

SEP

SES

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



**Instituto Tecnológico de Tijuana
Centro de Graduados e Investigación en Química**

TRABAJO DE TESIS

**“SISTEMAS NANOCOMPUESTOS DE POLISACÁRIDO/NANOPARTÍCULAS DE
PLATA: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA, MECÁNICA Y BIOLÓGICA”**

Presentado por:

Michelle Beatriz Arizpe Castrejón

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN QUÍMICA

Director de tesis:

Dr. Manuel Alatorre Meda

Codirectora de tesis:

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

Tijuana, B. C.

Marzo 2023

EDUCACIÓN



Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 13/febrero/2023

Oficio No. 58/CG/2023

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 "Sistemas nanocompuestos de polisacárido/nanopartículas de plata: síntesis y caracterización química, mecánica y biológica", presentado por la C. Michelle Beatriz Arizpe Castrejon, (con número de control M21210001), 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

Sergio Pérez Sicairos
DR. SERGIO PÉREZ SICAİROS
Secretario del Jurado

Eustolia Rodríguez Velázquez
DRA. EUSTOLIA RODRÍGUEZ VELÁZQUEZ
Vocal del Jurado

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





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 24/Febrero/2023

OFICIO No. 015/DEPI/2023

Asunto: **Autorización de Impresión de Tesis**

MARÍA MAGDALENA SERRANO ORTEGA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

En lo referente al trabajo de tesis, "Sistemas nanocompuestos de polisacárido/nanopartículas de plata: síntesis y caracterización química, mecánica y biológica". Presentado por C. **Michelle Beatriz Arizpe Castrejón**, alumna de la Maestría en Ciencias en Química con número de control M21210001; 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
Por una Juventud Integrada al Desarrollo de México



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

ccp. Archivo
GHE/lap



Calzada del Tecnológico S/N esquina Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
dir_tijuana@tecnm.mx | technm.mx | tijuana.tecnm.mx



2023
Francisco
VILLA
100 años
EL REVOLUCIONARIO DEL PUEBLO



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana Baja California, **22/febrero/2023**

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tijuana, B.C. del 22 de febrero de 2023, MICHELLE BEATRIZ ARIZPE CASTREJÓN, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Química con número de control M21210001, 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 titulado "*Sistemas nanocompuestos de polisacáridos/nanopartículas de plata: síntesis, caracterización química, mecánica y biológica*" 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.

MICHELLE BEATRIZ ARIZPE CASTREJÓN



Calzada del Tecnológico S/N esquina Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
dir_tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | tijuana.tecnm.mx



CONTENIDO

HOJA DE APROBACIÓN.....ii

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS.....iii

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....iv

CONTENIDO.....iv

LISTA DE ABREVIATURASix

LISTA DE FIGURAS.....xi

LISTA DE TABLASxiv

LISTA DE ANEXOS.....xv

AGRADECIMIENTOS.....xvi

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES.....xvii

VITA.....xix

RESUMENxxii

ABSTRACT.....xxv

I. INTRODUCCIÓN 1

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS 4

2.1. Planteamiento del proyecto 4

2.2. Objetivo general 4

2.3. Objetivos particulares 4

III. JUSTIFICACIÓN.....	6
IV. ANTECEDENTES.....	7
4.1. Nanopartículas de plata.....	7
4.2. Nanomedicina.....	8
4.3. Medicina regenerativa	8
4.4. Polisacáridos.....	11
4.4.1. κ -Carragenina.....	13
4.4.2. Quitosano.....	13
4.5. Aplicaciones de sistemas nanocompuestos polisacáridos y NPs Ag.....	14
4.6. Hipótesis	18
V. METODOLOGÍA.....	19
5.1. Técnicas analíticas	19
5.2. Reactivos y disolventes	20
5.3. Síntesis de NPs Ag-polisacárido	21
5.4. Caracterización de NPs Ag-polisacárido	21
5.5. Ensayo preliminar de inhibición bacteriana de NPs Ag-polisacárido	21
5.6. Preparación de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	24
5.7. Evaluación mecánica de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	24
5.8. Pruebas de hinchamiento de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	25

5.9. Pruebas de degradación enzimática de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	25
5.10. Pruebas de citocompatibilidad de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	25
VI. RESULTADOS	28
6.1. Síntesis de NPs Ag-polisacárido	28
6.2. Caracterización de NPs Ag-polisacárido	30
6.2.1. Espectroscopia de UV-Vis	30
6.2.2. Pot ζ	32
6.2.3. AFM	32
6.2.4. FE-SEM	33
6.2.5. Ensayos preliminares de inhibición bacteriana.....	36
6.3. Preparación de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	39
6.4. Caracterización de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	40
6.4.1. FT-IR.....	40
6.4.2. AFM	43
6.5. Evaluación mecánica de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	44
6.6. Pruebas de hinchamiento de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	50
6.7. Pruebas de degradación enzimática	55
6.8. Pruebas de citocompatibilidad de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido	56

6.9. Pruebas de biocompatibilidad de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido en modelos animales.....	58
VII. CONCLUSIONES	60
VIII. REFERENCIAS	61
IX. Anexos	68

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AAc	Ácido acético
AFM	Microscopía de fuerza atómica (por sus siglas en inglés)
AgNO₃	Nitrato de plata
CH	Quitosano
FE-SEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (por sus siglas en inglés)
κCA	κ-Carragenina
KCl	Cloruro de potasio
M1	Membrana κCA/NPs Ag-κCA a proporción 3:1
M2	Membrana κCA/NPs Ag-κCA a proporción 1:1
M3	Membrana κCA/NPs Ag-κCA a proporción 1:3
M4	Membrana CH/NPs Ag-CH a proporción 3:1
M5	Membrana CH/NPs Ag-CH a proporción 1:1
M6	Membrana CH/NPs Ag-CH a proporción 1:3
NaOH	Hidróxido de sodio
NPs	Nanopartículas
NPs Ag	Nanopartículas de plata

NPs Ag-polisacárido	Nanopartículas de plata estabilizadas con polisacáridos
Pot ζ	Potencial zeta
UV-Vis	Ultravioleta visible
TPP	Tripolifosfato de sodio
DMEM	Medio de Cultivo Celular Eagle Modificado de Dulbecco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de materiales nanoestructurados con aplicación en el tratamiento regenerativo de tejidos específicos. Reproducida de Dvir <i>et al.</i> ²⁶	9
Figura 2. Número de queratinocitos y fibroblastos en el área de crecimiento en el transcurso de siete días. Reproducida de Wong <i>et al.</i> ²⁷	10
Figura 3. Tinción de miofibroblastos utilizando α -SMA después de cultivar fibroblastos 3T3 con NPs Ag y SSD durante 48 h (morfología estrellada con prolongaciones: α -SMA, morfología esférica: núcleos de fibroblastos; barras de escala: 40 mm) y tinción α -SMA de heridas control y tratadas en el día 7. Reproducida de Wong <i>et al.</i> ²⁷	11
Figura 4. Estructuras químicas de κ CA y CH.....	12
Figura 5. Isotermas (a) y ajuste de cinética de hinchamiento de hidrogeles de κ CA-NPs Ag (b). Reproducida de Kanis <i>et al.</i> ³²	15
Figura 6. Perfiles de liberación acumulativa de iones Ag^+ a partir de hidrogeles κ CA-NPs Ag. Reproducida de Kanis <i>et al.</i> ³²	16
Figura 7. (a) Curvas del estudio mecánico de compresión, (b) fotografías de los hidrogeles sin reforzar (izquierda) y reforzados con NPs Ag (derecha), después de los ensayos mecánicos, y (c) fotografía representativa de un individuo de 50 kg parado sobre uno de los hidrogeles reforzados con NPs Ag. Reproducida de Fan <i>et al.</i> ³⁴	17

Figura 8. Ensayos de inhibición bacteriana por proliferación en gel y en caldo. Reproducida de Fan <i>et al.</i> ³⁴	17
Figura 9. Soluciones de NPs Ag-polisacárido en orden creciente de concentración de precursor metálico (AgNO ₃): 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mM (de izquierda a derecha).....	28
Figura 10. Propuesta del mecanismo de reducción de iones Ag ⁺ y de formación de NPs Ag-polisacárido.	29
Figura 11. Espectros de absorción de UV-Vis de (a) NPs Ag-κCA y (b) NPs Ag-CH con concentraciones crecientes de precursor metálico (AgNO ₃).	31
Figura 12. Valores de Pot ζ de las NPs Ag-polisacárido.....	32
Figura 13. Micrografías AFM de a) NPs Ag-κCA y b) NPs Ag-CH.....	33
Figura 14. Micrografías FE-SEM de (a) NPs Ag-κCA y (c) NPs Ag-CH. (b) y (d) Mapa de distribución de Ag por EDX correspondiente a cada sistema.....	34
Figura 15. Histogramas de tamaños de (a) NPs Ag-κCA y (b) NPs Ag-CH.....	35
Figura 16. Ensayos de inhibición en caldo a diferentes concentraciones de NPs Ag-CH.....	37
Figura 17. Porcentajes de inhibición bacteriana de AAC y NPs Ag-CH con diferentes concentraciones, t= 24 h.	38
Figura 18. Membranas de κCA/NPs Ag-κCA (M1-M3) y CH/NPs Ag-CH (M4-M6). .	39
Figura 19. Espectro FT-IR de (a) κCA nativo y de las membranas (b) M1, (c) M2 y (d) M3.....	41

Figura 20. Espectro FT-IR de (e) CH nativo y de las membranas (f) M4, (g) M5 y (h) M6.....	42
Figura 21. (a) y (c) Micrografías AFM de membranas M3 y M6, con sus respectivos perfiles topográficos(b) y (d).	43
Figura 22. Curvas de carga vs distancia correspondientes a ensayos de punción de membranas (a) κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3) y (b) CH/NPs Ag-CH (M4-M6).	45
Figura 23. Curvas de tensión vs deformación correspondientes a ensayos de tensión de membranas (a) κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3) y (b) CH/NPs Ag-CH (M4-M6)..	47
Figura 24. (a) Isotherma de hinchamiento y (b) cinética de hinchamiento de membranas de κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3).	50
Figura 25. (a) Isotherma de hinchamiento y (b) cinética de hinchamiento de membranas de CH/NPs Ag-CH (M4-M6).	52
Figura 26. Gráficas de degradación enzimática con lisozima de membranas (a) M3 y (b) M6 a 1, 5, 10 y 15 días.....	55
Figura 27. Viabilidad celular de membranas de κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3).	56
Figura 28. Viabilidad celular de membranas de CH/NPs Ag-CH (M4-M6).	57
Figura 29. Micrografías ópticas de células fijadas y teñidas 24 h después de estar en presencia de los lixiviados de membrana (a) M3 y (b) M6.	58
Figura 30. Imágenes de modelo animales de: (a) control sin implante, (b) implante de membrana M3 y (c) implante de membrana M6.	59

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Reactivos y solventes comerciales utilizados en la parte experimental.20
- Tabla 2.** Grupos de sistemas utilizados en experimentos de inhibición bacteriana...22
- Tabla 3.** Proporción de polisacárido/NPs Ag-polisacárido en las membranas. 40
- Tabla 4.** Propiedades de punción de las membranas obtenidas (M1-M6): módulo elástico (E) y fuerza de punción en la fractura (PS). En rojo se resaltan los sistemas que obtuvieron los valores más altos de E y PS, correspondientes a las membranas con mayor proporción de NPs Ag-polisacárido (M3 y M6). 46
- Tabla 5.** Propiedades de tensión de las membranas obtenidas (M1-M6): módulo elástico (E) y fuerza de tensión en la fractura (s_F). En rojo se resaltan los sistemas que obtuvieron los valores más altos de E y PS, correspondientes a las membranas con mayor proporción de NPs Ag-polisacárido (M3 y M6). 49
- Tabla 6.** Parámetros de hinchamiento de las membranas M1-M6. 53

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Micrografía FE-SEM de agregado de NPs Ag- κ CA.....	68
Anexo 2. Micrografía FE-SEM de NPs Ag- κ CA.....	69
Anexo 3. Micrografía FE-SEM de NPs Ag-CH.....	69
Anexo 4. Micrografía FE-SEM de agregado de NPs Ag-CH.	70
Anexo 5. Mapeo de distribución de elementos químicos por EDX de NPs Ag- κ CA. 70	
Anexo 6. Mapeo de distribución de elementos químicos por EDX de NPs Ag-CH... 71	
Anexo 7. Micrografías ópticas de células adherentes (24 h) sin lixiviados y en presencia de lixiviados de membranas M1-M3.	72
Anexo 8. Micrografías ópticas de células adherentes (24 h) sin lixiviados y en presencia de lixiviados de membranas M4-M6.	73

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi comité, el Dr. Sergio Pérez Sicaños por formar parte de este proceso, por los consejos y recomendaciones que han enriquecido este proyecto de tesis. A mis directores de tesis, el Dr. Manuel Alatorre Meda y la Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez por todo el tiempo invertido en enseñarme y guiarme a ser mejor estudiante día con día, por tanto aprendizaje, ayuda y cariño.

A mis papás infinitas gracias por motivarme a realizar este posgrado, por siempre impulsarme a crecer académica y personalmente. A mi mejor amiga, por siempre apoyarme y estar en todo momento. A mi novio por su apoyo incondicional, por toda su ayuda y por escucharme siempre. A mis compañeros de laboratorio Fernanda, Perla, Sergio, Melanie, Saúl y Anayanci, por tantas risas y buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. A todos los llevo en mi corazón.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Grupo de Biomateriales y Nanomedicina / Laboratorios de cultivo celular y microscopia confocal del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana, bajo la dirección de:

Dr. Manuel Alatorre Meda

y bajo la codirección de:

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

Esta investigación fue financiada por CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) a través de los siguientes proyectos:

1. Proyecto de investigación: “Biomateriales producidos a partir de polímeros naturales para tratamiento regenerativo de úlceras del pie diabético.”

Referencia: CONACyT-PDCPN-2015-89

2. Proyecto de investigación: “Fortalecimiento de la infraestructura científica de un laboratorio de cultivo celular para el desarrollo y evaluación biológica de biomateriales poliméricos y nuevas nanoplataformas teragnósticas.”

Referencia: CONACyT-INFR-2015-251863

Responsable: Dr. Manuel Alatorre Meda

Finalmente se agradece al Instituto Tecnológico de Tijuana, a sus directivos, coordinadores, secretarías y demás personal que forma parte de esta magnífica institución educativa.

VITA

- 15/mayo/1997 Nacida en La Paz, B.C.S., México.
- 2012-2015 Educación Media Superior con Especialidad en Higiene y Salud.
- 2016-2020 Ingeniería en Nanotecnología, Instituto Tecnológico de Tijuana.
- 2018 Participación en el XI Simposio Internacional: Investigación Química en la Frontera, modalidad cartel científico.
- 2019 Participación en la IV Semana Académica de Ing. Química, Ing. en Nanotecnología e Ing. Ambiental, modalidad cartel científico.
- 2019 Conferencia en la Universidad Autónoma de Baja California: Facultad de Ciencias de la Salud.
- 2020-2022 Becario CONACyT.
- 2021 Participación en el XII Simposio Internacional Investigación Química en la Frontera, modalidad oral.

- 2021 Participación en el 4to Coloquio de Materiales de Interés Biotecnológico: “Perspectivas en la Salud Humana”. Universidad de Sonora, modalidad oral.
- 2022 Maestría en Ciencias en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana.

