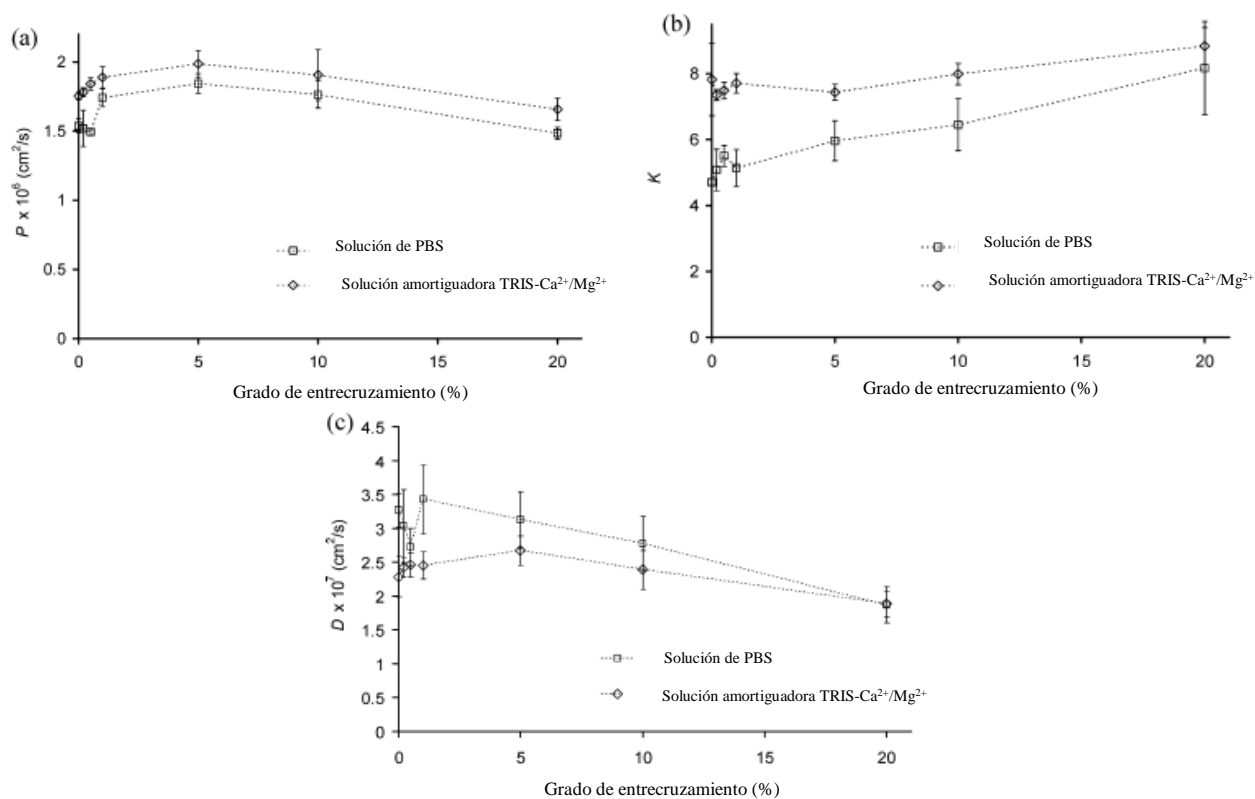
### 3.2.1 Efecto del entrecruzante

Se revisó el trabajo de da Silva y colaboradores, en donde sintetizaron membranas de CH por entrecruzamiento con GA en distintas concentraciones desde  $5 \times 10^{-4}$  hasta 0.1 M, dando como resultado membranas con grado de entrecruzamiento desde 0.1 hasta el 20%, respectivamente (CTS0.1 – CTS20).<sup>33</sup> Los autores llevaron a cabo estudios de permeación de iones empleando una celda de difusión lateral, donde las membranas sintetizadas fueron equilibradas con una solución amortiguadora de pH y colocadas a la mitad de la celda entre los compartimentos del receptor y el donador, las concentraciones de ambos compartimentos fueron monitorizadas constantemente por espectroscopia de UV-Vis.



**Figura 7.** Permeabilidad de la membrana CTS00 con solutos como BA, Ph, PE y SA en distintos medios salinos.

Los aniones utilizados fueron ácido benzoico, ácido ftálico y ácido salicílico (BA, Ph y SA, por sus siglas en inglés, respectivamente) y como ión neutro se empleó 2-feniletanol (PE, por sus siglas en inglés). En la Figura 7 se puede observar la permeación de los distintos solutos en una membrana sin GA, donde el SA presenta una permeación mucho mayor que los demás solutos. También se realizaron caracterizaciones de permeabilidad ( $P$ ), coeficiente de partición ( $K$ ) y de difusión aparente ( $D$ ) utilizando las membranas reticuladas a distintos grados de reticulación. En la Figura 8a se muestra un incremento de la permeabilidad desde CTS00 hasta CTS05, sin embargo se define un declive de esta tendencia cuando se incrementa el grado de reticulación (hasta CTS20).



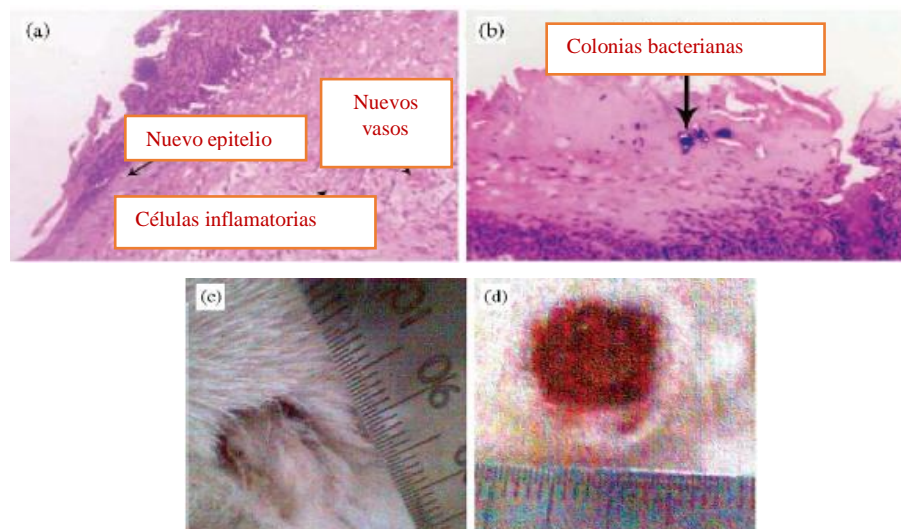
**Figura 8.** Permeabilidad (a), coeficiente de partición (b) y difusión aparente (c) del ácido salicílico en soluciones de PBS y solución amortiguadora TRIS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{+2}$  en función del grado de reticulación.

Además, cabe resaltar que hay una mayor permeación cuando los hidrogeles se encuentran en solución amortiguadora y se debe a la propiedad de quelación que tienen los grupos aminos.<sup>34</sup>

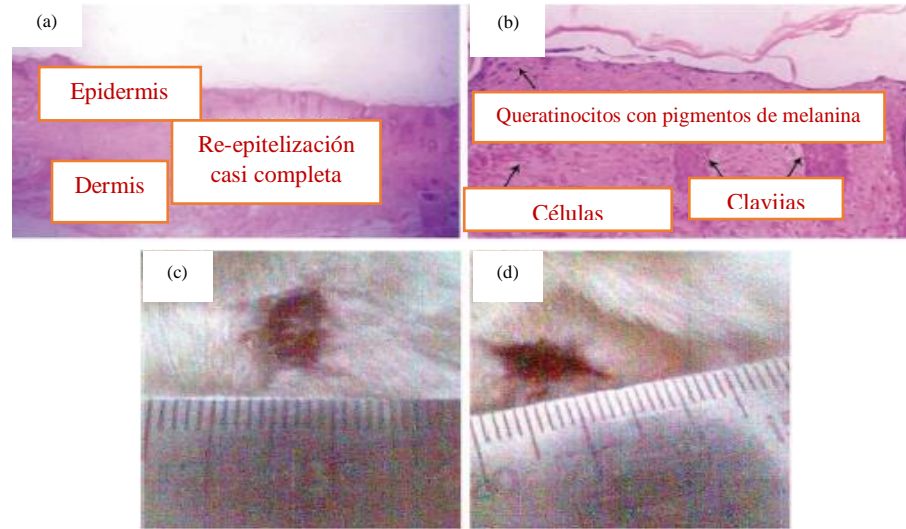
Asimismo, hay una tendencia creciente en la  $K$  a medida que se incrementa el grado de reticulación en las muestras (Figura 8b).<sup>35</sup> La  $D$  puede ser calculada a partir de la razón de  $P/K$  y en la Figura 8c se observa un declive de la difusión aparente a medida que se incrementa el grado de reticulación, llegando a converger las difusiones de ambas soluciones salinas en una misma muestra (CTS20).

### 3.3 Apósitos de hidrogel y su impacto en la cicatrización de la piel

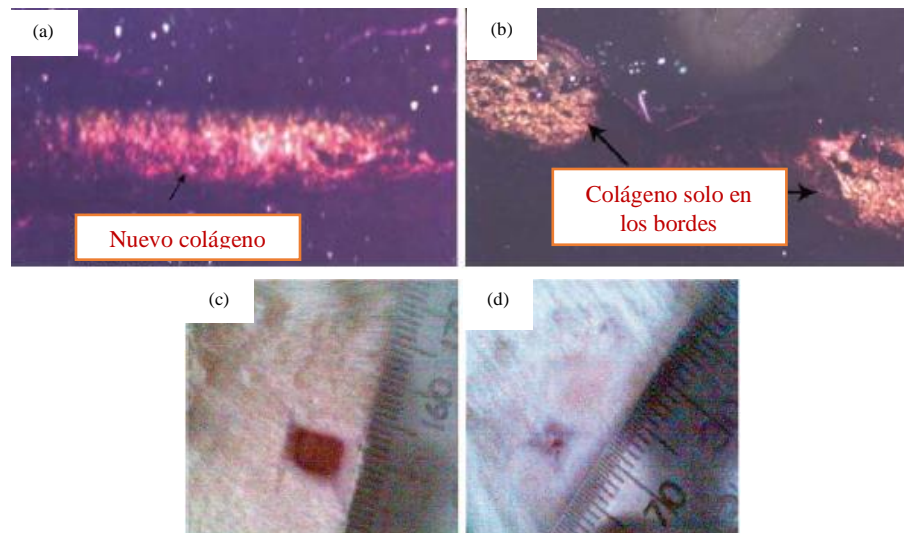
Balakrishnan y colaboradores prepararon hidrogeles a partir de soluciones de 20 %p/p de dialdehído de alginato (ADA, por sus siglas en inglés) con un grado de oxidación del 57% y una solución al 15 %p/p de GE., esto en presencia de Bórax 0.1 M.<sup>36</sup> Lo más destacable de este trabajo es la caracterización biológica lograda en los hidrogeles, mismos que se estudiaron durante 5, 10 y 15 días para observar la epitelización de las incisiones hechas en algunas ratas. En el día 5 de observación se denotaron gránulos de inflamación en la dermis, necesario como prerrequisitos para iniciar la curación.<sup>37</sup> Además, se encontraron colonias de bacterias en la incisión sin hidrogel, mientras que la incisión con hidrogel no tuvo colonias, esto se le atribuye al medio antiséptico que promueve el Bórax (Figura 9).<sup>38</sup>



**Figura 9.** Histología de secciones de herida pigmentadas con hematoxilina y eosina en los bordes de la herida en (a) sin aplicar hidrogel a 150x y (b) aplicando hidrogel a 300x en el quinto día de observación. Fotografías de heridas en el quinto día de observación; sin aplicar hidrogel (c) y aplicando el hidrogel (d).