ÁREA DE ESTUDIO

Área principal: Biomateriales y nanomateriales

Especialidad: Nanomedicina

RESUMEN

“SISTEMAS NANOCOMPUESTOS DE POLISACÁRIDO/NANOPARTÍCULAS DE PLATA: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA, MECÁNICA Y BIOLÓGICA”

por

Michelle Beatriz Arizpe Castrejón

Ingeniera en Nanotecnología

Instituto Tecnológico de Tijuana, 2020

Dr. Manuel Alatorre Meda

Director de tesis

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

Codirectora de tesis

La nanotecnología ha tenido un impacto importante en el área de la medicina en las últimas décadas. Poco a poco ha ido avanzando e incrementándose el diseño

y producción de nanomateriales que puedan tener propiedades biológicas y, por lo tanto, ser utilizados como agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Un área importante de aplicación es la medicina regenerativa, la cual nace como uno de los enfoques principales de la nanomedicina y promete resolver una de las principales problemáticas que existen en la medicina actual: la regeneración eficiente de tejidos. Ya se ha demostrado que algunos nanomateriales con propiedades especiales de morfología, tamaño o carga pueden promover o coadyuvar en la regeneración de tejidos.

Otro de los materiales de interés en la medicina regenerativa son los polisacáridos, que debido a su naturaleza poseen buenas propiedades biológicas y su combinación con nanomateriales da lugar a biomateriales con propiedades mecánicas y biológicas mejoradas.

Existe una alta incidencia de complicaciones causadas por heridas, por lo que el desarrollo de materiales novedosos, que puedan promover procesos de cicatrización y regeneración, ha crecido y promete resolver esta problemática.

En este trabajo se prepararon membranas de red simple cargadas con NPs Ag-polisacárido para su uso como apósitos en el tratamiento de heridas, producidas por moldeo y evaporación de solvente con entrecruzamiento iónico.

El proyecto se dividió en dos etapas: (i) la síntesis de nanopartículas de plata utilizando polisacáridos como agentes reductores y estabilizantes (NPs Ag-polisacárido), en este caso κ -carragenina (κ CA) y quitosano (CH), partiendo de un método de síntesis verde ya establecido, que se replicó y optimizó en el proceso, y (ii)

la preparación de membranas de polisacáridos cargadas con las NPs Ag-polisacárido previamente sintetizadas.

Se realizó la caracterización fisicoquímica de las NPs Ag-polisacárido para la evaluación de parámetros como tamaño, morfología y carga electrostática. Esto se llevó a cabo por espectroscopía de UV-Vis, Pot ζ , AFM y FE-SEM. Asimismo, se evaluó la actividad biológica de las NPs Ag-polisacárido por medio de ensayos de viabilidad celular. Se obtuvieron resultados favorables de citocompatibilidad con porcentajes de viabilidad celular superiores al 80% en las diferentes concentraciones estudiadas.

Una vez sintetizadas y liofilizadas las NPs Ag-polisacárido, se prepararon tres sistemas de membranas por polisacárido con diferentes proporciones polisacárido nativo/NPs Ag-polisacárido. Las membranas nanocompuestas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido fueron caracterizadas en términos de sus propiedades fisicoquímicas, de superficie, mecánicas y biológicas.

En general, las membranas de ambos polisacáridos mostraron resultados prometedores, en cuanto a su evaluación mecánica y a sus propiedades de hinchamiento, con relación a una mayor proporción de NPs Ag-polisacárido en la membrana. Los resultados de las pruebas de biológicas demostraron altos porcentajes de viabilidad, lo que postula a estos sistemas como buenos candidatos como apósitos para heridas con aplicación potencial en medicina regenerativa.

ABSTRACT

**“POLYSACCHARIDE/SILVER NANOPARTICLES NANOCOMPOSITE SYSTEMS:
SYNTHESIS, CHEMICAL, MECHANICAL, AND BIOLOGICAL
CHARACTERIZATION”**

by

Michelle Beatriz Arizpe Castrejón

Nanotechnology Engineer

Tijuana Institute of Technology

Dr. Manuel Alatorre Meda

Thesis supervisor

Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

Thesis cosupervisor

Nanotechnology has had an important impact on medicine in the last decades. Gradually, the design and the production of nanomaterials that may have biological properties and, therefore, can be used as therapeutic and diagnostic agents have advanced and increased.

An important nanotechnology area of application is regenerative medicine. This approach was born as one of the main approaches of nanomedicine and promises to solve one of the main existent problems in current medicine: efficient tissue regeneration. It has already been shown that nanomaterials with special properties of morphology, size, and electrostatic charge can promote or assist tissue regeneration.

Polysaccharides are one of the materials with a special interest in regenerative medicine due to their excellent biological properties provided by their nature. This, combined with the unique characteristics of nanocomposite biomaterials, can give rise to improved mechanical and biological properties.

There is a high incidence of wound complications, that's why the development of novel nanocomposite biomaterials that can promote healing and regenerative processes has grown and promises to solve this problem.

In this work, single network membranes loaded with Ag NPs were prepared for their use as dressings in wound treatment. These membranes were produced by the solvent-casting method coupled with ionic crosslinking.

This project was divided into two stages: (i) the synthesis of Ag NPs using polysaccharides as reducing and stabilizing agents. In this case, the polysaccharides used were κ -carrageenan and chitosan. We started from a known green synthesis method that was replicated and optimized in the process. The second stage was (ii) the preparation of membranes with the Ag NPs-polysaccharide previously obtained.

The characterization of the nanomaterials was made for the evaluation of physicochemical parameters such as size, morphology, and electrostatic charge. This was carried out by UV-Vis spectroscopy, Z Pot, AFM, and FE-SEM. The biological activity was also evaluated with excellent cytocompatibility results obtaining values above 80% in all cases.

Once the Ag-polysaccharide NPs were synthesized and lyophilized, membranes were prepared at varying proportions of polysaccharide/Ag-polysaccharide NPs. The physicochemical, surface, mechanical, and biological properties of the polysaccharide/Ag-polysaccharide NPs nanocomposite membranes were also evaluated.

In general, the membranes of both polysaccharides showed promising results regarding the mechanical evaluation and their swelling properties regarding the high amount of Ag-polysaccharide NPs present in the membrane. The results of the biological studies exhibit high viability percentages of cytocompatibility which postulates these membrane systems as good candidates as wound dressings for their application in regenerative medicine.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la búsqueda de terapias alternativas para el tratamiento de diferentes patologías se ha vuelto uno de los principales retos en el campo médico. El uso de nanotecnología para el desarrollo de materiales que puedan servir para este propósito ha crecido considerablemente, debido a que estos prometen reemplazar a las técnicas de diagnóstico y terapias actuales presentando alta eficiencia y bajo costo de producción.

En la patología cotidiana, las heridas representan un problema clínico desafiante con complicaciones a corto y largo plazo. En el intento de reducir esta problemática, gran esfuerzo se ha enfocado en entender la fisiología del proceso de cicatrización de heridas y en un continuo desarrollo de enfoques terapéuticos para el tratamiento de las mismas.¹ El proceso de cicatrización de heridas es bastante complejo e involucra una serie de subprocesos coordinados de diversos sistemas biológicos. Envuelve una cascada de pasos y eventos precisos y cuidadosamente regulados, que están correlacionados con la aparición de diferentes tipos de células en la herida durante las distintas fases de la cicatrización.^{2,3}

Los diferentes procesos de la reparación de un tejido son desencadenados por el daño al mismo y se pueden unir en una secuencia de cuatro fases dependientes del tiempo: (i) coagulación y homeostasis, que empieza de manera inmediata después del daño al tejido; (ii) inflamación, llamada fase de inflamación o defensiva, que se enfoca en destruir bacterias y eliminar residuos, esencialmente preparando el lecho de la

herida para el crecimiento de tejido nuevo; (iii) proliferación, que comienza después de unos días del daño al tejido y abarca la mayor parte del tiempo de sanación; y (iv) remodelación de la herida, donde el proceso de cicatrización tiene lugar.⁴⁻⁶

Una herida grave en la piel puede inhibir por completo su función de protección del medio exterior. Un apósito adecuado es la clave para facilitar el cuidado de la herida y el proceso de sanación, actuando como barrera en el sitio de herida contra contaminación e infecciones. Los apósitos tradicionales como algodón, vendas y gasas no proveen un ambiente húmedo y, debido a la constante liberación de exudados de la herida, estos apósitos tienden a adherirse a la piel haciendo el proceso de remoción doloroso para el paciente. Los exudados de la herida son un componente clave en todas las etapas del proceso, ya que irrigan la herida continuamente manteniéndola en condiciones de humedad.⁶⁻⁸ Por lo anterior, un apósito ideal debe facilitar y acelerar el proceso de cicatrización al estar expuesto a exudados de la herida, sin causar ningún daño a la hora de ser removido.

Los apósitos modernos han surgido como una mejora de los tratamientos de heridas tradicionales. Su característica esencial es retener exudados y recrear el ambiente húmedo alrededor de la herida para facilitar el proceso de sanación.⁷ Estos apósitos modernos se clasifican de acuerdo con los materiales de los que están hechos. La introducción de apósitos de materiales de origen natural es una propuesta prometedora debido a las características y propiedades que éstos presentan, tales como biocompatibilidad y biodegradabilidad. Hoy en día, entre los materiales de origen natural de mayor interés para la preparación de apósitos (y otros biomateriales) se

encuentran los polisacáridos. Los polisacáridos son macromoléculas formadas por unidades repetitivas de monosacáridos que se destacan por la presencia de numerosos grupos funcionales que le confieren una gran versatilidad química, además de que poseen naturaleza endógena que los hace biocompatibles y generalmente biodegradables (se presentan de manera natural en la matriz extracelular). Además de presentar la biocompatibilidad, biodegradabilidad y versatilidad química referidas, los polisacáridos poseen afinidad sobresaliente por células y biomoléculas endógenas, así como sensibilidad a estímulos externos, entre otras.⁹⁻¹¹

Por otro lado, la incorporación de nanopartículas (NPs) a apósitos a base de polisacáridos ha demostrado mejorar ciertas propiedades mecánicas y biológicas del material nativo.¹²⁻¹⁴ Un tipo de NPs muy atractivo para aplicaciones biomédicas son las nanopartículas de plata (NPs Ag). Las propiedades biológicas de las NPs Ag las hacen excelentes candidatos como agentes terapéuticos y, aunado a la versatilidad química que poseen los polisacáridos de formar complejos, los sistemas nanocompuestos polisacárido/NPs Ag-polisacárido se posicionan como una opción alternativa y altamente viable como tratamiento moderno en los procesos de sanación de heridas.¹⁵⁻¹⁷ En este proyecto se estudiará la preparación y caracterización fisicoquímica, mecánica y biológica de sistemas nanocompuestos a partir de polisacáridos cargados con NPs Ag con potencial aplicación como apósitos en medicina regenerativa.

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

2.1. Planteamiento del proyecto

Se plantea la síntesis y evaluación de sistemas nanocompuestos a partir de los polisacáridos quitosano (CH) y κ -carragenina (κ CA) y NPs Ag con propiedades mecánicas, actividad antibacteriana y afinidad celular que puedan imitar las características elásticas y biológicas de la piel.

2.2. Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es preparar sistemas nanocompuestos de polisacáridos y NPs Ag que sean biocompatibles y que presenten de manera simultánea resistencia mecánica, actividad antibacteriana y citocompatibilidad para su uso potencial en medicina regenerativa.

2.3. Objetivos particulares

1. Sintetizar NPs Ag utilizando κ CA y CH como agentes reductores y estabilizantes por síntesis verde (NPs Ag-polisacárido).
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las NPs Ag-polisacárido, tales como morfología, carga electrostática superficial, tamaño y composición elemental.
3. Preparar membranas con diferentes proporciones de polisacárido nativo/NPs Ag-polisacárido.
4. Caracterizar las propiedades de superficie de las membranas obtenidas por FT-IR y AFM.

5. Caracterizar las propiedades mecánicas de las membranas por ensayos de punción y tensión en texturómetro.
6. Obtener la cinética de hinchamiento de las membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido obtenidas.
7. Evaluar la biodegradabilidad de las membranas en presencia de enzimas.
8. Caracterizar la actividad antibacteriana, citocompatibilidad y biocompatibilidad de las membranas.

III. JUSTIFICACIÓN

El tipo de sistemas de interés para este proyecto se anticipa como una alternativa segura y eficiente para el tratamiento de heridas en la práctica clínica, libre de presentar citotoxicidad. Estos sistemas combinarán la naturaleza endógena de los polisacáridos propuestos con la actividad antibacteriana y reforzamiento mecánico que brindan las NPs Ag estabilizadas con los mismos polisacáridos que serán incorporadas.

IV. ANTECEDENTES

4.1. Nanopartículas de plata

La plata es un metal de transición que posee una alta conductividad eléctrica y térmica. Se destaca por su actividad terapéutica contra bacterias y otros agentes infecciosos.¹⁸ Las propiedades biológicas de la plata se han estudiado a lo largo del tiempo y existe una gran cantidad de productos que contienen este elemento por su alta eficiencia como agente antimicrobiano.

Las NPs Ag juegan un papel importante en el campo científico, especialmente en las áreas de biología y medicina, debido a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas atractivas. Estas propiedades mejoradas, en comparación con su contraparte en bulto, se le atribuyen a la elevada energía de superficie que adquieren en la nanoescala. Se ha demostrado que las NPs Ag poseen propiedades antibacterianas,¹⁷ antivirales,¹⁹ antitumorales²⁰ y más recientemente, propiedades regenerativas.²¹

La principal limitante en la producción de NPs Ag son los métodos de síntesis convencionales, ya que usualmente se utilizan condiciones de reacción extremas (i.e. de temperatura y presión), y se obtienen subproductos de reacción tóxicos, tanto para el ser humano como para el medio ambiente. Es por lo anterior, que productos naturales como polisacáridos, extractos naturales y material biológico se presentan

como materiales atractivos en la síntesis de NPs Ag, desempeñándose como agentes reductores y estabilizantes biológicamente amigables.²²

4.2. Nanomedicina

La nanomedicina es una de las ramas de la nanotecnología con más interés científico en los últimos años, y es básicamente la aplicación de materiales nanoestructurados en el diagnóstico y terapia en la patología cotidiana. La nanomedicina pretende resolver los retos actuales de la medicina convencional con técnicas más eficientes que replacen las utilizadas actualmente.²³

Existe una búsqueda constante de materiales nanoestructurados que puedan ser utilizados en el ámbito médico y se han logrado introducir al mercado fármacos a base de nanopartículas para ser utilizadas como agentes de contraste y agentes anticancerígenos, por mencionar algunos.

La nanomedicina se divide en tres áreas principales: el nanodiagnóstico, que se enfoca en la detección de enfermedades en etapas tempranas; la nanoterapia, que tiene como objetivo la terapia dirigida y la liberación controlada de fármacos; y por último, la medicina regenerativa, que se encarga de la producción de sistemas que promuevan un ambiente ideal en un tejido dañado y la regeneración del mismo.²⁴ La rama de la medicina regenerativa es de especial interés para este proyecto.

4.3. Medicina regenerativa

El objetivo principal de la medicina regenerativa es producir sistemas que sean biocompatibles y puedan estimular los mecanismos reparadores propios del cuerpo

humano. Para el caso de tratamiento de heridas, estos sistemas deben proveer un ambiente ideal que actúe como barrera protectora de diferentes patógenos y contaminantes que puedan complicarlas.^{25,26} Por lo anterior, se busca de manera constante producir materiales nanoestructurados que presenten características específicas y puedan ser utilizados como terapia en la regeneración de tejidos (fig. 1).

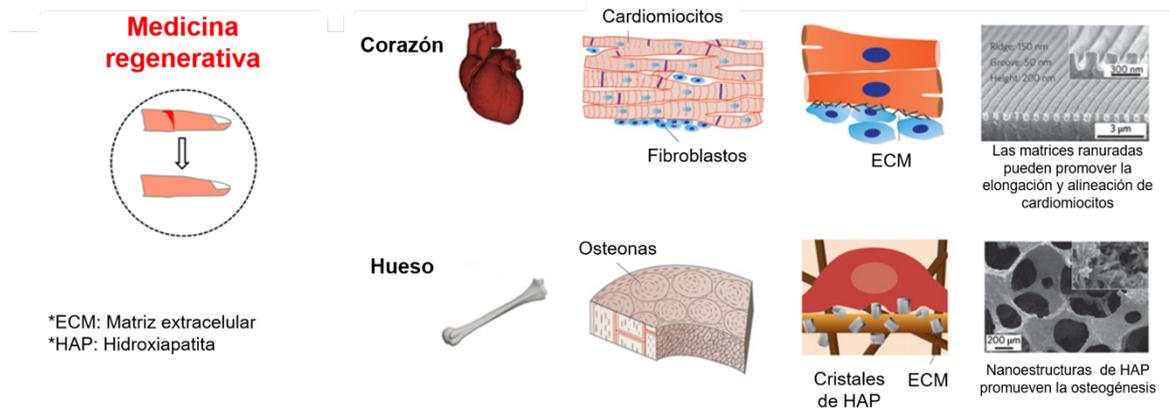


Figura 1. Ejemplos de materiales nanoestructurados con aplicación en el tratamiento regenerativo de tejidos específicos. Reproducida de Dvir *et al.*²⁶

Las NPs Ag han demostrado jugar un papel importante en el proceso de regeneración de heridas, debido a la interacción de éstas con diferentes entidades biológicas involucradas en el proceso de cicatrización. Wong *et al.*²⁷ estudiaron el efecto de NPs Ag en heridas con modelos animales haciendo una comparación con heridas tratadas con sulfadiazina de plata (SSD) y heridas sin tratamiento. En este estudio observaron que, en general, hubo una cicatrización en menor tiempo en las heridas tratadas con NPs Ag que en aquellas tratadas con SSD y las heridas sin tratar. Con base en esto, también se estudió el efecto aislado de NPs Ag en queratinocitos y

fibroblastos obteniendo que en el caso de los queratinocitos la proliferación celular fue mayor en presencia de NPs Ag en comparación con el control. Sin embargo, contrario a este resultado, la proliferación de fibroblastos disminuyó en presencia de NPs Ag (fig. 2).

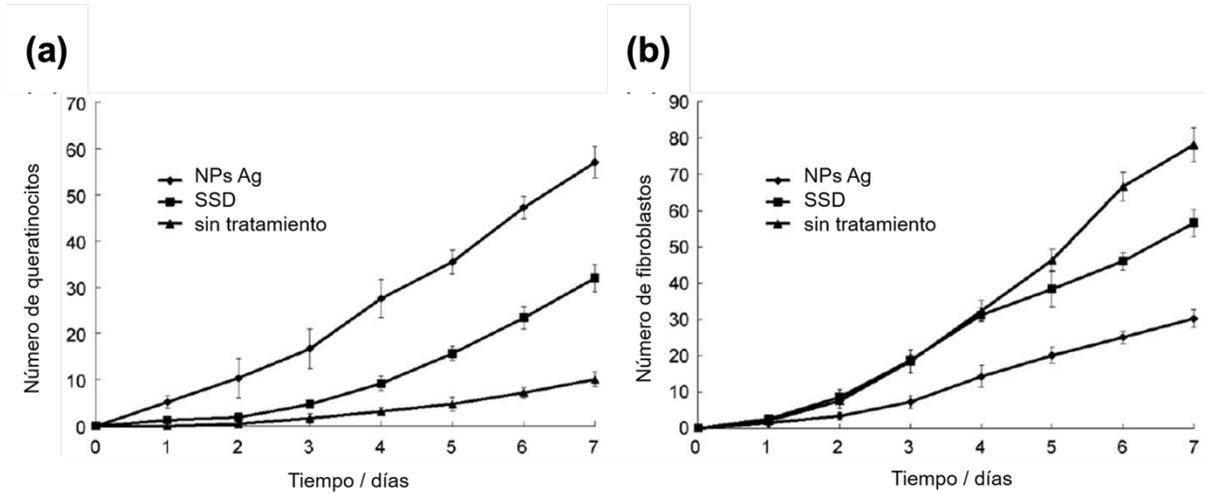


Figura 2. Número de queratinocitos y fibroblastos en el área de crecimiento en el transcurso de siete días. Reproducida de Wong *et al.*²⁷

La disminución en la proliferación de fibroblastos en presencia de NPs Ag se estudió en dos etapas. Primero, se estudió la presencia de hidroxiprolina y colágeno I en el medio de cultivo de los fibroblastos, que son proteínas, expresadas por estas células. Se obtuvo una baja concentración de ambas proteínas, lo que se atribuyó al cambio fenotípico de las células, en este caso, a su diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

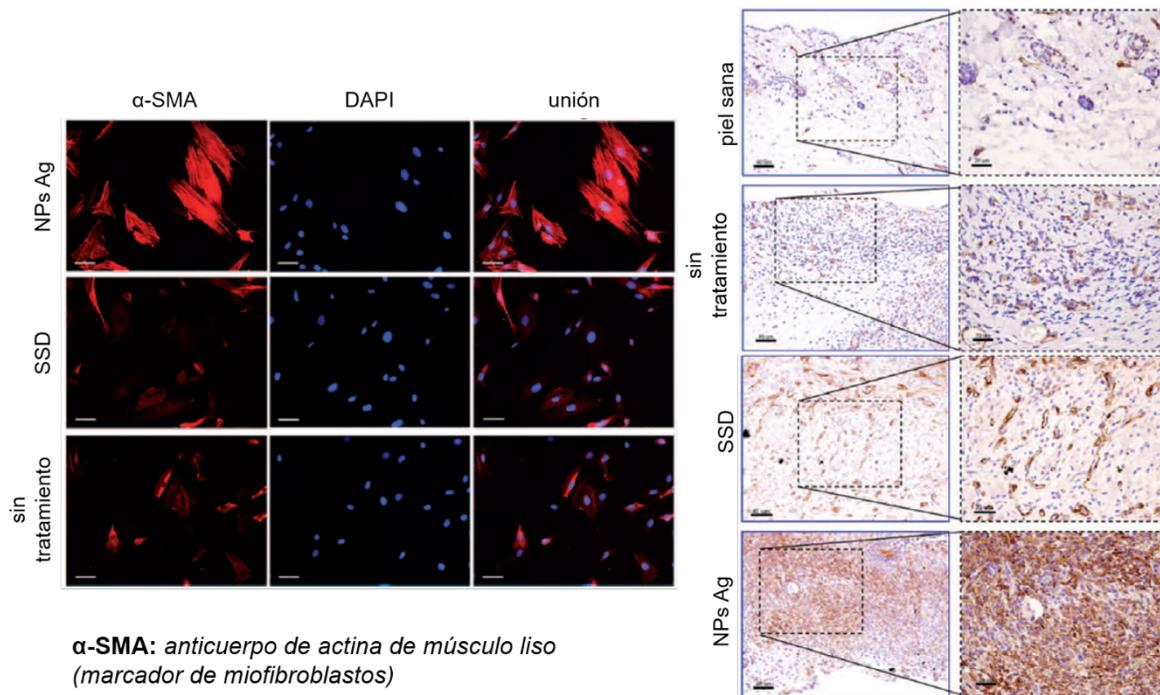


Figura 3. Tinción de miofibroblastos utilizando α -SMA después de cultivar fibroblastos 3T3 con NPs Ag y SSD durante 48 h (morfología estrellada con prolongaciones: α -SMA, morfología esférica: núcleos de fibroblastos; barras de escala: 40 mm) y tinción α -SMA de heridas control y tratadas en el día 7. Reproducida de Wong *et al.*²⁷

Segundo, se llevó a cabo la tinción del anticuerpo de actina del músculo liso (α -SMA) en cultivo y en heridas control y tratadas, mismas que fueron observadas por microscopia confocal (células que fueron cultivadas *in vitro*) y microscopia óptica (cortes histológicos de las heridas). A partir de estos estudios se confirmó la diferenciación celular antes referida (fig. 3).

4.4. Polisacáridos

Los polisacáridos son macromoléculas formadas por unidades repetitivas de moléculas de menor tamaño denominadas monosacáridos, los cuales se encuentran

unidos por enlaces glucosídicos.⁹ Son materiales obtenidos de fuentes naturales tales como el exoesqueleto de invertebrados y crustáceos, de las paredes de algas y por la fermentación de bacterias, entre muchas otras. En la fig. 4 se muestran las estructuras químicas de los polisacáridos κ CA y CH, de interés para este proyecto.

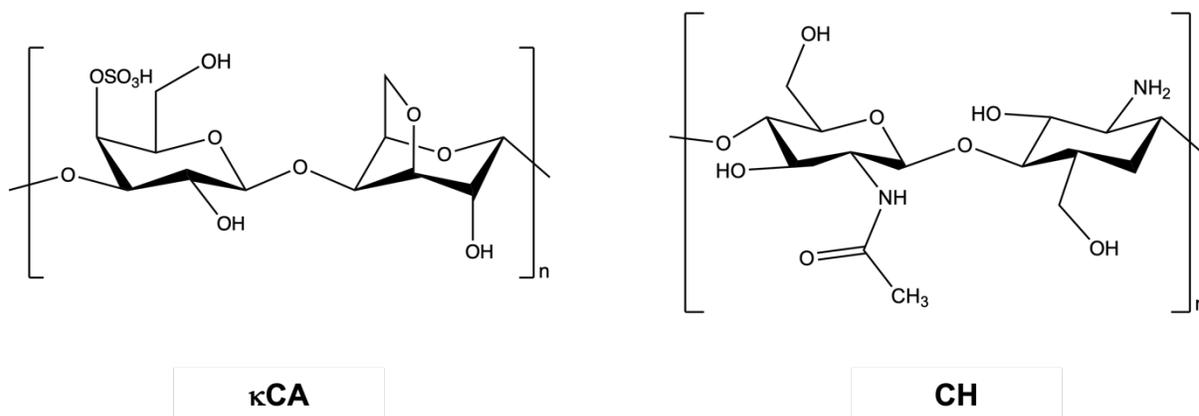


Figura 4. Estructuras químicas de κ CA y CH.

Existe una gran variedad de polisacáridos y se utilizan para un sinnúmero de aplicaciones, debido a las propiedades biocompatibles y biodegradables que los caracterizan. Estos materiales son de especial interés en la industria de producción de plásticos, y actualmente han suscitado el interés de la industria médica para la producción de materiales que puedan utilizarse como dispositivos médicos, para la producción de sistemas de liberación de fármacos o como apósitos de heridas. A continuación, se describen los polisacáridos utilizados en este proyecto.^{9,28}

4.4.1. κ -Carragenina

Otro biopolímero importante dentro de este contexto en la κ CA, la cual es un polisacárido aniónico natural encontrado en la pared de numerosas algas rojas.²⁹ La κ CA es un polisacárido sulfatado con una estructura lineal de unidades *D*-galactosa y 3,6-anhidro-*D*-galactosa (fig. 4).

Dentro de las aplicaciones de la κ CA se destaca su uso como gelificante en alimentos y para la mejora en la textura de éstos. Es utilizada también en la industria cosmética y farmacéutica por su estructura química que le confiere cierta actividad biológica, por lo que se propone como buen material en la preparación de sistemas de liberación controlada de fármacos.^{30,31}

4.4.2. Quitosano

El CH es un biopolímero catiónico en medios parcialmente ácidos, conformado por unidades de $\beta(1-4)$ -*D*-glucosamina y *N*-acetil-*D*-glucosamina (fig. 4). Éste se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, la cual se obtiene a su vez del exoesqueleto de insectos y crustáceos. El CH tiene propiedades antihemorrágicas, antimicrobianas y antifúngicas, por lo que se destaca como un material rentable para diversas aplicaciones biomédicas.³²

Cabe destacar que la carga parcial positiva del CH, correspondiente al grupo amino de su estructura (con pKa de ca. 6.5), lo vuelve un bioadhesivo, es decir, se puede adherir fácilmente a superficies con carga negativa.

4.5. Aplicaciones de sistemas nanocompuestos polisacáridos y NPs Ag

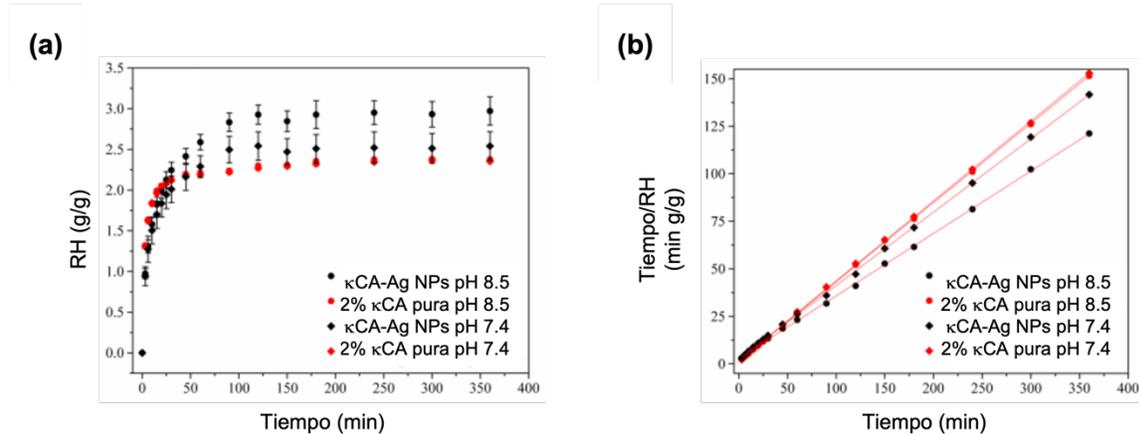
La combinación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las NPs Ag y las destacadas propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y de afinidad por sistemas biológicos de los polisacáridos resulta en sistemas nanocompuestos atractivos para múltiples aplicaciones biomédicas.^{10,33}

Kanis y *et al.*³¹ desarrollaron un método fácil, verde y escalable para la producción de un hidrogel a base de κ CA con NPs Ag sintetizadas *in situ* (κ CA-NPs Ag) para su aplicación como apósito de heridas. Ellos reportaron la síntesis *in situ* de las NPs Ag con morfología esférica y monodispersas con diámetros de *ca.* 27 nm. Los autores también caracterizaron la cinética de hinchamiento del hidrogel y la liberación de iones Ag⁺.

Del estudio cinético de hinchamiento se observó un hinchamiento inicial rápido seguido de un comportamiento asintótico hacia el equilibrio (fig. 5a). Con el fin de obtener información sobre el mecanismo de difusión y los pasos delimitantes en la velocidad de hinchamiento, ajustaron la cinética de hinchamiento a un modelo de segundo orden de Schott obteniendo un coeficiente de correlación de 0.99. En la fig. 5b se muestra la ecuación que describe el modelo cinético, donde RH_t representa la relación de hinchamiento a un tiempo t , $RH_{t\infty}$ es el máximo teórico o la relación de hinchamiento en el equilibrio y k_{is} es la constante de velocidad de hinchamiento inicial.

Para los estudios de liberación de iones se utilizó una celda de Franz de difusión horizontal que imita la difusión unidireccional de Ag⁺ del hidrogel a la piel/herida.

Igualmente se observó un perfil asintótico con el tiempo, tendiendo al equilibrio a partir de las 48 h (fig. 6).



RH: relación de hinchamiento

$$RH \text{ (g/g)} = \left(\frac{w_s - w_0}{w_0} \right)$$

Modelo cinético de *pseudo*-segundo orden de Schott:

$$\frac{t}{RH_t} = \frac{1}{k_{is}} + \frac{1}{RH_{\infty}} t$$

Figura 5. Isothermas (a) y ajuste de cinética de hinchamiento de hidrogeles de κCA-NPs Ag (b). Reproducida de Kanis *et al.*³²

Por otro lado, Fan *et al.*³⁴ sintetizaron hidrogeles de CH reforzados con NPs Ag con propiedades mecánicas y antibacterianas ultra elevadas para la regeneración acelerada de heridas. Similarmente al ejemplo anterior, las NPs Ag fueron sintetizadas *in situ*, en este caso utilizando CH como agente estabilizante y citrato de sodio como agente reductor.