1. Histología de secciones de herida pigmentadas con hematoxilina y eosina en la sección transversal de la herida en (a), 60x y (b), 150x en el quinto día de observación. Fotografías de heridas en el quinto día de observación; sin aplicar hidrogel (c) y aplicando el hidrogel (d).



**Figura 11.** Histología de secciones de herida pigmentadas con hematoxilina y eosina en los bordes de la herida en (a) aplicando hidrogel a 15x y (b) sin aplicar hidrogel a 15x en el quinto día de observación. Fotografías de heridas en el quinto día de observación; sin aplicar hidrogel (c) y aplicando el hidrogel (d).

Durante el día 10 hubo formación de colágeno nuevo y de nuevo tejido, casi por cerrar la herida, y también se denotó la formación de tejido granular, el cual es esencial para el cierre de

la herida (Figura 10). Para los 15 días de observación, el área afectada se volvió pequeña y de tejido proliferativo de fibroblastos. Además, se observa colágeno completamente formado en la dermis (Figura 11).

### **3.4 Hipótesis**

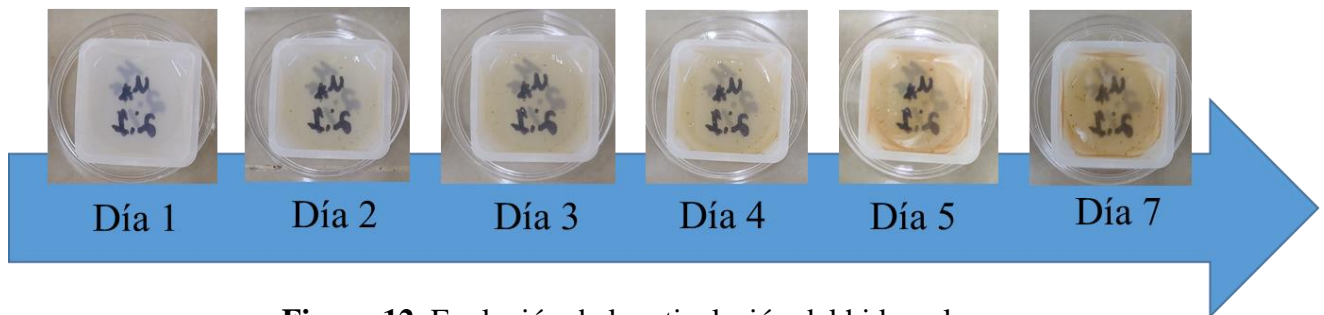
Los apósitos de hidrogel preparadas a base de CH y GE serán citocompatibles, presentarán las propiedades mecánicas adecuadas para su aplicación potencial en el terreno biomédico.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

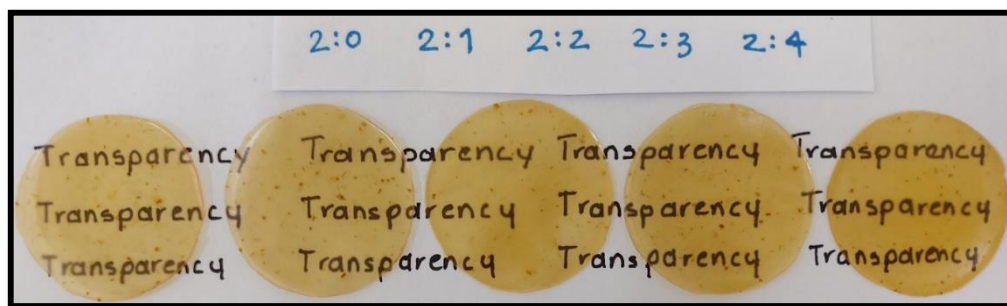
### 4.1 Síntesis de apósitos

Se prepararon apósitos de hidrogel con una solución fija de CH al 2 %p/v y soluciones de GE con concentraciones variables del 0 al 4 %p/v, replicando cada apósito por triplicado (M1-M3) y etiquetándolos según su concentración (CH 2:0 GE – CH 2:4 GE). En la Figura 12 se muestran fotografías en vista de planta de la membrana CH 2:1 GE en función del tiempo. Se puede observar a partir del primer día las membranas adoptan una tonalidad amarilla tenue la cual se va intensificando a con el tiempo hasta alcanzar una tonalidad ocre. Además, este cambio de tonalidad no solo cambia con el tiempo sino también con la concentración de GE, es posible observar en la Figura 13 que a medida que se incrementa la concentración de este último la tonalidad amarillo ocre se intensifica. Lo anterior se atribuye a la progresión paulatina de la reticulación mediada por el GA resultando en la formación de bases de Schiff. La formación de bases de Schiff por reticulación de polisacáridos da lugar a un cambio de color amarillo tenue a amarillo ocre.<sup>39</sup>

Muy importante, las membranas obtenidas mostraron una tonalidad y espesores uniformes después de su desmolde, lo que significa que la técnica desarrollada/optimizada es reproducible.



**Figura 12.** Evolución de la reticulación del hidrogel



**Figura 13.** Sistemas reticulados

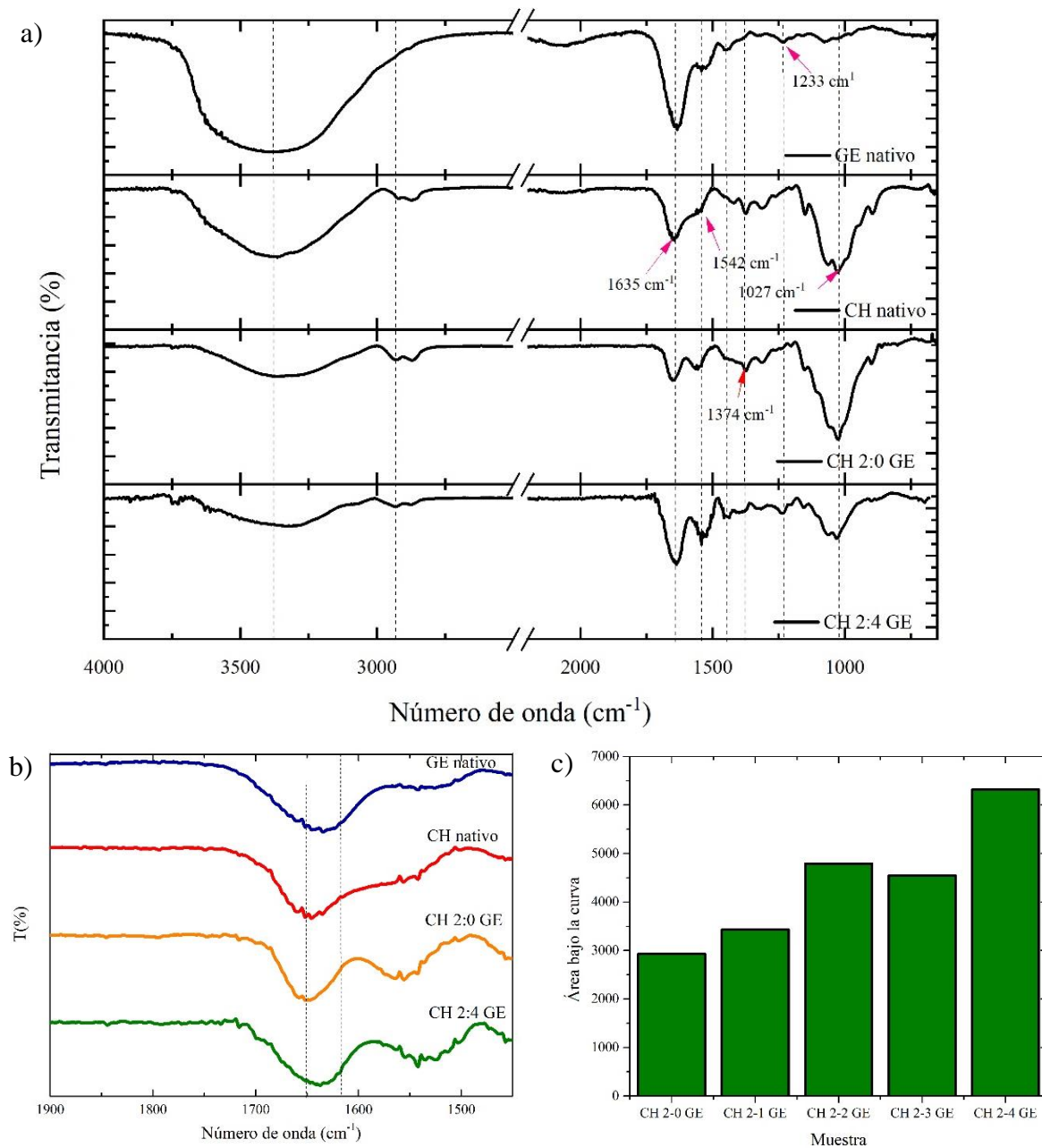
#### 4.2 Caracterización química de los apósitos y sus precursores

El efecto de la adición del reticulante y la variación de la concentración de GE en la matriz polimérica provoca un aumento o decremento en la intensidad de las bandas en el infrarrojo debido a la aparición de nuevos enlaces provocados por la condensación de aminas (en nuestro caso provenientes de CH y GE) con un grupo carbonilo (provenientes del GA) en la red polimérica.<sup>40</sup> En la Figura 14 a) es posible observar las bandas características e invariables de 3372 ( $-\text{OH}$  y  $-\text{NH}_2$ ), 2926 ( $-\text{CH}$ ), 1542 (amida II) y  $1027\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{C}-\text{O}$  y  $\text{C}-\text{C}$ ). Sin embargo, cabe denotar que la señal a  $1635\text{ cm}^{-1}$  en una primera instancia se señaló como una amida I, la cual es característica de estos grupos después de llevar a cabo la desacetilación de la quitina.