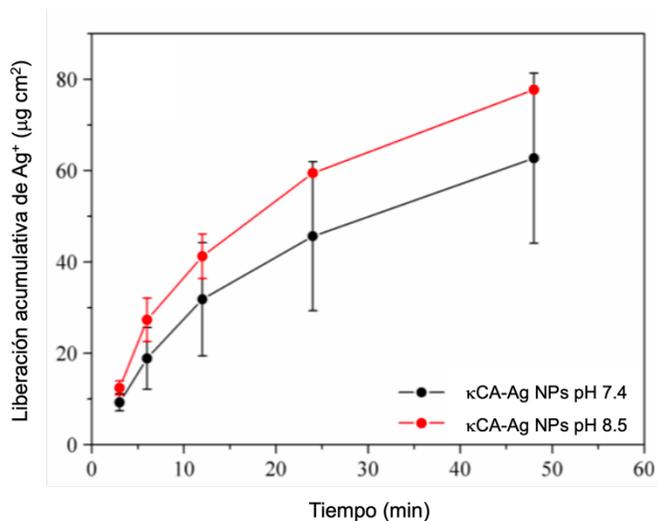


Figura 6. Perfiles de liberación acumulativa de iones Ag^+ a partir de hidrogeles $\kappa\text{CA-Ag NPs}$. Reproducida de Kanis *et al.*³²

Los autores estudiaron el efecto reforzante de las NPs Ag en la estructura del hidrogel mediante pruebas de compresión y observaron que a medida que aumentó la concentración de NPs Ag en el sistema aumentó su resistencia a la fractura. Fan y su equipo de trabajo también realizaron estudios de inhibición bacteriana por ensayos de proliferación en gel y en caldo, donde se obtuvo que la inhibición fue mayor, en ambos casos, en los sistemas con mayor concentración de NPs Ag.

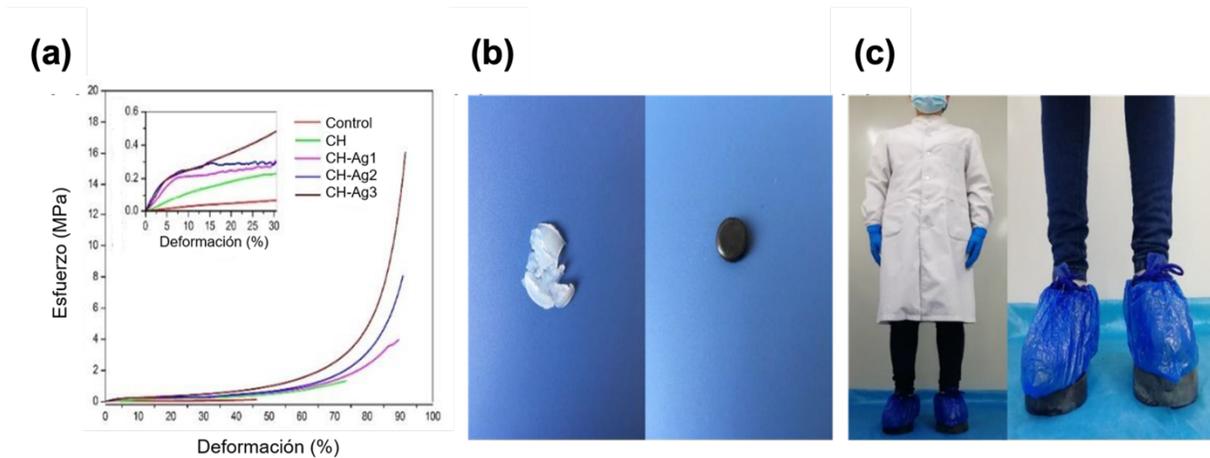


Figura 7. (a) Curvas del estudio mecánico de compresión, (b) fotografías de los hidrogeles sin reforzar (izquierda) y reforzados con NPs Ag (derecha), después de los ensayos mecánicos, y (c) fotografía representativa de un individuo de 50 kg parado sobre uno de los hidrogeles reforzados con NPs Ag. Reproducida de Fan *et al.*³⁴

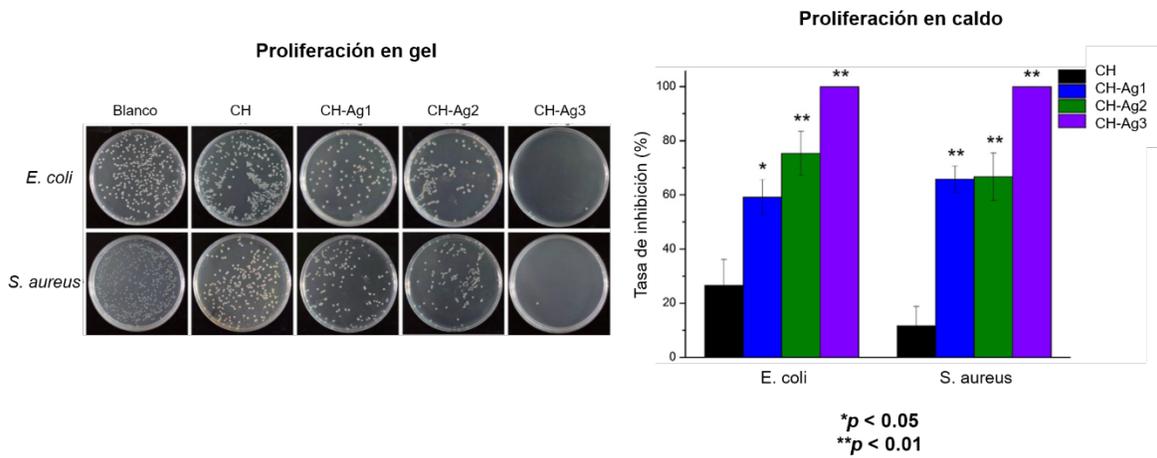


Figura 8. Ensayos de inhibición bacteriana por proliferación en gel y en caldo. Reproducida de Fan *et al.*³⁴

4.6. Hipótesis

Las membranas propuestas en este proyecto presentarán biocompatibilidad, además de actividad antibacteriana y resistencia mecánica mejoradas por la presencia de NPs Ag que serán incorporadas por lo que se proponen como nanocompuestos adecuados para su uso potencial como apósitos en el tratamiento de heridas.

V. METODOLOGÍA

5.1. Técnicas analíticas

Las diferentes caracterizaciones de las NPs Ag-polisacárido sintetizadas y membranas preparadas se realizaron en el Centro de Graduados e Investigación en Química (CGIQ) del Instituto Tecnológico de Tijuana (ITT). A continuación, se enlistan los análisis realizados y sus especificaciones:

- La caracterización por UV-Visible se llevó a cabo empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2700.
- La caracterización por Pot ζ se realizó empleando un equipo Malvern Nano-ZS Nanosizer (ZEN 3690).
- La caracterización por FE-SEM se llevó a cabo empleando un equipo Jeol, JSM-7800F.
- La lectura del medio con bacterias se realizó utilizando un espectrofotómetro Genesys 10UV marca Thermo Electron Corporation.
- La caracterización superficial de las membranas se realizó por Microscopía de Fuerza Atómica en un microscopio Nanosurf.
- Las pruebas mecánicas se llevaron a cabo en un equipo Brookfield CT-3 Texture Analyzer.
- La lectura colorimétrica de las placas de cultivo se realizó utilizando un lector de placas Biorad y usando un microscopio binocular vertical compuesto modelo DM500 marca Leica con cámara digital ICC50 HD.

- Las micrografías ópticas se realizaron en un microscopio óptico invertido CKX53.
- Las pruebas de bicompatibilidad se realizaron con xerogeles de membrana esterilizados en modelo animales en un laboratorio externo certificado por COFEPRIS, de acuerdo con especificaciones del mismo.

5.2. Reactivos y disolventes

Tabla 1. Reactivos y solventes comerciales utilizados en la parte experimental.

Reactivos	Solventes
<ul style="list-style-type: none"> • CH de bajo peso molecular • κCA • Nitrato de plata (AgNO_3) • Hidróxido de sodio (NaOH) • Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) • Agar Soya Trypticaseína (TSA) • Tripolifosfato de sodio (TPP) • Cloruro de potasio (KCl) • Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco • Cristal violeta • Línea 20ellular MDA-MB-231 	<ul style="list-style-type: none"> • Agua desionizada • Ácido acético • Etanol • Ácido ortofosfórico • Ácido fórmico • PBS • MES

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. En la Tabla 1 se enlistan todos los reactivos y solventes utilizados.

5.3. Síntesis de NPs Ag-polisacárido

Se preparó una solución de CH al 0.1% (p/v) en una solución acuosa de ácido acético al 0.1% (v/v); asimismo, se preparó una solución acuosa de κ CA al 0.3% (p/v). Las soluciones de polisacáridos se mantuvieron en agitación vigorosa hasta alcanzar los 100 °C, previo a la adición de la sal metálica precursora. Se agregó una solución acuosa de AgNO₃ 5 mM, seguido de la adición gota a gota de una solución acuosa de NaOH 5 M, hasta observarse cambio en la coloración de la solución.^{32,35}

5.4. Caracterización de NPs Ag-polisacárido

Las NPs Ag-polisacárido fueron caracterizadas usando espectroscopia de UV-Visible (UV-Vis), Dispersión de Luz Dinámica (DLS), Pot ζ , Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM). Los espectros de UV-Vis fueron registrados en un intervalo de 300 a 600 nm. El radio hidrodinámico y la carga electrostática superficial se obtuvieron haciendo diluciones 1:10 de NPs Ag-polisacárido. Para la determinación de la morfología, tamaño y distribución de tamaños de las NPs Ag-polisacárido se realizaron micrografías por FE-SEM y AFM.

5.5. Ensayo preliminar de inhibición bacteriana de NPs Ag-polisacárido

Para las pruebas de inhibición bacteriana se llevó a cabo el ensayo de inhibición en caldo. En este estudio se utilizó el microorganismo *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).

Se prepararon 110 mL de TSA y 130 mL de BHI de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se realizaron alícuotas de 7 mL de TSA a 15 tubos. De BHI se añadieron alícuotas de 4 mL a 31 tubos de ensayo para producir los sistemas finales (tabla 2).

Tabla 2. Grupos de sistemas utilizados en experimentos de inhibición bacteriana.

Blancos sin bacteria	Con bacteria
<p>Medio (M)</p> <ul style="list-style-type: none"> • M1 • M2 • M3 <p>Medio + Ácido acético (MAAc)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MAAc1 • MAAc2 • MAAc3 <p>Medio + NP Ag-CH C_{min} (MNP1)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MNP11 • MNP12 • MNP13 <p>Medio + NP Ag-CH C_{med} (MNP2)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MNP21 • MNP22 • MNP23 <p>Medio + NP Ag-CH C_{máx} (MNP3)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MNP31 • MNP32 • MNP33 	<p>Solución madre de bacterias</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sol. madre bacterias <p>Medio + Bacteria (MB)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MB1 • MB2 • MB3 <p>Medio + Bacteria + Ácido acético (MBAAc)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MBAAc1 • MBAAc2 • MBAAc3 <p>Medio + Bacteria + NP Ag-CH C_{min} (MBNP1)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MBNP11 • MBNP12 • MBNP13 <p>Medio + Bacteria + NP Ag-CH C_{med} (MBNP2)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MBNP21 • MBNP22 • MBNP23 <p>Medio + Bacteria + NP Ag-CH C_{máx} (MBNP3)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MBNP31 • MBNP32 • MBNP33

En la tabla 2, la numeración 1,2 y 3 se refiere a las réplicas de cada sistema.

Una vez listos los medios TSA y BHI en sus tubos correspondientes, se esterilizaron en autoclave por 25 min. Los 15 tubos con TSA se inclinaron, se dejaron gelificar y se guardaron en refrigeración con los 31 tubos de BHI por 24 h. Se hizo el sembrado de la bacteria en los tubos con TSA y se puso en incubación para su crecimiento por 24 h a 45 °C.

Se realizaron 3 soluciones a diferentes concentraciones de NPs Ag-CH: 4.99 mg/mL ($C_{\text{mín}}$), 8.44 mg/mL (C_{med}) y 11.67 mg/mL ($C_{\text{máx}}$). Las tres concentraciones se obtuvieron a partir de una solución madre de 5 mg/mL, resultando en un volumen total de 4.2 mL (4 mL de medio de cultivo bacteriano + 200 μ L de NPs Ag-CH).

Se rotularon y separaron los 31 tubos de BHI en dos grupos: los blancos sin bacteria y los tubos con bacteria. Se añadieron 200 μ L de las tres soluciones a diferentes concentraciones de NPs Ag-CH a los seis sistemas indicados: sin bacteria (MNP1, MNP2, MNP3), con bacteria (MBNP1, MBNP2, MBNP3) y sus réplicas. A su vez, se añadieron 200 μ L de una solución acuosa al 0.1% (v/v) de AAc a los sistemas MAAC, MBAAC y sus réplicas.

Se preparó una solución madre bacteriana en uno de los tubos de BHI con carga bacteriana de 3 asadas, de la cual se añadieron 10 μ L a los cinco sistemas indicados con bacteria (MB, MBAAC, MBNP1, MBNP2, MBNP3) y sus réplicas. Los 31 tubos se dejaron en incubación por 24 h a 45 °C.

Pasadas las 24 h, se evaluó el crecimiento bacteriano por espectroscopia de UV-Vis. El estudio se realizó con la lectura de 2 mL de los cinco sistemas con bacteria (MB, MBAAc, MBNP1, MBNP2, MBNP3) a una longitud de onda de 540 nm.

5.6. Preparación de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

Se preparó una solución al 3.33% (p/v) a diferentes relaciones de polisacárido/NPs Ag-polisacárido en 3 mL de agua destilada. La solución resultante fue transferida a un molde y se dejó evaporar el solvente en un horno a 50 °C por 5 h. Las membranas obtenidas fueron reticuladas iónicamente con soluciones al 1% (p/v) de ambos entrecruzantes: KCl para κ CA y TPP para CH. Las membranas se mantuvieron inmersas en el entrecruzante por 24 h. Finalmente, los materiales se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de sales. Para su caracterización fisicoquímica, mecánica y biológica, las membranas se congelaron (0 °C, por 24 h), liofilizaron (c.a. -60 °C y 0.1 mBar, por 48 h) y almacenaron para su uso siguiente.

5.7. Evaluación mecánica de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

Las membranas húmedas se cortaron y fueron montadas para realizar la evaluación de las propiedades mecánicas de punción y tensión. La evaluación mecánica de punción y tensión se realizó utilizando un “trigger” de 20 gr, a una velocidad de 0.5 mm/s y hasta un 100% de deformación.

5.8. Pruebas de hinchamiento de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

Se cortaron tres trozos de xerogel (deshidratados y liofilizados) por sistema de dimensiones similares y se pesaron. Los xerogeles se colocaron en recipientes con PBS y se dejaron reposar a temperatura ambiente (TA).

Se tomó el peso de las membranas cada 30 min, por un lapso de 12 h, para ver las variaciones en el peso debidas a la absorción de solución de PBS de cada una con un breve secado para quitar el solvente no absorbido.

Los datos se procesaron y se obtuvo la cinética de hinchamiento de cada sistema con sus réplicas correspondientes.

5.9. Pruebas de degradación enzimática de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

Se prepararon y pesaron tres muestras de xerogel (deshidratados y liofilizados) de cada uno de los sistemas (membranas M3 y M6). Los xerogeles de membrana se pusieron en 1 mL de solución de lisozima (20 mg/mL en PBS, pH 7.4) por 1, 5, 10 y 15 días, en condiciones de incubación (37 °C, 5% CO₂).

Después del tiempo deseado, las muestras fueron extraídas, congeladas, liofilizadas y se registró su peso para determinar su posible degradación.

5.10. Pruebas de citocompatibilidad de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

La citocompatibilidad de las membranas polisacárido/ NPs Ag-polisacárido se evaluó a través del ensayo de tinción celular con cristal violeta.³⁶ Los sistemas por

evaluar se esterilizaron sumergiéndose en una solución acuosa de etanol al 70% v/v durante 10 min.

Los lixiviados de las membranas fueron producidos en medio de cultivo celular en condiciones controladas en un baño de agitación de vaivén (a 37 °C y 70 rpm) por 48 h.