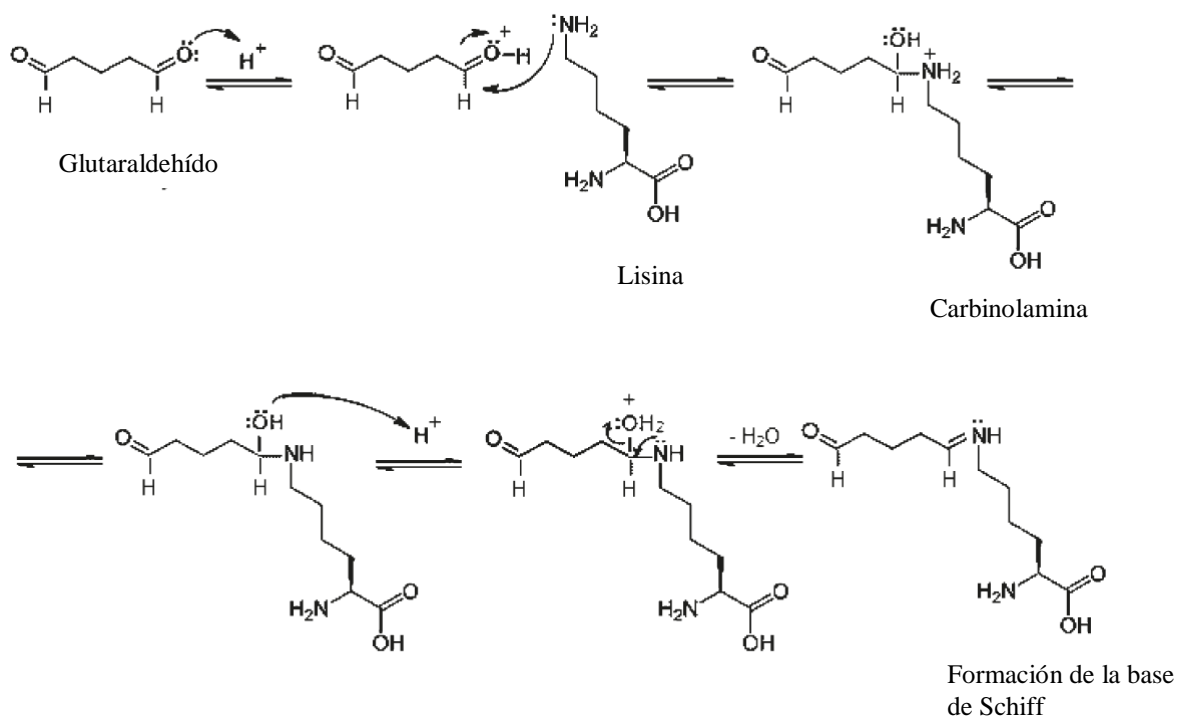
En la Figura 14 b) se presenta un acercamiento de la banda a  $1635\text{ cm}^{-1}$  en donde es posible denotar un crecimiento de esta banda a medida que se incrementa la concentración de GE en la matriz polimérica. Lo que se sabe de esta banda es que corresponde a la vibración de amidas tipo I presentes de manera natural en los polisacáridos, sin embargo, también es característica de la formación de bases de Schiff. La Figura 15 determina el mecanismo de reacción de la formación de bases de Schiff en donde se involucra la adición nucleofílica de los grupos  $\epsilon$ -amino hacia los grupos carbonilo de uno de los aldehídos terminales del glutaraldehído para formar un intermediario llamado carbinolamina, seguido de la protonación del grupo hidroxilo y de la pérdida de agua hasta llegar a la formación de la imina (base de Schiff).<sup>41,42</sup> Por lo tanto, el crecimiento observado en nuestros sistemas con la reticulación se atribuye a esto último. Esto también se puede corroborar con el área bajo la curva de la banda de interés (Figura 14 c) donde a medida que se incrementa de concentra la concentración de GE el área de la banda aumenta.



Cabe mencionar también que por las condiciones ácidas y por la especie del reticulante es muy probable que se lleve este tipo de mecanismos.<sup>39</sup>



**Figura 14.** a) Espectros de FTIR-ATR normalizados de muestras reticuladas con 1% de GA. b) Acercamiento de bandas de interés. c) Área bajo la curva de la banda a 1635 cm<sup>-1</sup> (se incluyen resultados de las muestras CH 2:1 GE, CH 2:2 GE y CH 2:3 GE, cuyos espectros no son mostrados en los gráficos a) y b)



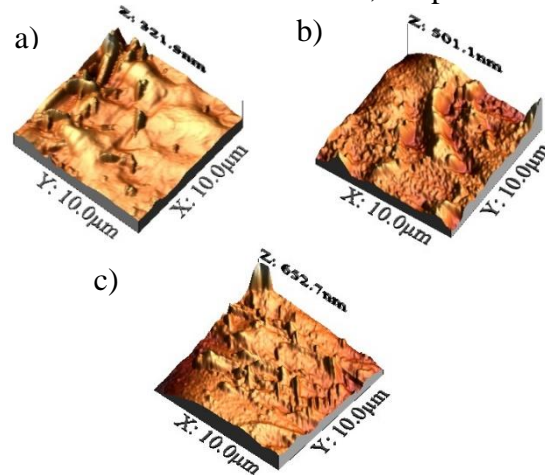
**Figura 15.** Mecanismo de reacción en la formación de bases de Schiff

#### 4.3 Caracterización de la topografía y rugosidad de los apósitos.

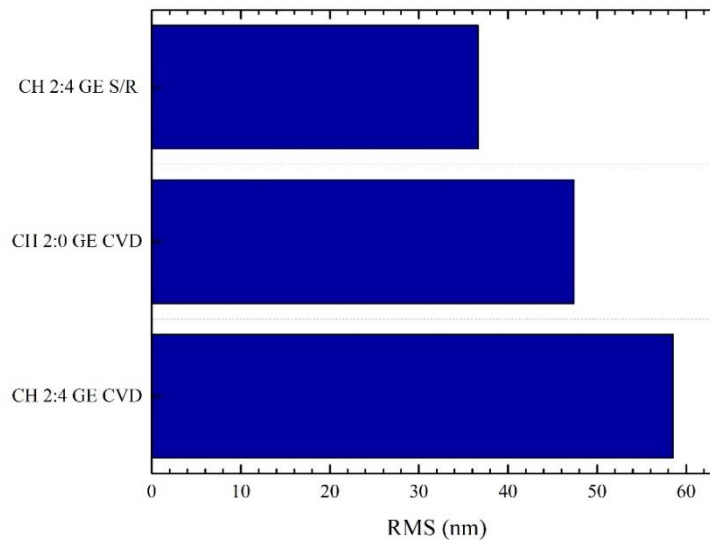
Apósitos seleccionados (CH 2:0 GE y CH 2:4 GE) fueron reticulados por CVD y caracterizados por AFM, estudiando también la muestra CH 2:4 GE como blanco de comparación. Se obtuvieron micrografías en 3D a partir de las cuales se determinó la rugosidad de cada muestra (Figuras 16 a-c y 17). En las Figuras 16 a-c se muestran las micrografías 3D obtenidas donde se destaca que los apósitos reticulados por CVD (Figuras 16 b y 16 c) presentan protusiones con mayor proporción y mayor altura que la muestra sin reticular (Figura 16 a) del apósito CH 2:4 GE el cual presenta una superficie mayormente plana con valles muy separados dejando una especie de llanuras en el material, además de que estos valles se encuentran a una altura medianamente corta.

Estos resultados reflejan el efecto marcado de la reticulación superficial derivada del reordenamiento de las cadenas poliméricas. Con la evolución del proceso de reticulación, las cadenas poliméricas se unen gradualmente unas con otras, reduciendo así su movilidad debido a las limitaciones de espacio y al incremento de interacciones laterales, reorganizándose así en

conformaciones empaquetadas con dimensiones incrementadas. En la subfase, las cadenas se enredan con vecinos homólogos en su mayoría, mientras que las interfaces también pueden formar ondulaciones intramoleculares que son propensas a hidratarse por la humedad ambiental.<sup>43</sup> Finalmente, si el área superficial se restringe aún más por el enredamiento, tanto las cadenas interiores como las exteriores se estiran, adoptando un estado condensado.<sup>44</sup>



**Figura 16.** Imágenes de AFM de membranas a) CH 2:4 GE, b) CH 2:0 GE CVD, c) CH 2:4 GE CVD.



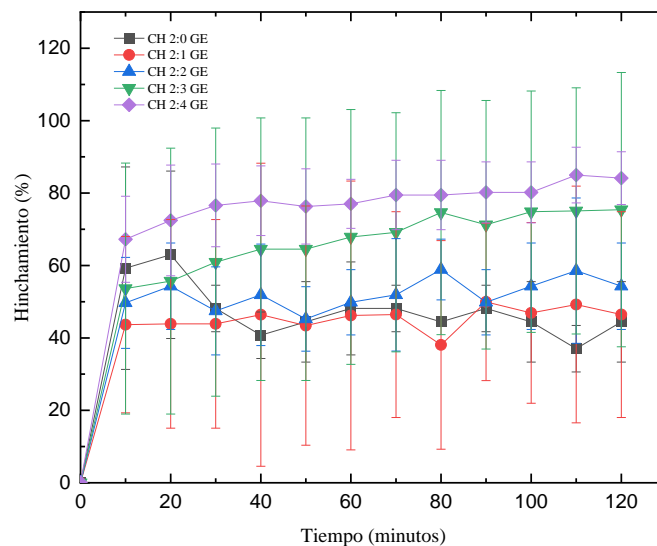
**Figura 17.** Rugosidad en la superficie de las membranas obtenidas de la región X-Y 10 x 10  $\mu\text{m}$ . S/R significa sin reticular químicamente.