Se sembraron células MDA-MB-231 en una placa estéril de 96 pocillos a una densidad de 15,000 células/pocillo en 100 µL de medio de cultivo celular y se incubaron durante 24 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad. Posteriormente se añadieron los lixiviados de membrana obtenidos. Después de 24 y 48 h de incubación de las células, en presencia de los lixiviados en condiciones de cultivo estándar, el medio de cultivo fue removido de los pocillos y se procedió a la fijación de las células a la placa con 10 µL de glutaraldehído al 11%, manteniendo bajo agitación a temperatura ambiente, durante 15 min. Una vez fijadas las células, se retiró el glutaraldehído y se lavaron tres veces con agua destilada. A continuación, se procedió a la tinción de las células con 100 µL de una solución de cristal violeta (0.1% p/v en 10 mM de ácido orto-fosfórico, 200 mM de ácido fórmico y 200 mM de MES; pH 6) durante 15 min en agitación orbital a TA; transcurrido este tiempo las células se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron secar durante 12 h en condiciones de obscuridad.

Posteriormente se añadieron 100 µL de ácido acético al 10% y se mantuvo bajo agitación durante 15 min, a TA, para solubilizar los cristales formados del colorante.

Finalmente se realizó una lectura de absorbancia de las placas a una longitud de onda de 595 nm.

Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se expresaron como el porcentaje de viabilidad celular que fue obtenido empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ citocompatibilidad} = \left(\frac{AO}{AT} \right) * 100 \quad (1)$$

donde *AO* es la absorbancia observada en los pocillos con el compuesto objeto de estudio y *AT* es la absorbancia observada en los pocillos con PBS (control negativo).

Se realizaron micrografías ópticas de las células con un microscopio óptico invertido. Las placas de cultivo se colocaron en el soporte universal que contiene el microscopio y se adquirieron micrografías a 4x, 10x y 20x después de la fijación y tinción de las células.

VI. RESULTADOS

6.1. Síntesis de NPs Ag-polisacárido

De primera instancia, se observó la formación de NPs Ag por el cambio de coloración en la solución de incolora a amarillo brillante dependiendo de la concentración de NPs Ag formadas (fig. 9).

Se hizo un estudio sistemático de la síntesis de NPs Ag utilizando polisacáridos como agentes reductores y estabilizantes a concentraciones crecientes de AgNO_3 . Se observó una coloración de mayor intensidad (fig. 9) con el aumento de la concentración de precursor metálico, que por ende aumentó la concentración de NPs Ag formadas.

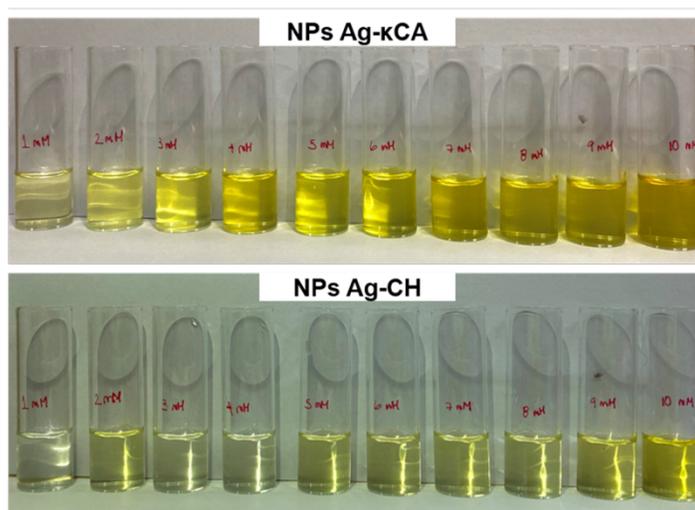


Figura 9. Soluciones de NPs Ag-polisacárido en orden creciente de concentración de precursor metálico (AgNO_3): 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mM (de izquierda a derecha).

Los experimentos siguientes se realizaron utilizando las NPs Ag-polisacárido sintetizadas con una solución acuosa de AgNO_3 5 mM.

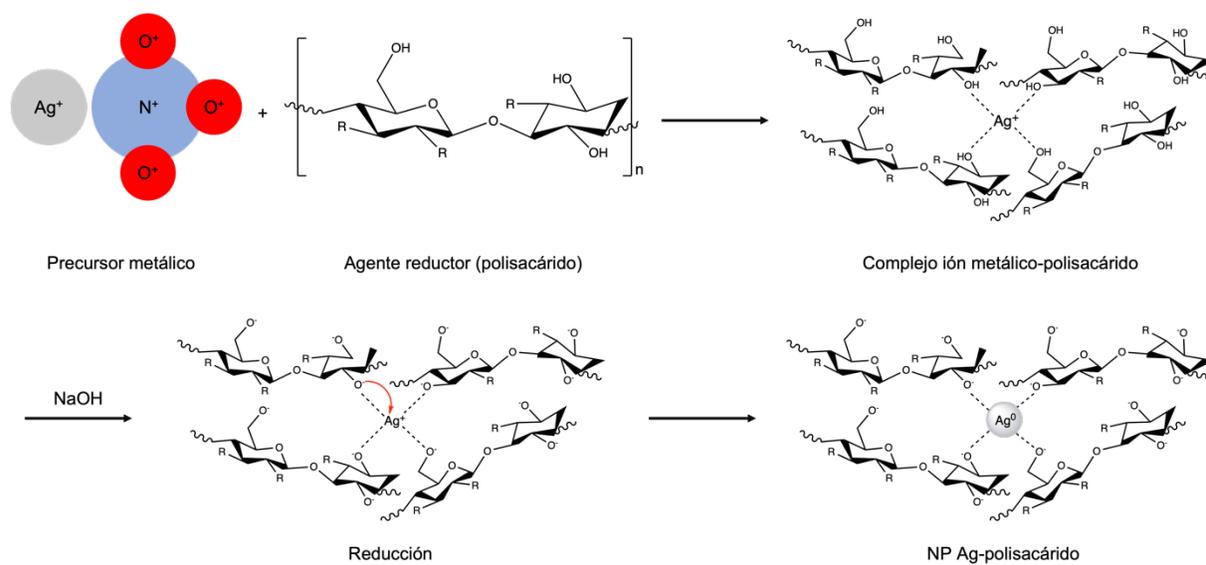


Figura 10. Propuesta del mecanismo de reducción de iones Ag^+ y de formación de NPs Ag-polisacárido.

En la fig. 10 se ilustra un mecanismo propuesto de formación de las NPs Ag considerando a cada uno de los polisacáridos empleados como agentes reductores y estabilizantes. La reducción de los iones plata se atribuye a la oxidación de los grupos hidroxilos en la estructura de los biopolímeros. El medio básico promueve el proceso de óxido-reducción con la oxidación de los grupos hidroxilo de la estructura de los polisacáridos y la reducción de los iones Ag^+ . La presencia de otros grupos funcionales con heteroátomos, como grupos sulfato ($-\text{SO}_4$) en la κCA y aminas ($-\text{NH}_2$) en el caso

del CH, ayuda a la estabilización de las NPs Ag debido a la alta densidad electrónica que poseen estos átomos, lo que les permite establecer interacciones químicas y físicas con el núcleo metálico resultando en la estabilización del sistema.^{15,33}

6.2. Caracterización de NPs Ag-polisacárido

6.2.1. Espectroscopia de UV-Vis

Se confirmó la formación de NPs Ag-polisacárido por espectroscopia de UV-Vis con la obtención de bandas de absorción estrechas, en alrededor de 420 nm, correspondientes a la resonancia de plasmón de superficie (SPR) de NPs Ag con morfología esférica. Estas características de la banda de absorción denotan la presencia de sistemas bien definidos con una distribución de tamaños estrecha y uniforme.

Como se puede observar en los espectros obtenidos (fig. 11), a medida que aumentó la concentración de AgNO_3 en la solución, también se observó el aumento de la intensidad de la banda de absorción, lo que se atribuye a una mayor concentración de NPs Ag en la muestra medida. En relación con esta tendencia, se destaca la obtención de bandas más estrechas, lo que se interpreta como sistemas con distribuciones de tamaños reducidas.

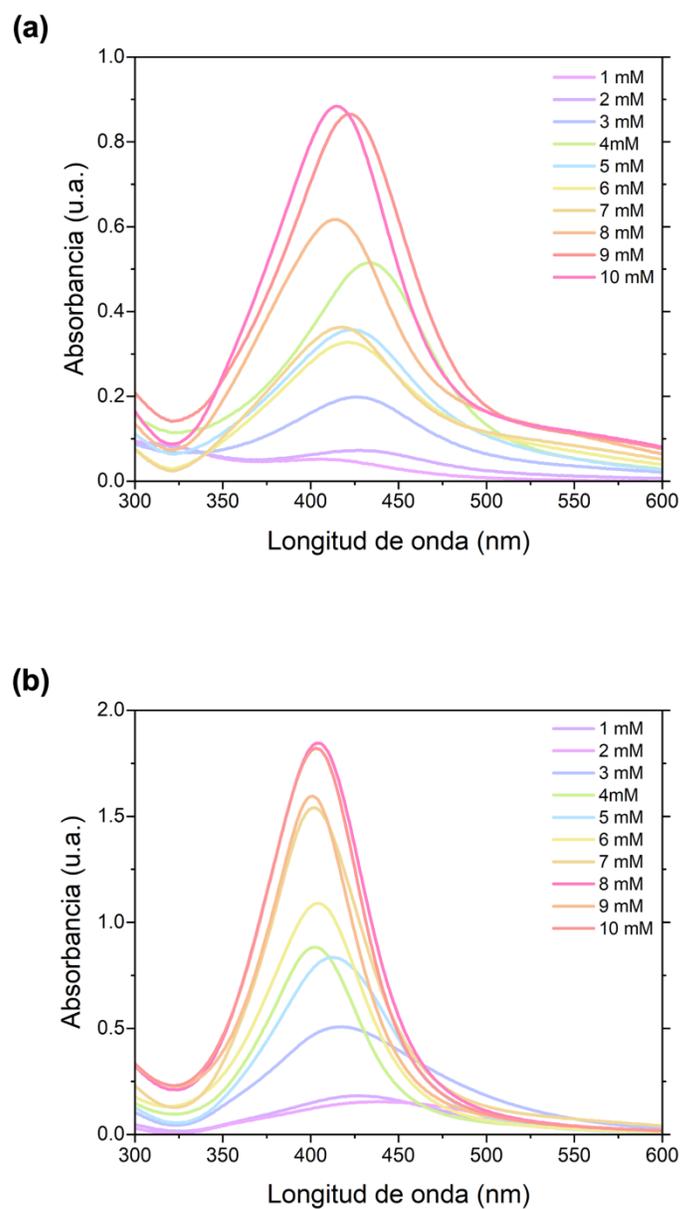


Figura 11. Espectros de absorción de UV-Vis de (a) NPs Ag-κCA y (b) NPs Ag-CH con concentraciones crecientes de precursor metálico (AgNO_3).

6.2.2. Pot ζ

Los resultados de Pot ζ de las muestras NPs Ag- κ CA y NPs Ag-CH mostraron valores de -40.37 y +39.4 mV (fig. 12), respectivamente. Las mediciones se realizaron a un valor de pH de 7.4. Esto confirma la presencia de los polisacáridos en la superficie de las NPs Ag, ya que los valores denotan la naturaleza aniónica de la κ CA y catiónica del CH. De aquí se concluye entonces, que tenemos sistemas recubiertos y que permanecen estables en solución.

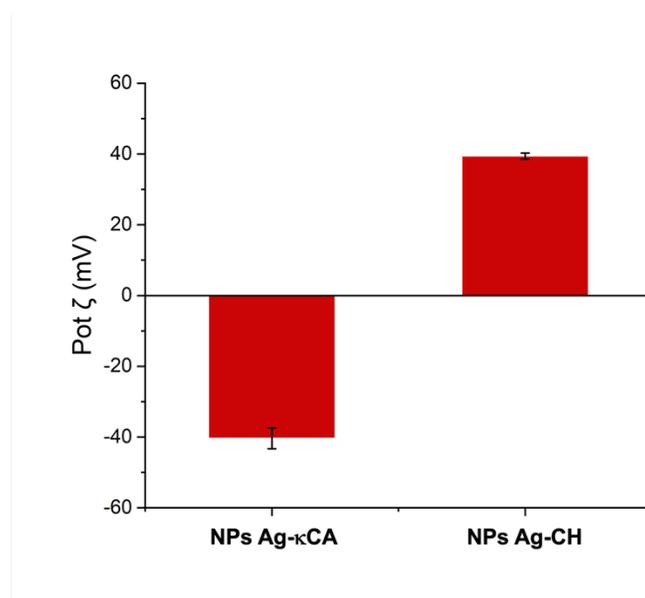


Figura 12. Valores de Pot ζ de las NPs Ag-polisacárido.

6.2.3. AFM

Se obtuvieron micrografías de las NPs Ag- κ CA y NPs Ag-CH que se observan como puntos brillantes en cada imagen (fig. 13). Las imágenes obtenidas del equipo fueron procesadas por medio del software WSxM 4.0.

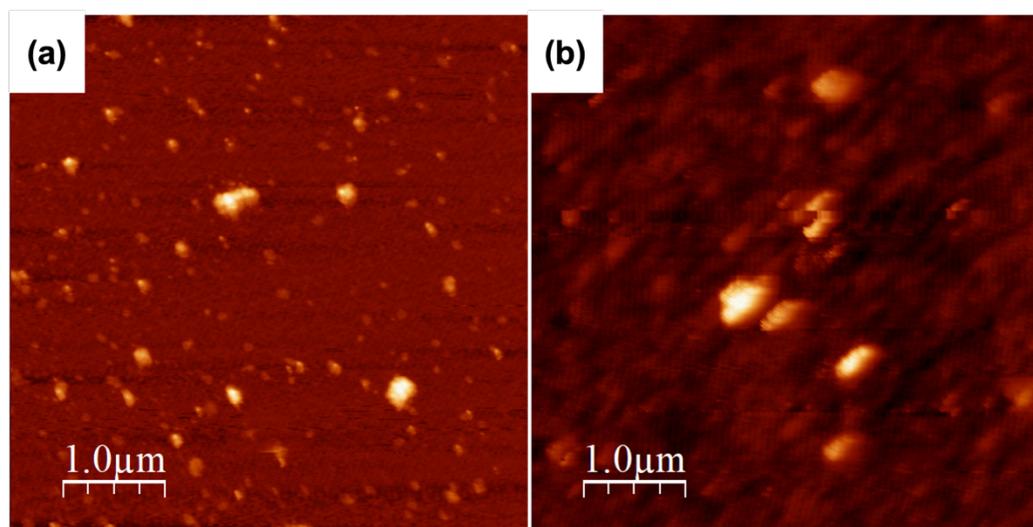


Figura 13. Micrografías AFM de a) NPs Ag-κCA y b) NPs Ag-CH.

Cada sistema estudiado se observa como NPs Ag esféricas dispersadas. La diferencia en la abundancia observada en cada imagen se atribuye a la diferencia en la naturaleza estructural de cada polisacárido.

6.2.4. FE-SEM

Se realizaron micrografías FE-SEM y de análisis elemental (EDX), donde se confirmó la presencia de las NPs Ag-polisacárido con morfología esférica (fig. 14).

Las micrografías denotan la presencia de NPs Ag embebidas y dispersadas a lo largo de la matriz polimérica de cada uno de los polisacáridos utilizados para su obtención (Anexo 1-4). Este estudio se complementó con la obtención de un mapeo de EDX para confirmar la presencia de Ag^0 y también los elementos complementarios en la muestra (Anexo 5 y 6).

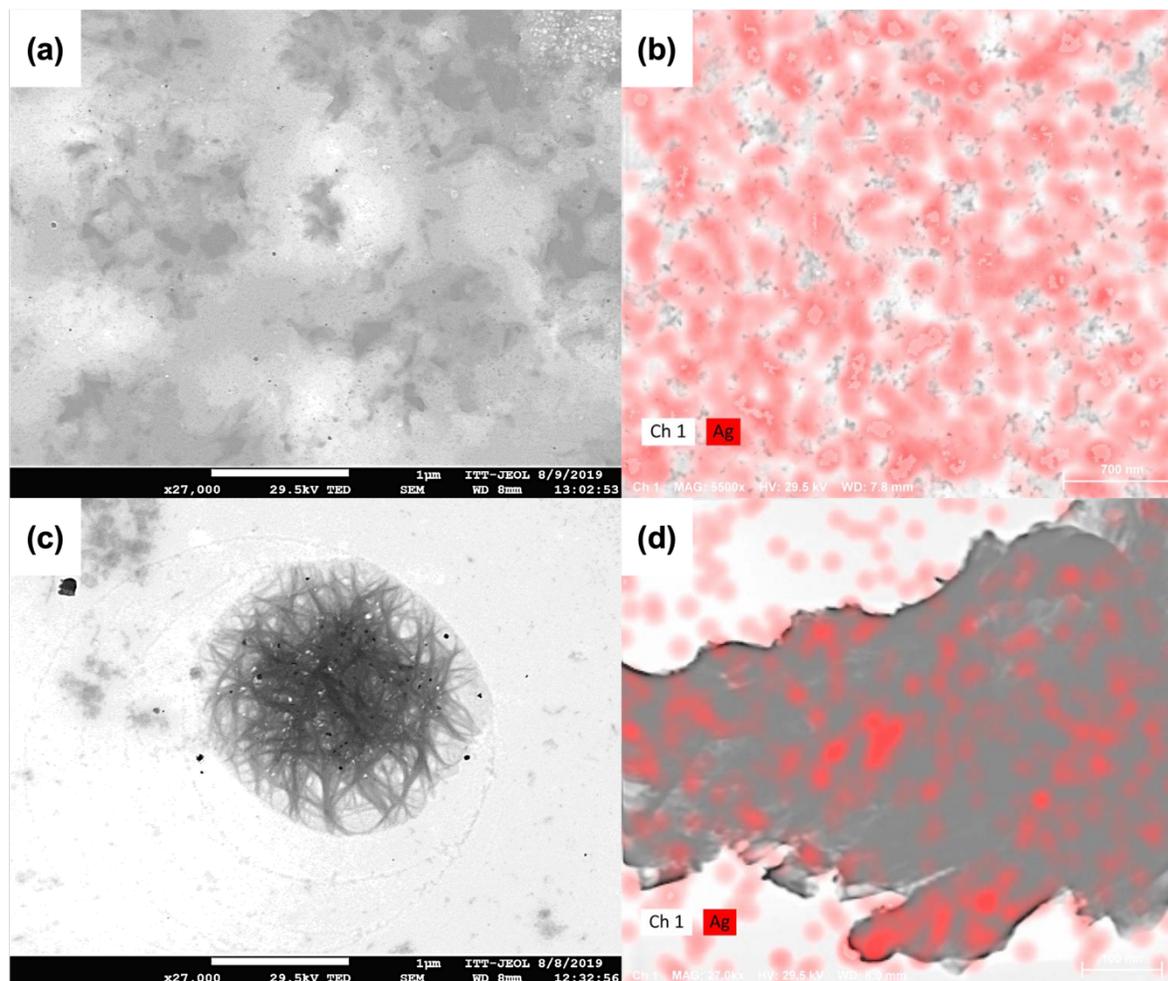


Figura 14. Micrografías FE-SEM de (a) NPs Ag- κ CA y (c) NPs Ag-CH. (b) y (d) Mapa de distribución de Ag por EDX correspondiente a cada sistema.

A partir de los datos obtenidos de las micrografías FE-SEM se obtuvieron los histogramas de tamaños correspondientes a cada imagen. Los histogramas reflejaron valores de diámetro inferiores a 100 nm en ambos casos. Como se observa en la fig. 15-a, la mayor población de NPs Ag- κ CA fue entre 5 y 10 nm de diámetro, mientras que la población más abundante correspondiente a las NPs Ag-CH reflejó un diámetro máximo entre 20 y 30 nm (fig. 15-b).

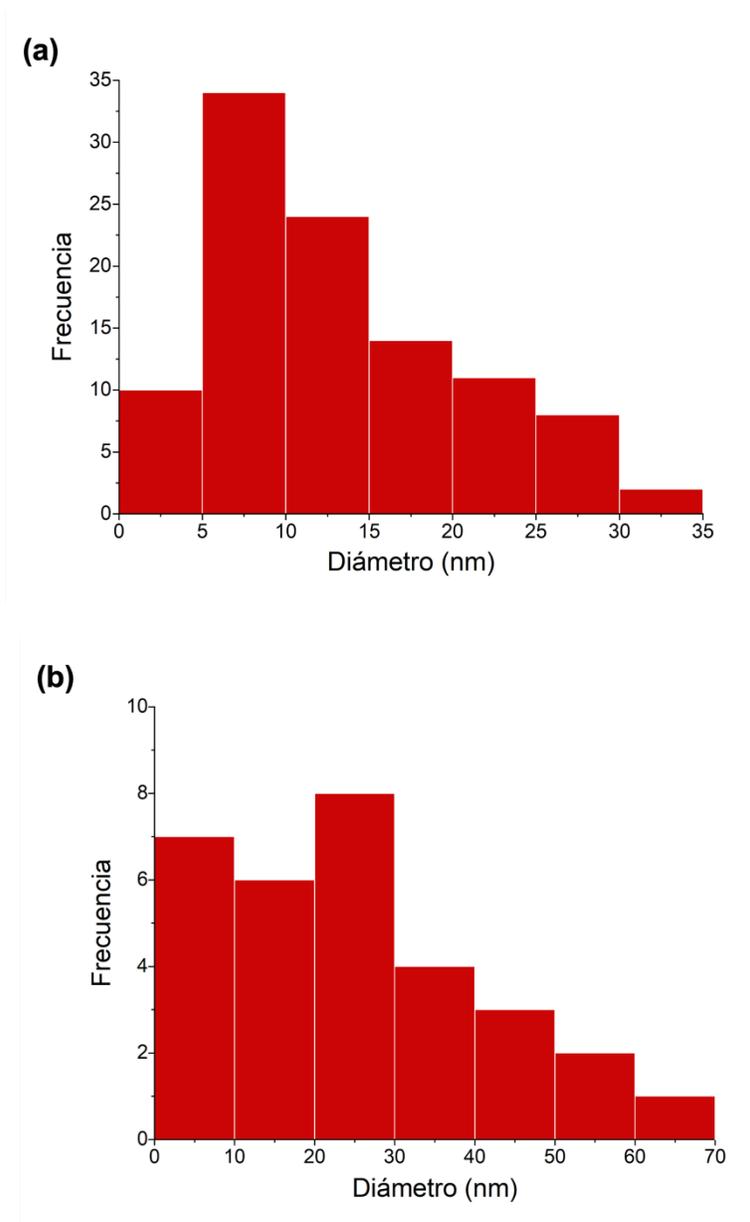


Figura 15. Histogramas de tamaños de (a) NPs Ag- κ CA y (b) NPs Ag-CH.

De acuerdo con resultados encontrados en la literatura, la obtención de NPs Ag utilizando polisacáridos demuestra estabilidad con el tiempo, esto se atribuye a la gran

abundancia de grupos funcionales en la superficie de la matriz polimérica que, al actuar como estabilizantes en el proceso de síntesis de las NPs Ag, disminuyen la energía de superficie del sistema y previene la aglomeración futura del mismo.^{37,38}

Cabe destacar que las NPs Ag-polisacárido fueron almacenadas por varios meses a TA y no hubo cambios aparentes en sus características organolépticas, a saber: no se observó la formación de precipitados ni hubo cambio en la coloración de las soluciones.

6.2.5. Ensayos preliminares de inhibición bacteriana

Los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición bacteriana mostraron un aumento de la inhibición de crecimiento bacteriano directamente proporcional al aumento de concentración de NPs Ag-CH en el medio de cultivo. En la fig. 16 se observa, de arriba hacia abajo, la concentración de NPs Ag-polisacárido mínima (4.99 mg/mL); seguido del grupo con concentración de NPs Ag-polisacárido media (8.44 mg/mL); y finalmente, el grupo con concentración de NPs Ag-polisacárido máxima (11.67 mg/mL). Cada serie de grupos de tubos de ensayo se observa al inicio ($t= 0$ h) y al final ($t= 24$ h) del experimento realizado. La turbidez y el precipitado que se observan en los tubos de MBNP1, MBNP2, MBNP3 y sus réplicas a $t=0$ h, se deben a la presencia de polisacárido en la solución añadida de NPs Ag-CH.

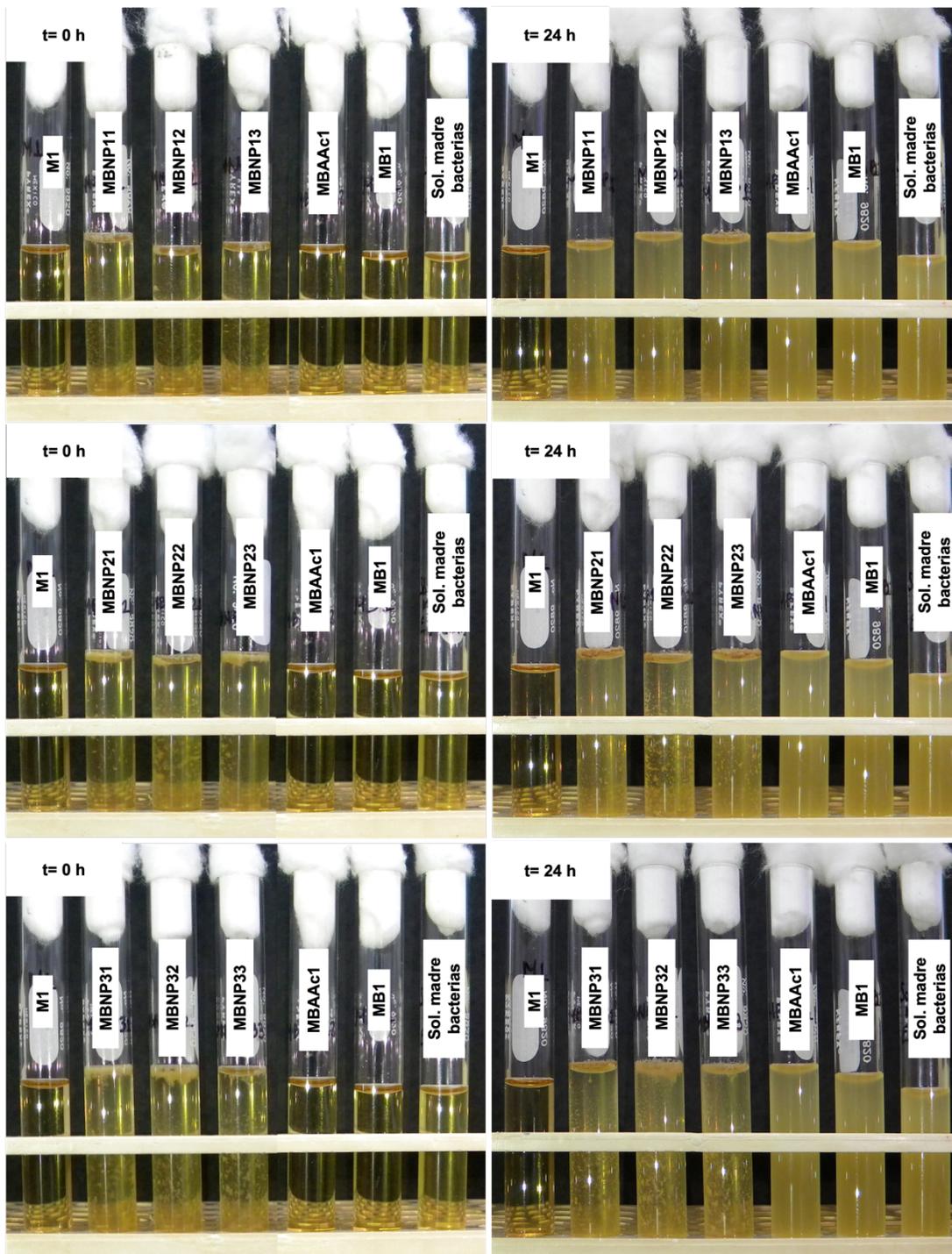


Figura 16. Ensayos de inhibición en caldo a diferentes concentraciones de NPs Ag-CH.

Para descartar el posible efecto del disolvente en la inhibición bacteriana, se comparó la apariencia del tubo con AAc al 0.1% (disolvente) con la de los tubos que contenían las tres concentraciones de NPs Ag-CH, a las 24 h del sembrado de la bacteria. Se observó una solución turbia en el tubo de AAc al 0.1%, atribuida a la presencia de bacterias en el medio, descartando su efecto en la inhibición.

En la fig. 17 se observa que el porcentaje de inhibición de la solución de AAc fue mínima (4.07%), en comparación con la presentada por las tres concentraciones de NPs Ag-CH, las cuales mostraron valores de inhibición arriba del 50%, confirmando la actividad antibacteriana que caracteriza a las NPs Ag.

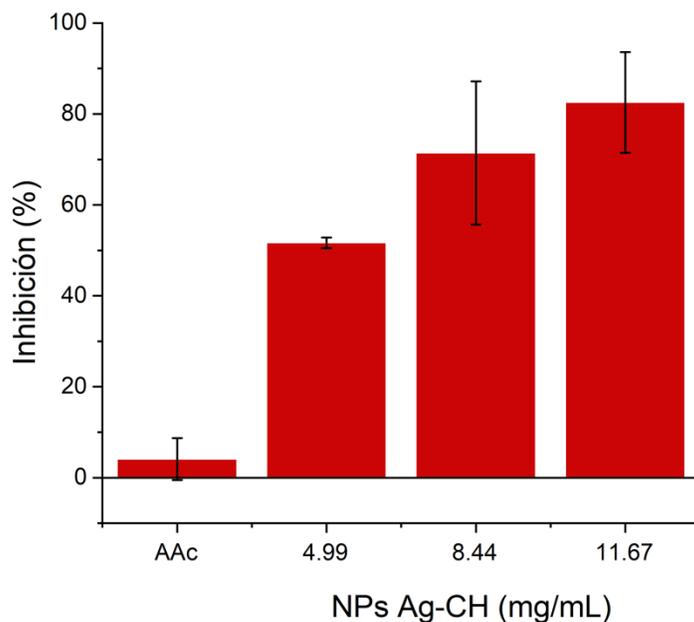


Figura 17. Porcentajes de inhibición bacteriana de AAc y NPs Ag-CH con diferentes concentraciones, $t=24$ h.

6.3. Preparación de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

Se obtuvieron dos sistemas de membrana de red simple cargadas con NPs Ag (previamente sintetizadas), a partir de los polisacáridos κ CA y CH, con tres variaciones en la proporción de polisacárido nativo y NPs Ag por sistema (tabla 3). Cada membrana contiene 100 mg/3 mL de solvente totales de material con las diferentes proporciones que se mencionan anteriormente. Como se mencionó en la sección experimental, las membranas de κ CA y CH fueron reticuladas iónicamente con KCl y TPP, respectivamente.