Curiosamente, la topografía mejorada de las membranas reticuladas por CVD implicó tanto un incremento claro en el RMS (Figura 17) desde 35 nm (exhibido por una membrana de CH

2:4 GE no reticulada) hasta aproximadamente 45 y 60 nm (membranas CH 2:0 GE CVD y CH 2:4 GE CVD, respectivamente). Al igual que se discutirá en las próximas secciones, se cree que las crestas observadas y los grandes RMS promueven el acomodamiento temprano de proteínas de anclaje a lo largo de la superficie de la membrana a partir del cual la adhesión y proliferación celular son promovidas. Esto da evidencia de que el método de reticulación mejora la topografía de los apósitos. La topografía también se vio favorecida con la concentración de GE.

#### 4.4 Evaluación de las propiedades de hinchamiento de los apósitos

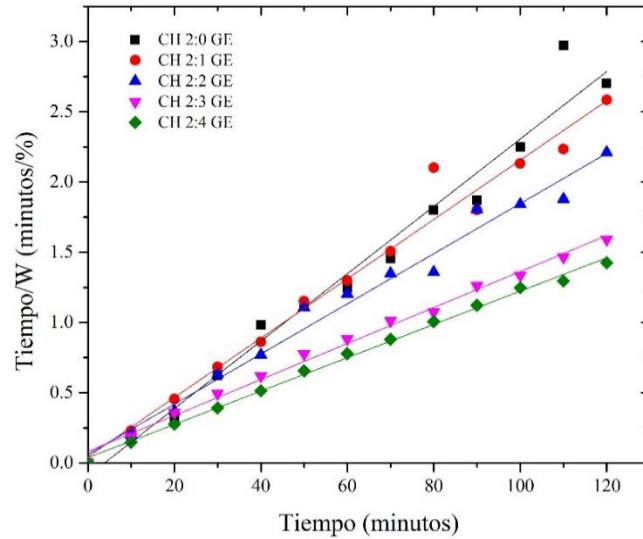
La Figura 18 muestra las curvas de hinchamiento que presentaron cada uno de los apósitos sintetizados. Los apósitos que presentaron mayores valores de hinchamiento en el equilibrio fueron CH 2:3 GE y CH 2:4 GE (adoptando valores de entre 70 y 80%). El resto de los apósitos presentaron valores inferiores de hinchamiento de entre 40 y 50%. Estos resultados demuestran que la GE mejora la afinidad por el agua exhibida por los apósitos, misma que se anticipa como favorable para la aplicación biomédica propuesta (los apósitos que presentan afinidad por agua son en general altamente citocompatibles).



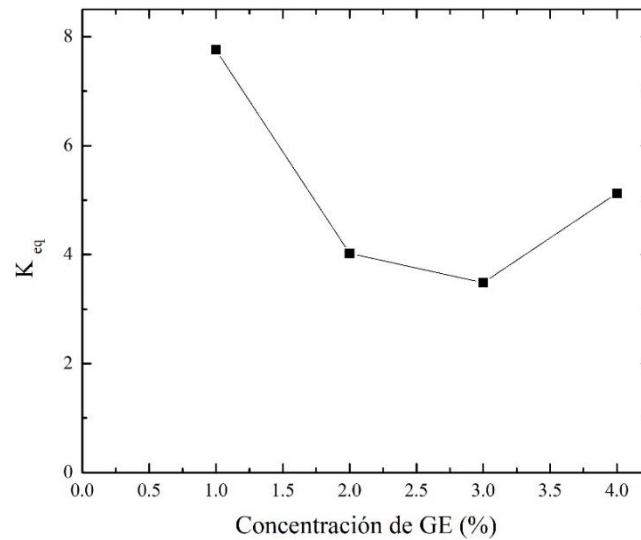
**Figura 18.** Curvas de hinchamiento de los apósitos de hidrogel

Las curvas presentadas en la Figura 18 fueron ajustadas a distintos modelos para determinar los parámetros cinéticos de hinchamiento. En la Figura 19 se muestra el ajuste a un modelo de segundo orden que relaciona el tiempo dividido por los valores determinados de hinchamiento con el tiempo. A partir del ajuste es posible calcular la constante de hinchamiento en el equilibrio

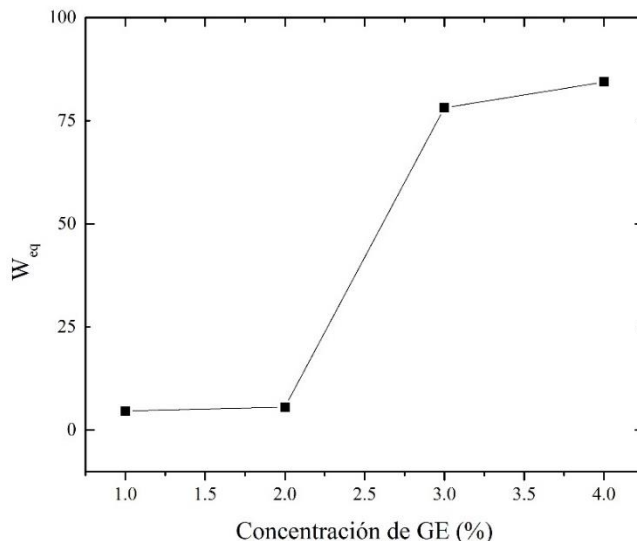
( $K_{eq}$ ) y el hinchamiento en el equilibrio ( $W_{eq}$ ). En la Figura 20 es posible observar que a medida que se incrementa la concentración de GE en el apósito, éste tarda más en hincharse (a mayores  $K_{eq}$  el material se hincha más rápido), aunque se denota también un mejoramiento en la capacidad de hinchamiento en el equilibrio (Figura 21).



**Figura 19.** Ajuste de las curvas de hinchamiento a un modelo de segundo orden



**Figura 20.** Constante de hinchamiento en el equilibrio vs concentración de gelatina en el sistema.



**Figura 21.** Grado de hinchamiento en el equilibrio vs concentración de gelatina en el sistema

#### 4.5 Evaluación de las propiedades mecánicas de los apósitos

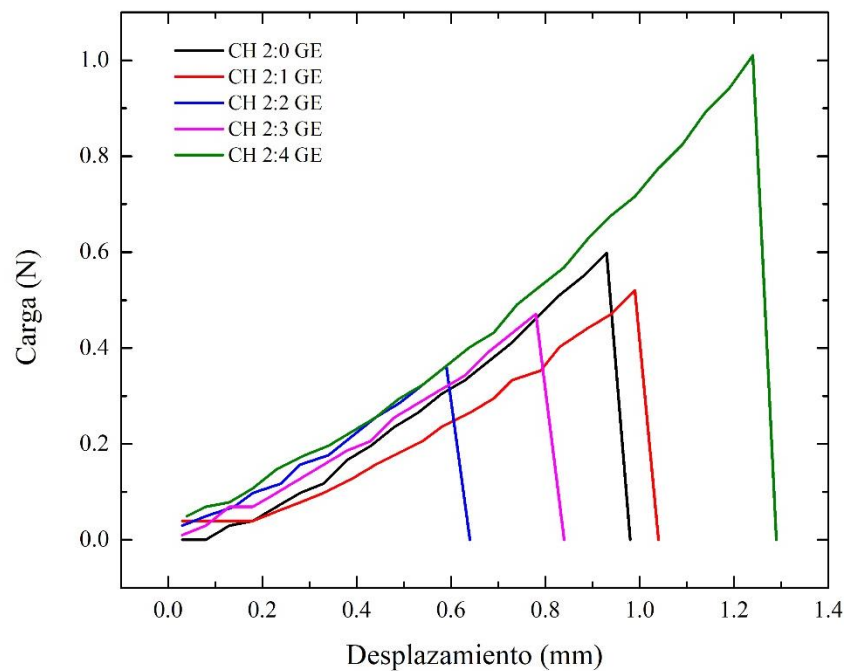
La Figura 22 presenta curvas carga-desplazamiento representativas de cada una de las formulaciones de hidrogel sintetizadas.

Mediante las Ecuaciones 3 y 4 se calcularon el módulo elástico (E) y el punto de esfuerzo en la fractura (PS) y los resultados se muestran en la Tabla 1. Se puede observar que ambos parámetros disminuyen a medida que se incrementa la concentración de GE en el apósito, es decir, que el material se vuelve más blando en su zona elástica, aunque menos resistente a la fractura una vez alcanzado la zona de deformación plástica. Aparentemente, la mayor hidratación del sistema debida a la naturaleza hidrofílica de la GE (ver resultados de hinchamiento) tiene un efecto de ablandamiento en la zona elástica; sin embargo, el mayor grado de reticulación debido a la reacción entre la GE y la GA impacta en la respuesta plástica del sistema (se reduce la resistencia a la fractura). Este comportamiento ha sido previamente observado para sistemas de polisacáridos entrecruzados con GA en solución.<sup>39</sup> Como siguiente paso en la investigación, se procedió a evaluar el efecto del grado de reticulación en las propiedades mecánicas en el sistema. Se eligió la muestra CH 2:4 GE y se varió la concentración de GA, los resultados se muestran en la Figura 23 y Tabla 2. Es posible observar que tan pronto como se incrementa la concentración de GA en la matriz polimérica, el material se vuelve más

quebradizo, resultando en el incremento de los módulos E y PS. Esto confirma el aumento en rigidez provocado por la reticulación del sistema.