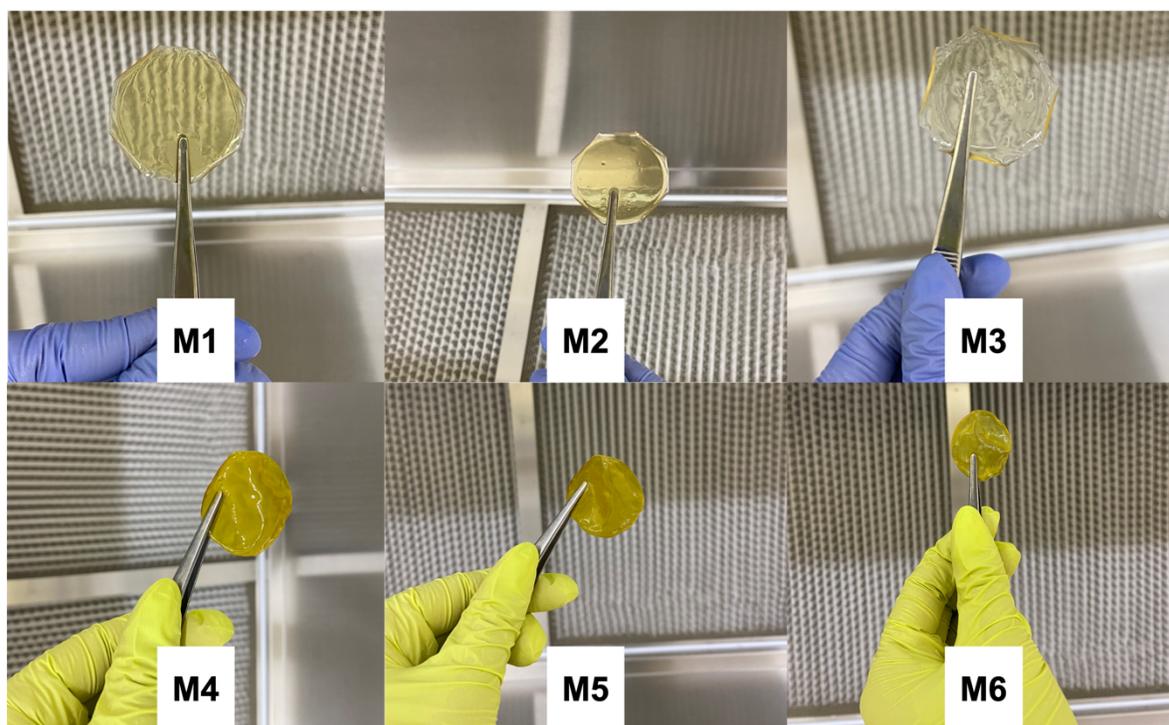


Figura 18. Membranas de κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3) y CH/NPs Ag-CH (M4-M6).

En la fig. 18 se aprecia una diferencia en la intensidad del color en cada membrana, asociada con la abundancia de NPs Ag en cada sistema. La reticulación iónica rige la conformación estructural que adoptan las cadenas de polisacáridos y se observa como la diferencia física entre sistemas de membrana. Cabe destacar que durante la manipulación de las membranas se observaron diferencias mecánicas, como elasticidad, y ópticas, como transparencia.

Tabla 3. Proporción de polisacárido/NPs Ag-polisacárido en las membranas.

Membranas κ CA/NPs Ag- κ CA	Membranas CH/NPs Ag-CH
M1 (3:1)	M4 (3:1)
M2 (1:1)	M5 (1:1)
M3 (1:3)	M6 (1:3)

6.4. Caracterización de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

6.4.1. FT-IR

Las membranas fueron caracterizadas por FT-IR para identificar los grupos funcionales de los polisacáridos empleados en la preparación de las NPs Ag y membranas. En la fig. 19 se presenta el espectro de κ CA nativa y de las membranas κ CA/NPs Ag- κ CA con diferentes proporciones de κ CA nativa y NPs Ag- κ CA. En dicha figura se muestran los cuatros espectros una banda ancha con un máximo en 3371 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento O-H de los grupos hidroxilo que presenta la κ CA en su estructura. En 1636 cm^{-1} se observa la aparición de una banda correspondiente

al estiramiento asimétrico de carbonilo (C=O) que se forma por la oxidación de alcoholes causada por la formación de NPs Ag- κ CA; la señal en 1240 cm^{-1} , corresponde al estiramiento de los enlaces éster-sulfato de la unidad *D*-galactosa. La banda en 1044 cm^{-1} se asigna al estiramiento correspondiente al enlace glucosídico que une las dos unidades que conforman a la κ CA; la señal 915 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-O-C de la 3,6-anhidro-*D*-galactosa y en 844 cm^{-1} aparece la banda correspondiente al estiramiento C-O-S de la *D*-galactosa.^{31,39}

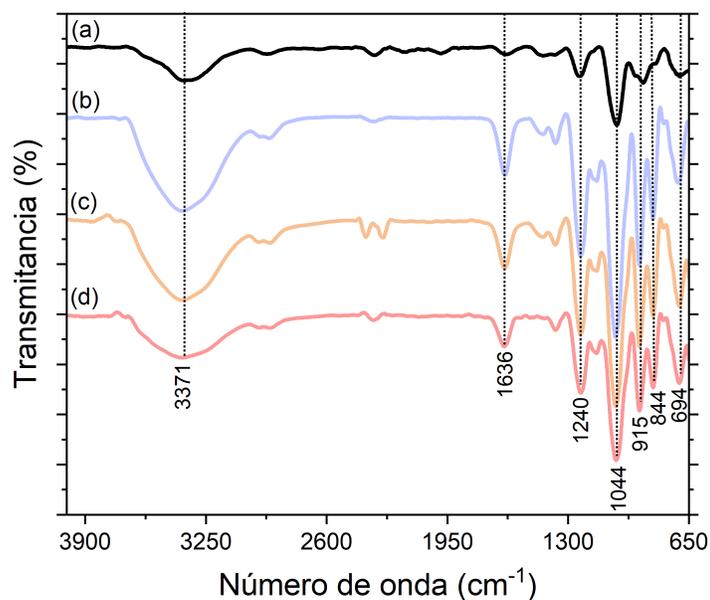


Figura 19. Espectro FT-IR de (a) κ CA nativo y de las membranas (b) M1, (c) M2 y (d) M3.

La disminución en la intensidad de las bandas en ambas figuras (fig. 19 y 20), a mayor concentración de NPs Ag en las membranas, se atribuye a la interacción de

los grupos funcionales con átomos electronegativos de la estructura de la κ CA y del CH con la superficie positiva de las NPs Ag, a través de interacciones de Van der Waals.

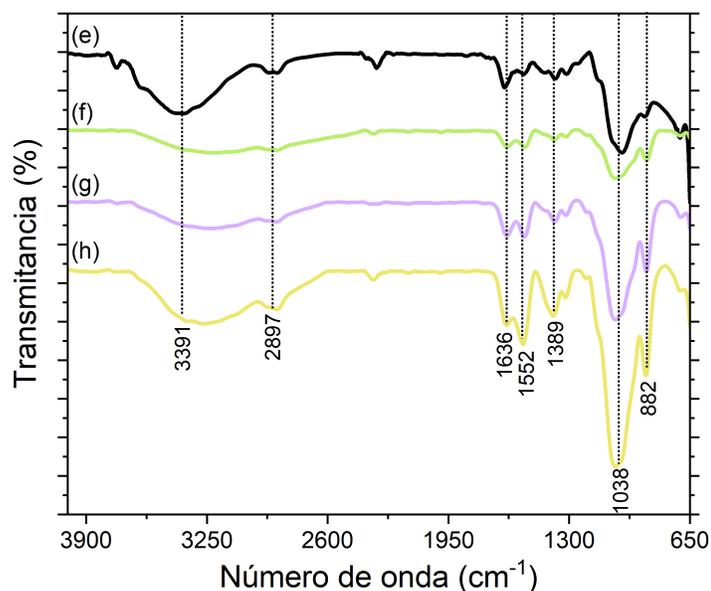


Figura 20. Espectro FT-IR de (e) CH nativo y de las membranas (f) M4, (g) M5 y (h) M6.

En los espectros de FT-IR de CH nativo y las membranas CH/NPs Ag-CH (M4-M6) (fig. 20) se observó una banda de absorción ancha, entre 3700 y 2900 cm^{-1} , que se asignó a bandas traslapadas correspondientes a los grupos hidroxilo (-OH) y amina (-NH₂) de la estructura del CH. La señal en 2987 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-H, las bandas en 1636 y en 1552 cm^{-1} se atribuyen a los estiramientos correspondientes a los enlaces C=O y N-H, de la amida correspondiente a la unidad

acetilada del CH, respectivamente. La banda de absorción en 1038 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-O-C del enlace glucosídico.^{7,13}

6.4.2. AFM

Se observó la topografía de las membranas con mayor proporción de NPs Ag.

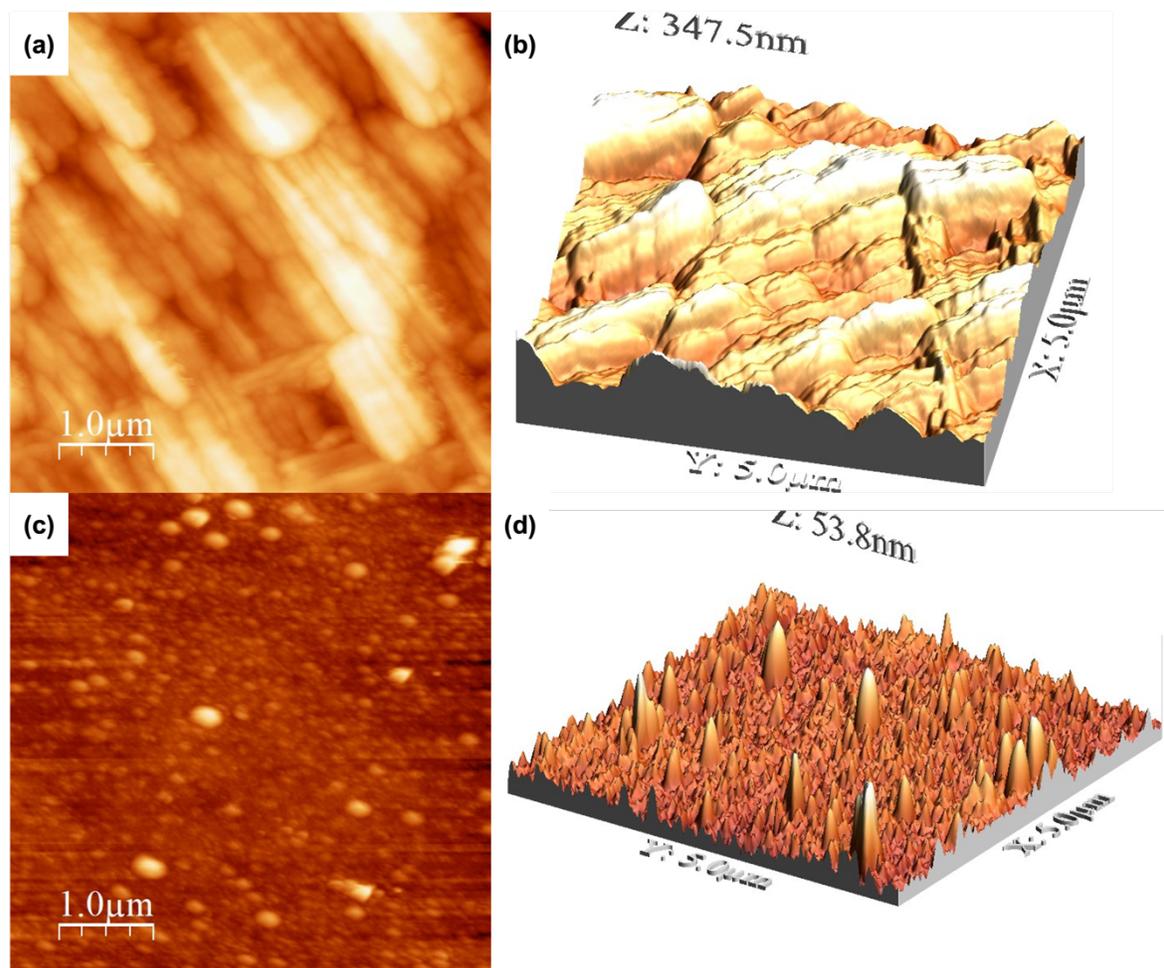


Figura 21. (a) y (c) Micrografías AFM de membranas M3 y M6, con sus respectivos perfiles topográficos(b) y (d).

En las micrográficas se pueden observar las NPs contenidas en la membrana polimérica. Las NPs Ag-polisacárido aparecen como los puntos altos en la medición, esto se puede observar de manera más sencilla en los perfiles topográficos (fig. 21b y 21d).

Aunque a simple vista la membrana con κ CA/NPs Ag- κ CA (M3) parece ser más lisa, en el estudio de la topografía se observa que su valor máximo en el eje Z es mucho más elevado que el obtenido de la membrana con CH/NPs Ag-CH. De aquí se concluye que la membrana de κ CA/NPs Ag- κ CA es casi 7 veces más rugosa que la membrana de CH/NPs Ag-CH. Este resultado no afecta en la aplicación que se le pretende dar a las membranas porque como apósito solo tendría que adherirse a la superficie de la piel; sin embargo, las membranas rugosas se sugieren como materiales prometedores que actúen como andamios celulares lo cual sería también una aplicación potencial para las membranas obtenidas.

6.5. Evaluación mecánica de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

La evaluación mecánica de las membranas, en los dos ensayos mecánicos realizados (punción y tensión), mostró una tendencia de incremento en la resistencia a la fractura con el aumento en la proporción NPs Ag-polisacárido en los sistemas. Estos resultados indican el surgimiento de un efecto reforzante en las membranas por la presencia de NPs Ag en su estructura. Además, esto sugiere una buena interacción entre la matriz polimérica y las NPs Ag.

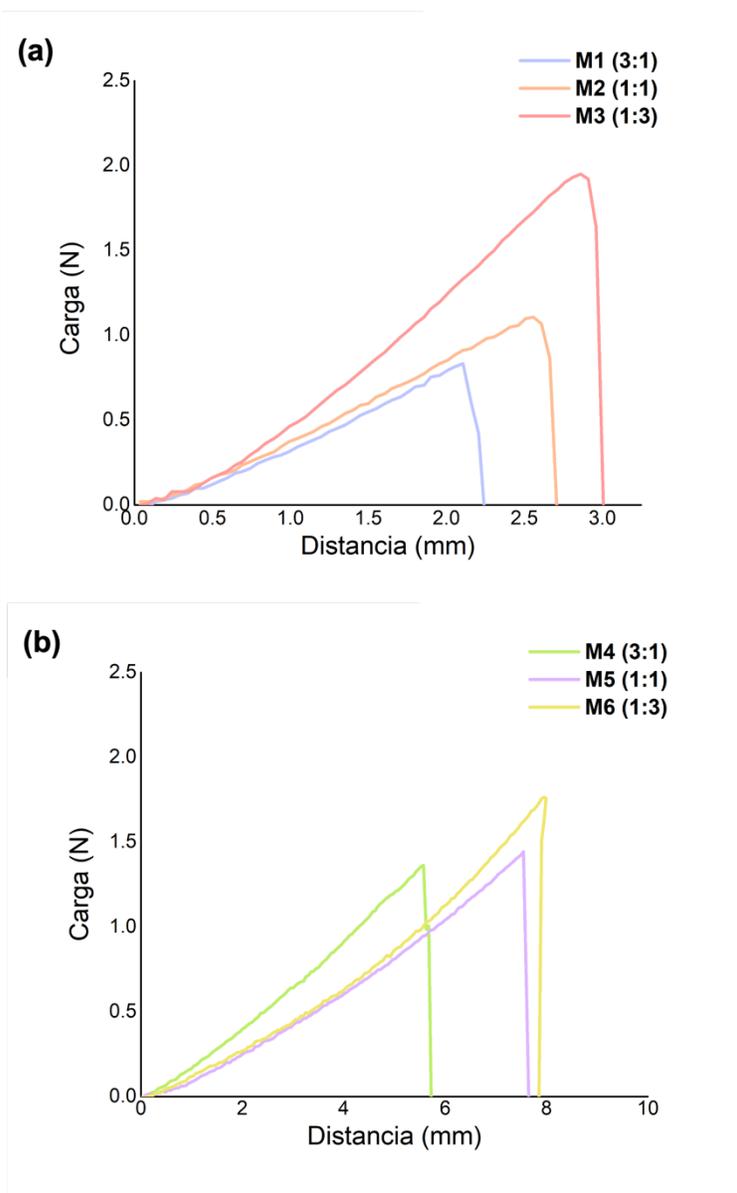


Figura 22. Curvas de carga vs distancia correspondientes a ensayos de punción de membranas (a) κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3) y (b) CH/NPs Ag-CH (M4-M6).