**Tabla 1.** Módulo de elasticidad (E) y esfuerzo en la fractura (PS) de membranas CH 2:0 GE al CH 2:4 GE reticulados en solución con 1 %v/v GA

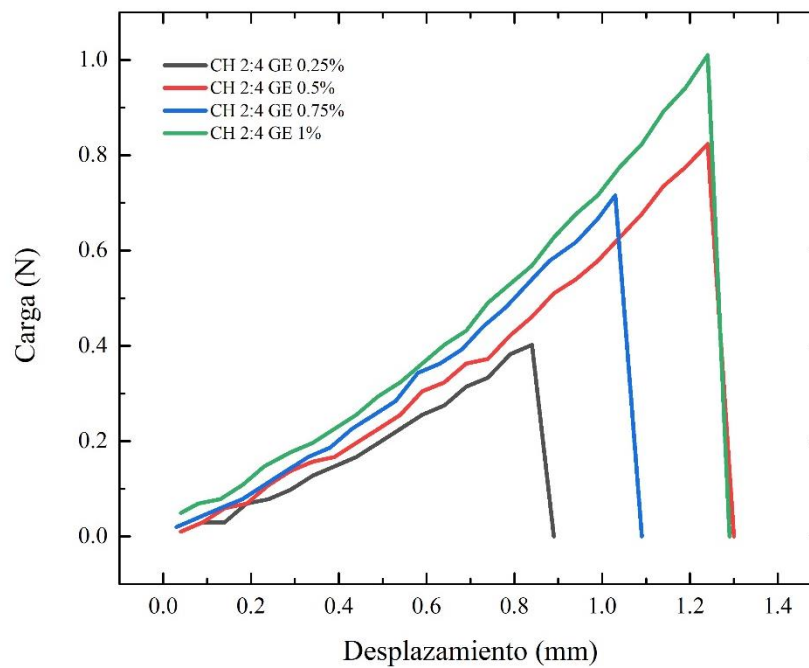
Composición	E (MPa)	PS (MPa)
CH 2:0 GE	19614.18	105.57
CH 2:1 GE	7977.60	63.70
CH 2:2 GE	3691.62	21.63
CH 2:3 GE	1251.91	14.42
CH 2:4 GE	747.33	19.97



**Figura 22.** Gráficas de carga-desplazamiento de membranas CH 2:0 GE – CH 2:4 GE reticuladas en solución con 1 %v/v de GA.

**Tabla 2.** Módulo de elasticidad (E) y esfuerzo en la fractura (PS) de membranas CH 2:4 GE reticulados a distintas concentraciones de GA (0-1 % v/v)

Composición	E (MPa)	PS (MPa)
CH 2:4 GE 0%	381.38	32.53
CH 2:4 GE 0.25%	1076.89	13.03
CH 2:4 GE 0.50%	2462.17	41.72
CH 2:4 GE 0.75%	3723.44	45.48
CH 2:4 GE 1%	3462.09	55.02

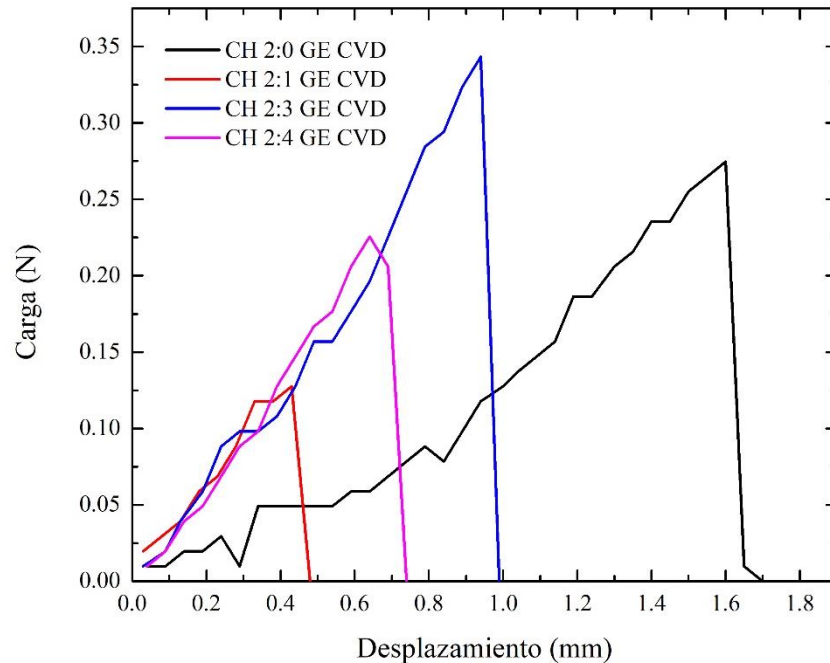


**Figura 23.** Gráfica de carga-desplazamiento de membranas CH 2:4 GE a distintas concentraciones de GA (0-1 % v/v).

**Tabla 3.** Módulo de elasticidad (E) y punto de fractura (PS) de membranas CH 2:4 GE reticulados por CVD con 0.05 %v/v GA.

Composición	E (MPa)	PS (MPa)
2:0 CVD 0.05%	489.30	12.11
2:1 CVD 0.05%	1059.56	6.10
2:3 CVD 0.05%	400.51	7.73
2:4 CVD 0.05%	249.49	3.44





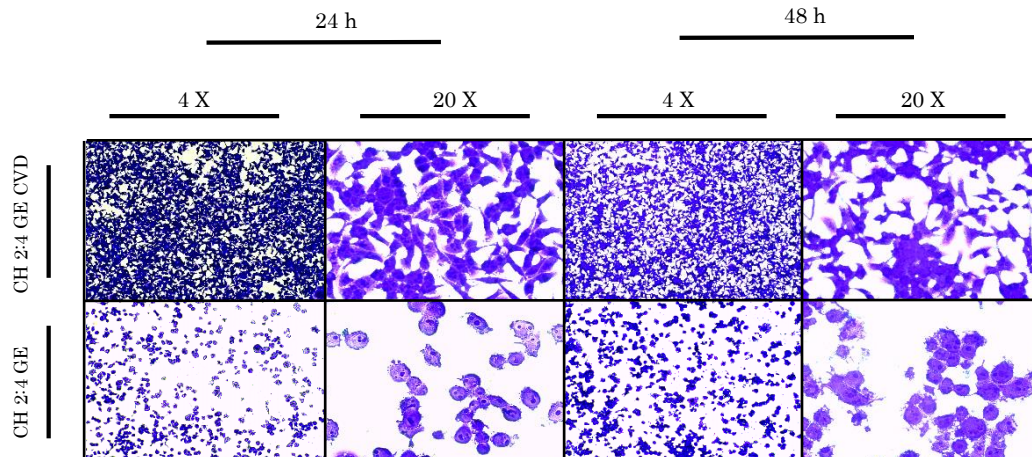
**Figura 24.** Gráfica de carga-desplazamiento de membranas CH 2:0 GE a CH 2:4 GE mediante CVD en 0.05% de GA.

Por último, se realizaron pruebas de punción en apósitos reticulados por la técnica de CVD. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 24 y Tabla 3. Se aprecia un descenso en ambos parámetros a medida que se incrementa la concentración de GE.

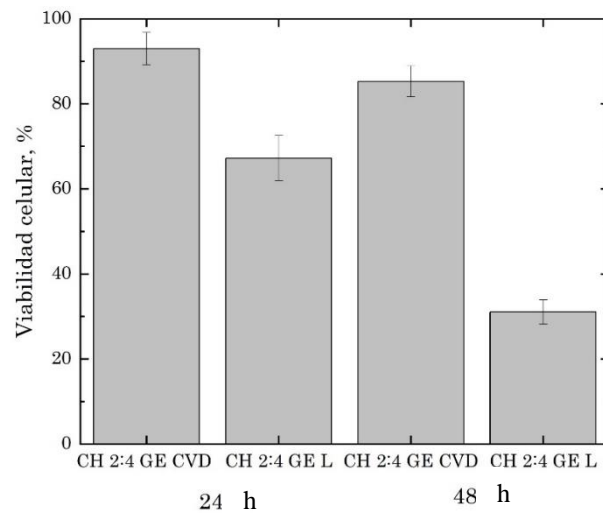
#### 4.6 Evaluación de citocompatibilidad, adhesión y proliferación celular de los apósitos

Dentro de la evaluación biológica de los materiales preparados, se llevaron a cabo ensayos de citocompatibilidad a partir de los lixiviados liberados por los apósitos después de 48 h de contacto con medio de cultivo. En la Figura 25 se muestran micrografías de células MDA-MB 231 expuestas a lixiviados de las muestras CH 2:4 GE y CH 2:4 GE CVD (las células fueron teñidas con cristal violeta). Se observa que las células expuestas a la muestra reticulada por CVD están presentes en una mucho mayor densidad a ambos tiempos de observación. Este resultado es consistente con la noción de que la reticulación por CVD es más amigable que la reticulación en solución en virtud de que menos cantidad de GA sin reaccionar es liberada al medio de cultivo (el GA sin reaccionar es reconocido como tóxico).<sup>39</sup> Lo anterior se puede corroborar con la Figura 26 en donde es posible denotar que los materiales preparados por CVD tienen una

citocompatibilidad mayor, presentando valores de 93 y 86% de viabilidad después de 24 y 48 h de incubación, respectivamente. Por otro lado, los apósitos reticulados en solución ni siquiera alcanzan el límite inferior para establecer un criterio de citocompatibilidad (70%).



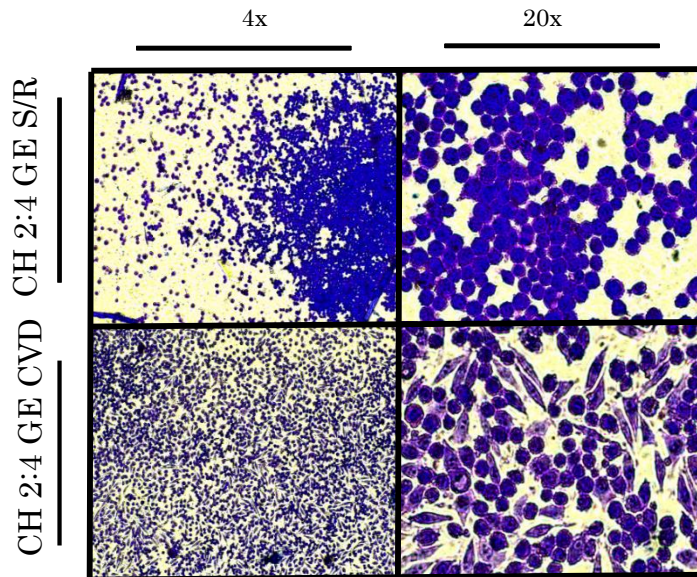
**Figura 25.** Micrografías de células MDA-MB 231 expuestas por 24 y 48 h de las muestras a) CH 2:4 GE 1% de GA en solución y CH 2:4 GE CVD.



**Figura 26.** Porcentaje de viabilidad celular de la membrana CH 2:4 GE CVD 0.05% GA a distintos tiempos de incubación

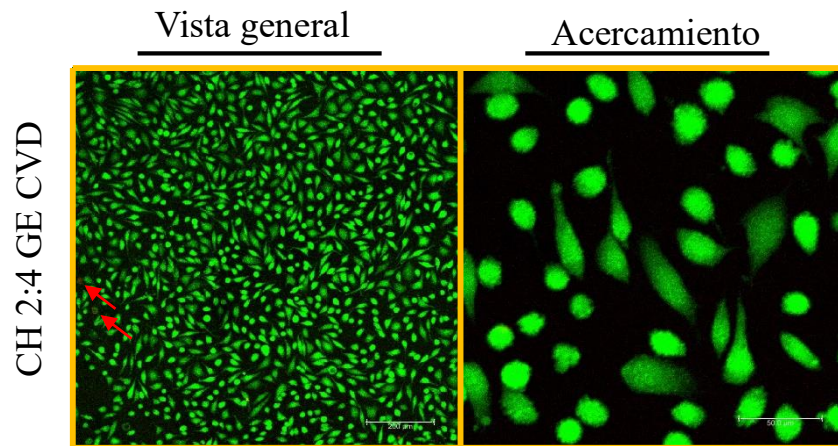
Como siguiente paso en la evaluación biológica, se procedió con el sembrado de células sobre la superficie de apósitos seleccionados. Para este experimento se emplearon apósitos de CH 2:4 GE sin reticulación química y con reticulación por CVD, los resultados se muestran en la Figura 27. En ambos sistemas se observa una población celular destacada, aunque con

morfología evidentemente distinta. Por un lado, las células sembradas sobre el sistema sin reticular químicamente (CH 2:4 GE S/R) exhiben una morfología globular, característica de estudios donde las células no se han adherido adecuadamente a su sustrato (el apósito sin reticular en nuestro caso). Por otro lado, las células sembradas sobre el sistema reticulado por CVD (CH 2:4 GE CVD) exhiben una morfología alargada, misma que es característica de la línea celular empleada (fibroblastos) y que denota su adhesión adecuada a este apósito



**Figura 27.** Adhesión y proliferación celular sobre membranas CH 2:4 GE S/R y CH 2:4 GE CVD a 24 h

Para culminar esta etapa de resultados, se llevaron a cabo un ensayo de célula viva/muerta para determinar la viabilidad celular en la superficie del material mediante la observación de células vivas teñidas con calceína-AM (en color verde) y de células muertas teñidas con yoduro de propidio (en color rojo). Para este estudio se seleccionó la muestra CH 2:4 GE CVD. En la Figura 28 es posible observar una gran población de células vivas sobre superficie del material que no solo se encuentran adheridas al mismo, sino que la gran mayoría de ellas se encuentran estiradas y en su forma celular habitual. Además, es posible denotar una población de células muertas casi imperceptible (éstas se encuentran señaladas con flechas rojas) sobre la superficie después de 24 h de incubación. Estos resultados muestran que los apósitos CH 2:4 GE CVD son materiales altamente citocompatibles.



**Figura 28.** Micrografías de fluorescencia confocal de células fibroblastos después de 24 h de sembrarlas en la superficie de la membrana CH 2:4 GE CVD. Las células vivas (teñidas con calceína AM) aparecen en verde y las células muertas (teñidas con yoduro de propidio) aparecen en rojo. Las barras de escala para la vista general y el acercamiento son de 200 y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

## V. EXPERIMENTAL

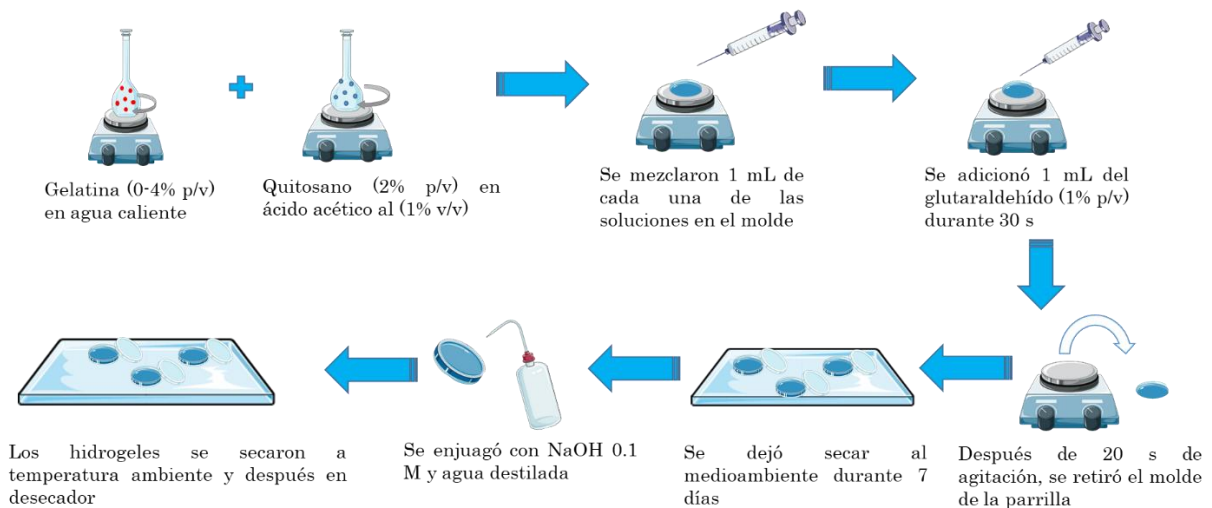
### 5.1 Síntesis de apósitos

La síntesis de los apósitos de CH y GE se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Coutinho y colaboradores con ciertas modificaciones (Figura 29).<sup>38</sup> Se prepararon soluciones poliméricas de GE (0-4 %p/v) con agua destilada, agitándose durante 30 min a 50 °C y de CH (2 %p/v) en ácido acético al 1%, agitándose durante 24 h. Asimismo se preparó una solución de GA al 1 %v/v, el cual tuvo la función de reticulante covalente. Para llevar a cabo el moldeo y reticulación del hidrogel, se utilizó un molde de plástico (el cual tiene una forma circular) el cual se colocó en una parrilla con agitación a 60 rpm y 45 °C. Una vez que se tiene comprobado la uniformidad de la agitación en el molde, con ayuda de una jeringa se vertió 1 mL de la solución de GE y 1 mL de solución de CH al mismo, dejándose agitar de manera homogénea durante 3 min y tapándose con una placa Petri para evitar la evaporación del solvente. Pasado el tiempo de agitación, se adicionó 1 mL de solución de GA gota a gota durante 30 s seguido de una agitación homogénea durante 20 s en el molde para asegurar la uniformidad del reticulante en la matriz polimérica. Pasado este lapso de tiempo el molde se retiró de la parrilla, dándole leves golpes en la superficie para garantizar la uniformidad de la solución en el molde y se verificó que no hubiera burbujas en la solución.

Los hidrogeles sintetizados se colocaron en un recipiente con tapa de aluminio perforada donde se llevó a cabo la evaporación del solvente durante 7 d. Posteriormente, los hidrogeles fueron desmoldados y neutralizados con 80 mL de NaOH 0.1 M durante 10 min seguido de un enjuague con agua destilada durante 10 min. El material neutralizado se dejó secar al medioambiente durante 2 d en el recipiente con tapa perforada y consecuentemente se colocaron en la cámara desecadora durante 2 d.

Para la preparación de apósitos de hidrogel mediante la técnica de reticulación química de vapor (CVD) se sintetizaron hidrogeles con la técnica de moldeo y evaporación de solvente antes descrita a excepción de la adición de GA. Los apósitos se reticularon con el método de Rodríguez-Velázquez y colaboradores<sup>39</sup> en donde los apósitos una vez neutralizados y secos se colocaron en un soporte de acero inoxidable dentro de una pequeña cámara hecha con las bases de cajas Petri previamente rasgadas. En dichas bases se colocaron 5 µL de solución de GA al

0.05 %v/v, para después ser selladas inmediatamente y posteriormente ser colocadas en un horno a 50 °C durante 45 min. Una vez pasado el tiempo de reticulación, los apósitos se retiraron tanto del horno como de la cámara donde los contenía, dejando que el exceso de GA se evaporara durante 24 h.



**Figura 29.** Diagrama de flujo del proceso para la preparación de hidrogeles mediante la técnica moldeo y evaporación del solvente (reticulación química en solución)

## 5.2 Caracterización química de los apósitos y materiales precursores

Los apósitos preparados y sus materiales precursores se caracterizaron químicamente mediante la técnica de FTIR-ATR en un equipo de la marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 400. Se colocaron muestras de xerogel reticulado de aproximadamente  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$  y de muestras sin reticular (polvos), para el caso de los biopolímeros precursores. Los espectros obtenidos fueron graficados y normalizados con ayuda del software gráfico ORIGIN.<sup>45,46</sup>

## 5.3 Caracterización de la topografía y rugosidad de los apósitos

La evaluación de los perfiles topográficos mediante la técnica de AFM se llevó a cabo montando muestras de xerogel en un portaobjetos que se colocó en un equipo Nanosurf Easyscan 2 en modo contacto, tomando micrografías con dimensiones de  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ .

#### 5.4 Evaluación de las propiedades de hinchamiento de los apósitos

El hinchamiento de los apósitos se caracterizó empleando muestras de xerogel de aproximadamente  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ , pesándolo antes y después de hinchar cada 10 min en un recipiente con 30 mL de agua destilada. Los datos obtenidos se graficaron y se analizaron hasta obtener una cinética de hinchamiento con una regresión lineal mayor al 0.99 con las fórmulas desarrolladas por Schoot<sup>47,48</sup> para cinéticas de hinchamiento de primer orden (Ecuación 1) y de segundo orden (Ecuación 2):

$$\ln\left(\frac{W_{eq}}{W_{eq}-W}\right) = kt \quad (1)$$

$$\frac{t}{W} = \frac{1}{K_{eq}^2} + \frac{1}{W_{eq}} t \quad (2)$$

donde  $W_{eq}$ ,  $W$ ,  $K_{eq}$ ,  $k$  y  $t$  son corresponden al hinchamiento en el equilibrio, hinchamiento en el tiempo, constante de hinchamiento en el equilibrio, constante cinética de hinchamiento y tiempo, respectivamente.

#### 5.5 Evaluación de las propiedades mecánicas de los apósitos

Los apósitos sintetizados fueron sometidos a ensayos de punción con un texturómetro de la marca Brookfield, modelo CT3-10kg. Para llevar a cabo estas pruebas, los apósitos se pusieron a hinchar en agua destilada durante 24 h. Después del hinchamiento requerido, cada uno de los hidrogeles se colocó y se ajustó en la celda de sujeción. En el software del equipo se colocaron los parámetros idóneos para llevar a cabo el ensayo de punción, en donde la sonda del equipo empieza a detectar la muestra a los 20 g-fuerza de carga hasta deformar por completo al mismo. Se empleó una sonda cilíndrica de 2 mm de diámetro que descendió a una velocidad de 0.5 mm/s. Las gráficas obtenidas del equipo se procesaron mediante el software gráfico ORIGIN. Se emplearon las Ecuaciones 3 y 4 para obtener el módulo de elasticidad ( $E$ ) y el esfuerzo en el punto de fractura ( $PS$ ) de cada uno de los apósitos:

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

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

donde  $m$ ,  $w$ ,  $L$ ,  $h$ ,  $F_B$  representan la pendiente en la zona elástica de la gráfica de punción, la anchura, el largo, el grosor y la carga en el punto de fractura, respectivamente.

### 5.6 Evaluación de la citocompatibilidad, adhesión y proliferación celular de los apósitos

Los apósitos fueron evaluados en función de su viabilidad celular mediante ensayos de lixiviados, de acuerdo a la norma ISO:10993. Se colocaron 20 mg de xerogel en contacto con 2 mL de medio de cultivo en agitación vaivén a 70 rpm durante 48 h a 37 °C. Posteriormente se colocaron 100 µL de lixiviados en cada pocillo, donde previamente se colocó una población de 15,000 células/pocillo de la línea celular MDA-MB-231. Se hicieron dos placas, una de ellas se incubó a 24 h y otra a 48 h, ambas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire. Seguido de esto, las células fueron observadas bajo el microscopio para después ser fijadas con 10 µL de una solución de GA al 11 % v/v, dejándose agitar durante 15 min y realizando dos lavados con agua mili-Q estéril.

Una vez fijadas, se procedió a la tinción de las células con 100 µL de una solución de cristal violeta 0.1%. Esta solución se preparó diluyendo 0.1 g de cristal violeta en 100 mL de tampón compuesto por: ácido fosfórico 200 mM, ácido fórmico 200 mM, y ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico 200 mM a pH=6. Se mantuvo la placa con agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se retiró el colorante, se lavó 3-4 veces con agua mili-Q estéril y se procedió a su secado. Posteriormente se añadieron 100 µL de ácido acético al 10% y se mantuvo bajo agitación durante 15 min, a temperatura ambiente, para que la coloración fuese homogénea en cada uno de los pocillos. Por último, se realizó una lectura de absorbancia de las placas a una longitud de onda de 595 nm y se obtuvieron los porcentajes de viabilidad celular con la Ecuación 5:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{células}} * 100 \quad (5)$$

donde  $Abs_{muestra}$  y  $Abs_{células}$  son las absorbancias en los pocillos de la muestra y las células, respectivamente.

Para las pruebas de adhesión y proliferación celular, las membranas se esterilizaron en etanol 70% por 10 min. Las membranas se sacaron y se colocaron en una placa de 12 pocillos. Sobre



cada una de las muestras se colocó un anillo para mantenerlas estables, que fue previamente esterilizado. Cada una de los pocillos se lavaron con 1.5 mL de PBS estéril por 5 min para eliminar cualquier residuo y se retiró del pocillo. Se realizó un segundo lavado con 1.5 mL de PBS estéril y se colocó en el incubador a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire. Se retiró el PBS y la membrana se le colocó a hidratar en 800 µL de medio de cultivo y se desechó. Se sembraron 50,000 células por cm<sup>2</sup>, se dejaron en condiciones de reposo en el interior de la cabina de flujo laminar para que se empezaran a adherir y se metieron al incubador por 15 min. Después se le adicionó 1 mL de nuevo medio de cultivo y se incubó por 24 h. Posterior a las 24 h se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con 300 µL de GA al 11% durante 15 min. Se retiró el GA después de dicho tiempo y se hicieron lavados con agua mili-Q de 1.5 mL en cada muestra. Las células se tiñeron con 500 µL de cristal violeta para su evaluación.

Por último, el ensayo de células viva/célula muerta fue llevado a cabo incubando una población celular de 50,000 células por cm<sup>2</sup> de la línea celular de fibroblastos de ratón L-929 sobre una superficie de hidrogel previamente hinchado de aproximadamente 2.25 cm<sup>2</sup> en un pocillo durante 24 h a 37 °C con una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub>/95 % aire. Se quitó el medio de cultivo del pocillo en donde posteriormente se añadió 30 µL de una solución 98:1:1 de PBS/calceína-AM/yoduro de propidio sobre la superficie del hidrogel. Se hicieron cortes circulares de algunas zonas del hidrogel los cuales se colocaron en una caja de Petri (con cierta concavidad en la parte central de la superficie de la misma) vertiendo primero 2 µL de PBS sobre la zona cóncava, colocando el corte en la parte central y vertiendo otros 2 µL PBS para evitar la rápida deshidratación del material. Seguido de esto e inmediatamente después se pasó a leerlo bajo el microscopio de fluorescencia confocal LEICA modelo TCS-SP8 con los canales verde para calceína-MA (emisión: 488 nm y absorción: 495-595 nm) y rojo para yoduro de propidio (emisión: 552 nm y absorción: 590-700 nm) con objetivo de 10x con magnificaciones ópticas desde los 0.75 hasta los 5x, obteniendo las respectivas micrografías a distintos aumentos.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y optimizó una técnica de síntesis de apósitos de CH y GE (membranas) basadas en los procedimientos de moldeo y evaporación de solvente. La técnica demostró ser reproducible en virtud de que las membranas exhibieron una tonalidad y espesor uniformes después de su desmolde.
2. La caracterización química y organoléptica aportó evidencia de la formación de bases de Schiff después de la reticulación química de los apósitos con GA, resultantes de la reacción entre los grupos aldehídos y amina provenientes del agente reticulante y de los biopolímeros, respectivamente.
3. Los resultados de AFM demostraron que la reticulación por CVD mejoró la topografía y rugosidad de los apósitos. Es bien sabido que estos rasgos superficiales favorecen el acomodamiento y la consecuente adhesión y proliferación celular.
4. Los resultados de los experimentos de hinchamiento demostraron que la presencia de GE en los apósitos mejoró su afinidad por el agua (sistemas reticulados en solución).
5. Para los apósitos reticulados en solución, los ensayos mecánicos demostraron un decremento en el módulo elástico con las concentraciones de GE y un aumento en la misma propiedad con la concentración de agente reticulante.
6. Los ensayos biológicos demostraron que los apósitos reticulados por CVD son más citocompatibles y favorecen en mayor medida a la adhesión y proliferación celular en comparación con los reticulados en solución.
7. Debido a su muy favorable respuesta, se destaca a los apósitos reticulados por CVD como muy atractivos para posibles aplicaciones biomédicas.

---

**VII. REFERENCIAS**

- (1) Sorg, H.; Tilkorn, D. J.; Hager, S.; Hauser, J.; Mirastschijski, U. *Eur. Surg. Res.* **2017**, *58*, 81–94.
- (2) Enoch, S.; Leaper, D. J. Basic Science of Wound Healing. *Surg.* **2005**, *23*, 37–42.
- (3) Gonzalez, A. C. D. O.; Andrade, Z. D. A.; Costa, T. F.; Medrado, A. R. A. P. Wound Healing - A Literature Review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91*, 614–620.
- (4) Kirsner, R. S.; Eaglstein, W. H. The Normal Wound Healing Process. *Dermatologic Clinics*. 1993, pp 629–640.
- (5) Murphy, P. S.; Evans, G. R. D. *Plast. Surg. Int.* **2012**, *2012*, 1–8.
- (6) Rutter, L. *Br. J. Community Nurs.* **2017**, *22*, S36–S40.
- (7) Miguel, S. P.; Moreira, A. F.; Correia, I. J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *127*, 460–475.
- (8) Francesko, A.; Tzanov, T. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2011**, *125*, 1–27.
- (9) Deng, C. M.; He, L. Z.; Zhao, M.; Yang, D.; Liu, Y. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *69*, 583–589.
- (10) Ishihara, M.; Nakanishi, K.; Ono, K.; Sato, M.; Kikuchi, M.; Saito, Y.; Yura, H.; Matsui, T.; Hattori, H.; Uenoyama, M.; Kurita, A. *P Biomaterials* **2002**, *23*, 833–840.
- (11) Jayakumar, R.; Menon, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomedical *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 227–232.
- (12) Queen, D.; Orsted, H.; Sanada, H.; Sussman, G. A Dressing History. *Int. Wound J.* **2004**, *1*, 59–77.
- (13) Rodriguez-Velazquez, E.; Alatorre-Meda, M.; F. Mano, J. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 4837–4850.
- (14) Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5872–5878.

- 
- (15) George, M.; Abraham, T. E. *J. Control. Release* **2006**, *114*, 1–14.
- (16) Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6017–6084.
- (17) Tros de Ilarduya, C.; Sun, Y.; Düzgüneş, N. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 159–170.
- (18) Alves, N. M.; Mano, J. F. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 401–414.
- (19) Garcia, M. A.; Pinotti, A.; Zaritzky, N. E. *Starch/Staerke* **2006**, *58*, 453–463.
- (20) Petros, S.; Tesfaye, T.; Ayele, M. A Review on Gelatin Based Hydrogels for Medical Textile Applications. **2020**, *2020*.
- (21) Alihosseini, F. *10 - Plant-Based Compounds for Antimicrobial Textiles*; Elsevier Ltd, 2016.
- (22) Nuge, T. Gelatin Based Scaffolds For Tissue Engineering – A Review.
- (23) Liu, D.; Nikoo, M.; Zhou, P.; Regenstein, J. M. Collagen and Gelatin. 527–559.
- (24) Djagny, K. B.; Wang, Z.; Xu, S.; Djagny, K. B.; Wang, Z.; Xu, S. Gelatin : A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries, **2017**, 8398.
- (25) Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, U. of A.
- (26) Badawy, M. E. I.; Taktak, N. E. M.; Awad, O. M.; Elfiki, S. A.; El-Ela, N. E. A. *J. Macromol. Sci. Part B Phys.* **2017**, *56*, 359–372.
- (27) Young, S.; Wong, M.; Tabata, Y.; Mikos, A. G. *J. Control. Release* **2005**, *109*, 256–274.
- (28) Guo, S.; DiPietro, L. A. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 219–229.
- (29) Hamed, H.; Moradi, S.; Hudson, S. M.; Tonelli, A. E. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *199*, 445–460.
- (30) Rusanu, A.; Tamaş, A. I.; Vulpe, R.; Rusu, A.; Butnaru, M.; Vereştiuc, L. *J. Nanosci.*

- Nanotechnol.* **2017**, *17*, 4584–4591.
- (31) Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. *Int. J. Pharm.* **1983**, *15*, 25–35.
- (32) Cafaggi, S.; Russo, E.; Stefani, R.; Leardi, R.; Caviglioli, G.; Parodi, B.; Bignardi, G.; De Toter, D.; Aiello, C.; Viale, M. *J. Control. Release* **2007**, *121*, 110–123.
- (33) da Silva, R. M. P.; Caridade, S. G.; San Román, J.; Mano, J. F.; Reis, R. L. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2132–2138.
- (34) Rhazi, M.; Desbrières, J.; Tolaimate, A.; Rinaudo, M.; Vottero, P.; Alagui, A.; El Meray, M. *Eur. Polym. J.* **2002**, *38*, 1523–1530.
- (35) Beppu, M. M.; Vieira, R. S.; Aimoli, C. G.; Santana, C. C. *J. Memb. Sci.* **2007**, *301*, 126–130.
- (36) Balakrishnan, B.; Mohanty, M.; Umashankar, P. R.; Jayakrishnan, A. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6335–6342.
- (37) Tantiwatcharothai, S.; Prachayawarakorn, J. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *227*, 115360.
- (38) Coutinho, D. F.; Sant, S. V.; Shin, H.; Oliveira, J. T.; Gomes, M. E.; Neves, N. M.; Khademhosseini, A.; Reis, R. L. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7494–7502.
- (39) Rodríguez-Velázquez, E.; Silva, M.; Taboada, P.; Mano, J. F.; Suárez-Quintanilla, D.; Alatorre-Meda, M. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 291–301.
- (40) Arulmurugan, S.; Kavitha, H. P.; Venkatraman, B. R. *Rasayan J. Chem.* **2010**, *3*, 385–410.
- (41) Chiou, B. Sen; Avena-Bustillos, R. J.; Shey, J.; Yee, E.; Bechtel, P. J.; Imam, S. H.; Glenn, G. M.; Orts, W. J. *Polymer (Guildf)*. **2006**, *47*, 6379–6386.
- (42) Farris, S.; Song, J.; Huang, Q. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 998–1003.
- (43) Juárez, J.; Goy-López, S.; Cambón, A.; Valdez, M. A.; Taboada, P.; Mosquera, V. J. *Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 15703–15712.

- (44) O'Connor, S. M.; Gehrke, S. H.; Retzinger, G. S. *Langmuir* **1999**, *15*, 2580–2585.
- (45) Guajira, L. Recibido: Diciembre de 2020 Aceptado. **2021**, No. 1, 5–16.
- (46) Okhamafe, A. O.; Rogers, R. D. **2012**, 425–433.
- (47) Schott, H. Schott1992.Pdf. **2006**, No. May 2013, 37–41.
- (48) Velada, J. L.; Novoa, R.; Mendizabal, E. *Hydrogels 1*. **1996**, *40*, 281–286.

## ANEXOS

Anexo 1. Tablas del análisis estadístico ANOVA de una vía.

- Pendiente en la región elástica

Bonferroni Test								
	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
2:1 2:0	1.17004	9.26789	0.12625	1	0.05	0	-43.06879	45.40887
2:2 2:0	13.25004	9.26789	1.42967	1	0.05	0	-30.98879	57.48887
2:2 2:1	12.08	9.26789	1.30343	1	0.05	0	-32.15883	56.31883
2:3 2:0	-6.16666	9.26789	-0.66538	1	0.05	0	-50.40549	38.07217
2:3 2:1	-7.3367	9.26789	-0.79163	1	0.05	0	-51.57553	36.90213
2:3 2:2	-19.4167	9.26789	-2.09505	0.90319	0.05	0	-63.65553	24.82213
2:4 2:0	-4.75076	9.26789	-0.5126	1	0.05	0	-48.98959	39.48807
2:4 2:1	-5.9208	9.26789	-0.63885	1	0.05	0	-50.15963	38.31803
2:4 2:2	-18.0008	9.26789	-1.94228	1	0.05	0	-62.23963	26.23803
2:4 2:3	1.4159	9.26789	0.15277	1	0.05	0	-42.82293	45.65473
Tukey Test								
	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
2:1 2:0	1.17004	9.26789	0.17854	0.99992	0.05	0	-36.00815	38.34823
2:2 2:0	13.25004	9.26789	2.02186	0.63791	0.05	0	-23.92815	50.42823
2:2 2:1	12.08	9.26789	1.84332	0.70182	0.05	0	-25.09819	49.25819
2:3 2:0	-6.16666	9.26789	0.94099	0.95601	0.05	0	-43.34485	31.01153
2:3 2:1	-7.3367	9.26789	1.11953	0.92264	0.05	0	-44.51489	29.84149
2:3 2:2	-19.4167	9.26789	2.96285	0.34552	0.05	0	-56.59489	17.76149
2:4 2:0	-4.75076	9.26789	0.72493	0.98227	0.05	0	-41.92895	32.42743
2:4 2:1	-5.9208	9.26789	0.90347	0.96166	0.05	0	-43.09899	31.25739
2:4 2:2	-18.0008	9.26789	2.74679	0.40227	0.05	0	-55.17899	19.17739
2:4 2:3	1.4159	9.26789	0.21606	0.99983	0.05	0	-35.76229	38.59409

## - Fuerza en la fractura

Bonferroni Test								
	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
2:1 2:0	0.551	10.03718	0.0549	1	0.05	0	-47.35993	48.46193
2:2 2:0	9.2649	10.03718	0.92306	1	0.05	0	-38.64603	57.17583
2:2 2:1	8.7139	10.03718	0.86816	1	0.05	0	-39.19703	56.62483
2:3 2:0	-6.7928	10.03718	-0.67676	1	0.05	0	-54.70373	41.11813
2:3 2:1	-7.3438	10.03718	-0.73166	1	0.05	0	-55.25473	40.56713
2:3 2:2	-16.0577	10.03718	-1.59982	1	0.05	0	-63.96863	31.85323
2:4 2:0	-6.8074	10.03718	-0.67822	1	0.05	0	-54.71833	41.10353
2:4 2:1	-7.3584	10.03718	-0.73311	1	0.05	0	-55.26933	40.55253
2:4 2:2	-16.0723	10.03718	-1.60128	1	0.05	0	-63.98323	31.83863
2:4 2:3	-0.0146	10.03718	-0.00145	1	0.05	0	-47.92553	47.89633
Tukey Test								
	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
2:1 2:0	0.551	10.03718	0.07763	1	0.05	0	-39.71321	40.81521
2:2 2:0	9.2649	10.03718	1.3054	0.877	0.05	0	-30.99931	49.52911
2:2 2:1	8.7139	10.03718	1.22777	0.89732	0.05	0	-31.55031	48.97811
2:3 2:0	-6.7928	10.03718	0.95709	0.95344	0.05	0	-47.05701	33.47141
2:3 2:1	-7.3438	10.03718	1.03472	0.93982	0.05	0	-47.60801	32.92041
2:3 2:2	-16.0577	10.03718	2.26249	0.55353	0.05	0	-56.32191	24.20651
2:4 2:0	-6.8074	10.03718	0.95915	0.95311	0.05	0	-47.07161	33.45681
2:4 2:1	-7.3584	10.03718	1.03678	0.93943	0.05	0	-47.62261	32.90581
2:4 2:2	-16.0723	10.03718	2.26455	0.55282	0.05	0	-56.33651	24.19191
2:4 2:3	-0.0146	10.03718	0.00206	1	0.05	0	-40.27881	40.24961



## - Área bajo la curva

Bonferroni Test									
	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	
2:1 2:0	0.45935	3.9464	0.1164	1	0.05	0	-18.37819	19.29689	
2:2 2:0	3.43265	3.9464	0.86982	1	0.05	0	-15.40489	22.27019	
2:2 2:1	2.9733	3.9464	0.75342	1	0.05	0	-15.86424	21.81084	
2:3 2:0	-2.5176	3.9464	-0.63795	1	0.05	0	-21.35514	16.31994	
2:3 2:1	-2.97695	3.9464	-0.75435	1	0.05	0	-21.81449	15.86059	
2:3 2:2	-5.95025	3.9464	-1.50777	1	0.05	0	-24.78779	12.88729	
2:4 2:0	-2.50107	3.9464	-0.63376	1	0.05	0	-21.33861	16.33647	
2:4 2:1	-2.96042	3.9464	-0.75016	1	0.05	0	-21.79796	15.87712	
2:4 2:2	-5.93372	3.9464	-1.50358	1	0.05	0	-24.77126	12.90382	
2:4 2:3	0.01653	3.9464	0.00419	1	0.05	0	-18.82101	18.85407	
Tukey Test									
	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL	
2:1 2:0	0.45935	3.9464	0.16461	0.99994	0.05	0	-15.37166	16.29036	
2:2 2:0	3.43265	3.9464	1.23011	0.89674	0.05	0	-12.39836	19.26366	
2:2 2:1	2.9733	3.9464	1.0655	0.93386	0.05	0	-12.85771	18.80431	
2:3 2:0	-2.5176	3.9464	0.9022	0.96184	0.05	0	-18.34861	13.31341	
2:3 2:1	-2.97695	3.9464	1.06681	0.9336	0.05	0	-18.80796	12.85406	
2:3 2:2	-5.95025	3.9464	2.1323	0.59871	0.05	0	-21.78126	9.88076	
2:4 2:0	-2.50107	3.9464	0.89627	0.96269	0.05	0	-18.33208	13.32994	
2:4 2:1	-2.96042	3.9464	1.06088	0.93478	0.05	0	-18.79143	12.87059	
2:4 2:2	-5.93372	3.9464	2.12638	0.6008	0.05	0	-21.76473	9.89729	
2:4 2:3	0.01653	3.9464	0.00592	1	0.05	0	-15.81448	15.84754	