En las curvas obtenidas de los ensayos de punción (fig. 22) se puede observar que hay una diferencia significativa en la resistencia de la membrana con mayor cantidad de NPs Ag (proporción 3:1). A partir del análisis de estas curvas se obtuvieron las propiedades mecánicas de punción de las membranas, específicamente el módulo elástico y la fuerza en el punto de fractura, cuyos valores se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades de punción de las membranas obtenidas (M1-M6): módulo elástico (E) y fuerza de punción en la fractura (PS). En rojo se resaltan los sistemas que obtuvieron los valores más altos de E y PS, correspondientes a las membranas con mayor proporción de NPs Ag-polisacárido (M3 y M6).

Membranas κ CA/NPs Ag- κ CA			Membranas CH/NPs Ag-CH		
	E (MPa)	PS (MPa)		E (MPa)	PS (MPa)
M1 (3:1)	50.63	2.499	M4 (3:1)	6498.7	4.086
M2 (1:1)	105.72	5.190	M5 (1:1)	6507.8	4.593
M3 (1:3)	323.96	16.006	M6 (1:3)	13986.4	6.390

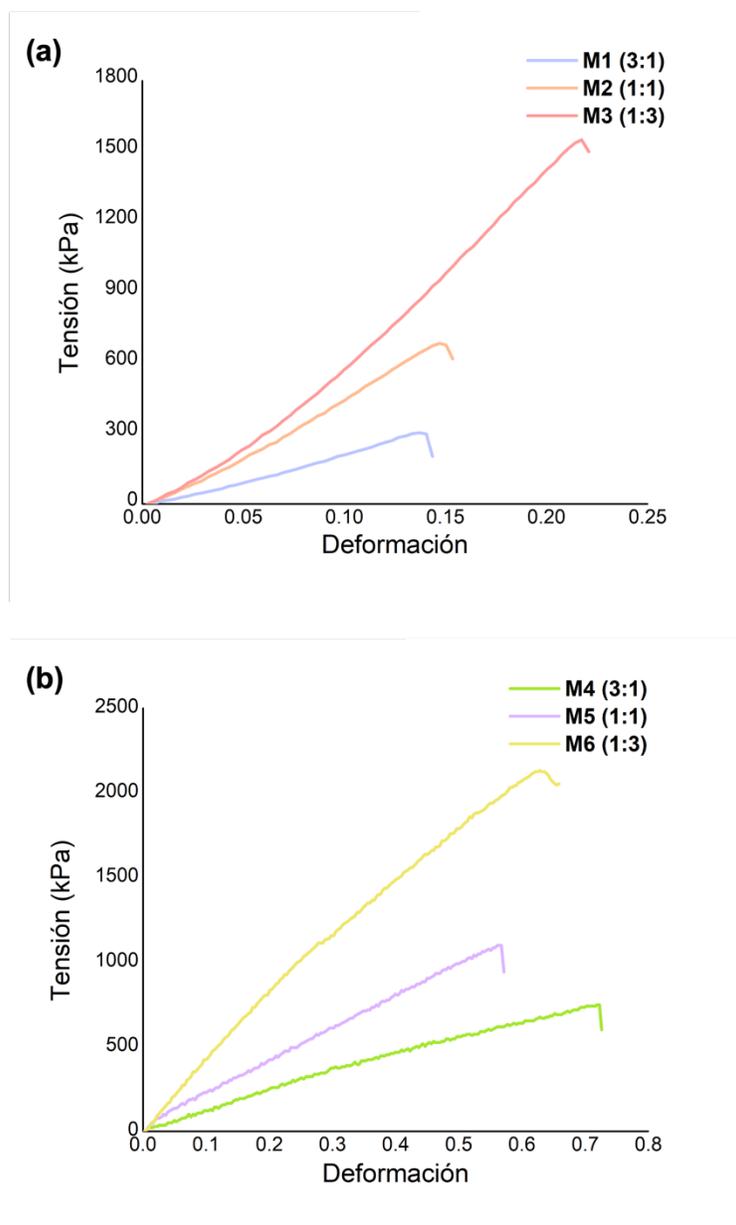


Figura 23. Curvas de tensión vs deformación correspondientes a ensayos de tensión de membranas (a) κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3) y (b) CH/NPs Ag-CH (M4-M6).

El módulo elástico (E) y la fuerza en la fractura (PS) se obtuvieron empleando las siguientes ecuaciones, respectivamente:

$$E = \frac{m}{16w} \left(\frac{L}{h}\right)^3 \quad (2)$$

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

donde m , L , w , h y F_B representan la pendiente de la curva de carga-desplazamiento en la región elástica, la longitud, la anchura y espesor de la membrana y la carga de fractura registrada, respectivamente.

Muy similar a este comportamiento, se observó la misma tendencia en los ensayos de tensión. Como se puede observar en las curvas de tensión contra deformación (fig. 23), hubo una mayor resistencia a la fractura en la membrana que contiene mayor proporción de NPs Ag en su composición.

De las curvas del ensayo de tensión se obtuvieron también el módulo elástico y la fuerza de tensión en la fractura, observando los valores más altos en las membranas M3 y M6 (tabla 3).

Las membranas de κ CA/NPs Ag- κ CA mostraron una mayor resistencia a la fractura en ambos ensayos, en comparación con las que se prepararon con CH. Esto se atribuye a que durante la formación de geles la κ CA adopta estructuras con dobles

hélices, por la formación de enlaces de hidrógeno, lo que genera una mayor estabilidad estructural.

Tabla 5. Propiedades de tensión de las membranas obtenidas (M1-M6): módulo elástico (E) y fuerza de tensión en la fractura (s_F). En rojo se resaltan los sistemas que obtuvieron los valores más altos de E y PS, correspondientes a las membranas con mayor proporción de NPs Ag-polisacárido (M3 y M6).

Membranas κ CA/NPs Ag- κ CA			Membranas CH/NPs Ag-CH		
	E (kPa)	s_F (kPa)		E (kPa)	s_F (kPa)
M1 (3:1)	2301.5	303.0	M4 (3:1)	1232.6	961.9
M2 (1:1)	4809.3	682.2	M5 (1:1)	1950.5	1263.5
M3 (1:3)	7497.6	1548.7	M6 (1:3)	4088.9	2297.0

Ambos sistemas presentan resistencia mecánica favorable en los dos ensayos realizados. Debido al comportamiento anisotrópico y viscoelástico de la piel, su módulo elástico puede variar desde los 5 kPa hasta los 140 MPa.³⁵ Tomando en cuenta estos valores, las membranas se destacan como viables y resistentes para su aplicación externa como apósitos de heridas en la piel.

6.6. Pruebas de hinchamiento de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

Los xerogeles se sumergieron en PBS para evaluar su capacidad de hinchamiento en condiciones fisiológicas simuladas. Los sistemas mantuvieron su integridad durante las 12 h del experimento (fig. 24a y 25a).

Los dos sistemas de membrana (a base de κ CA y CH), en sus tres variaciones de la proporción y NPs Ag-polisacárido, alcanzaron el equilibrio en un periodo corto de tiempo: en ca. 1 h después de empezar el experimento. Como se observa en los gráficos de hinchamiento de cada uno de los sistemas (fig. 24a y 25a), hay una diferencia de un orden de magnitud en el hinchamiento de equilibrio de ambos sistemas. Este comportamiento se atribuye a naturaleza de cada polímero en relación con la reticulación iónica.

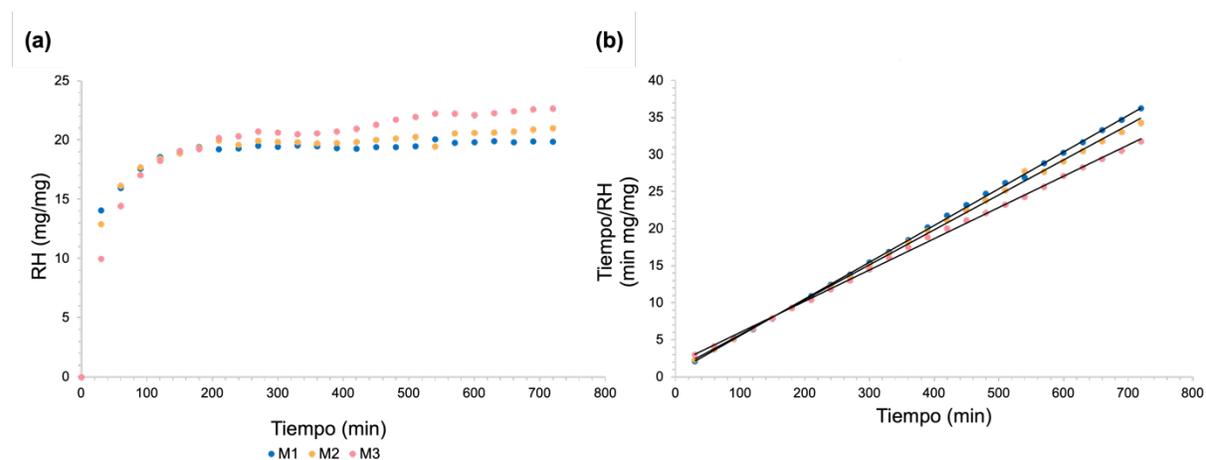


Figura 24. (a) Isotherma de hinchamiento y (b) cinética de hinchamiento de membranas de κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3).

Un punto importante a destacar es el comportamiento de las membranas con relación a la cantidad de NPs Ag en su estructura y su capacidad de hinchamiento. Como se mencionó anteriormente, durante la formación de geles, la κ CA tiende a adquirir una estructura tridimensional con la aparición de dobles hélices dejando expuestos los grupos sulfato. Durante la reticulación con iones (K^+), los grupos sulfato dejan de repelerse dejando espacios para la entrada de solvente en la estructura de la membrana. Sin embargo, el comportamiento con el CH es distinto, cuando se entrecruzaron con TPP sigue estando la estructura lineal en las cadenas de polímero y ya existen espacios ocupados por las NPs Ag, por lo que la presencia de iones solo provocará que queden menos espacios disponibles para el futuro almacenamiento de solvente en la estructura interna de la membrana, es así que a mayor concentración de NPs Ag, menor cantidad de espacios disponibles tendrá ésta para poder hinchar.^{31,40}

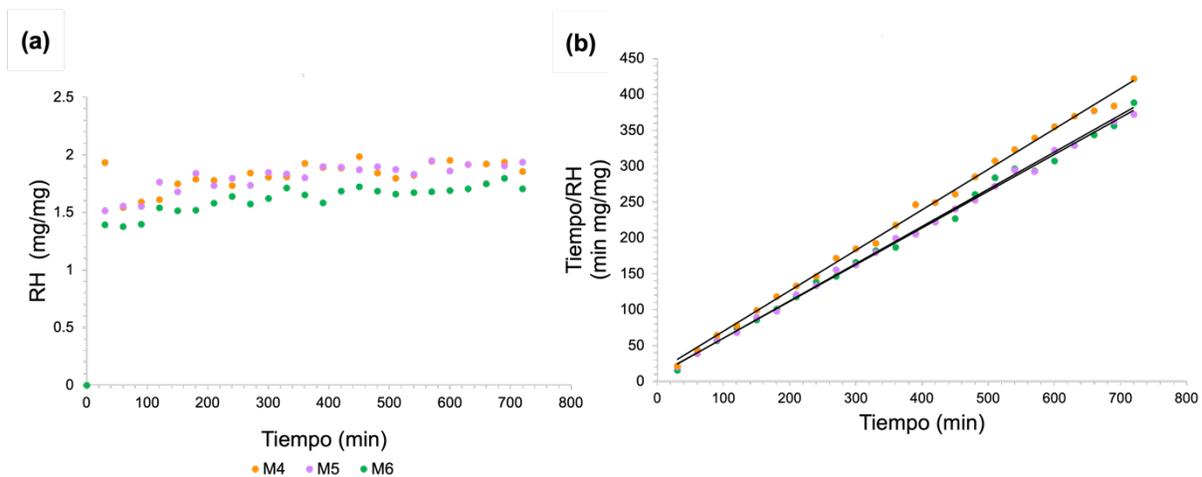


Figura 25. (a) Isotherma de hinchamiento y (b) cinética de hinchamiento de membranas de CH/NPs Ag-CH (M4-M6).

Para tener una mayor comprensión del fenómeno de hinchamiento que se presentó en cada sistema, los valores se ajustaron a un modelo cinético de segundo orden de Schott, representado de la siguiente manera:

$$\frac{t}{RH_t} = \frac{1}{k_{is}} + \frac{1}{RH_{\infty t}}(t) \quad (4)$$

donde RH_t (mg/mg) es la relación de hinchamiento a un tiempo t (min), $RH_{\infty t}$ (mg/mg) es el máximo teórico o la relación de hinchamiento en el equilibrio y k_{is} es la constante de velocidad de hinchamiento inicial.³²

Basado en los datos experimentales, el recíproco del promedio de hinchamiento (t/RH) y del tiempo de hinchamiento (t) dan como resultado la obtención de líneas rectas con buenos coeficientes de correlación lineal (ca. 0.99), para ambos sistemas,

como se observa en las fig. 24b y 25b. Esto indica que el hinchamiento de las membranas sigue un modelo cinético de segundo orden de Schott.

Los parámetros cinéticos (RH_{oct} y k_{is}) se determinaron mediante las pendientes e interceptos obtenidos de las líneas rectas. Los resultados obtenidos se enlistan en la Tabla 6.

Estos parámetros cinéticos se relacionan con ciertas propiedades y/o características de las membranas como la porosidad, balance hidrofóbico/hidrofílico, grado de entrecruzamiento, rigidez/flexibilidad estructural, por mencionar algunos. Además, se ha demostrado que la presencia de NPs Ag en la membrana comúnmente causa un incremento en RH_{oct} .³²

Tabla 6. Parámetros de hinchamiento de las membranas M1-M6.

RH_{oct} (mg/mg)			k_{is} (mg/mg·min)		
	Membranas κ CA/Ag- κ CA NPs	Membranas CH/Ag-CH NPs		Membranas κ CA/Ag- κ CA NPs	Membranas CH/Ag-CH NPs
(3:1)	20.202	1.774	(3:1)	1.630	0.075
(1:1)	21.186	1.928	(1:1)	1.026	0.121
(1:3)	23.696	1.952	(1:3)	0.564	0.112

El modelo cinético de Schott es utilizado con éxito para describir el comportamiento de hinchamiento de hidrogeles y membranas de polisacáridos con

grados de hinchamiento altos, donde el volumen de captación puede permanecer variable en el tiempo durante el proceso de hinchamiento.

Este modelo también indica que, en el caso de estos sistemas, el hinchamiento no se rige por la difusión de fluido hacia el interior de la membrana, si no por la relajación de las cadenas de polisacáridos que permite la entrada del solvente.³⁶

Estos resultados permiten comprender el comportamiento que tendrán las membranas en presencia de fluidos biológicos, como los exudados, que puede producir una herida. En este sentido, es importante conocer la capacidad de hinchamiento de los sistemas para tener una idea del volumen de fluido que puede permanecer en su interior.

Haciendo una comparación de los resultados obtenidos en las pruebas mecánicas de punción y tensión, podemos observar que las membranas M4-M6 tienen mayor resistencia a la fuerza aplicada en los ensayos mecánicos y una menor capacidad de captación de solvente en su estructura interna como se muestra en las pruebas de hinchamiento. A partir de esto, se puede concluir que hay una mayor compactación en las cadenas de CH en las membranas lo que le provee una mayor resistencia mecánica que a su vez resulta en menor hinchamiento por la falta de espacios disponibles.

6.7. Pruebas de degradación enzimática

Los resultados de degradación enzimática con lisozima mostraron resultados valiosos en ambos casos (fig. 26).

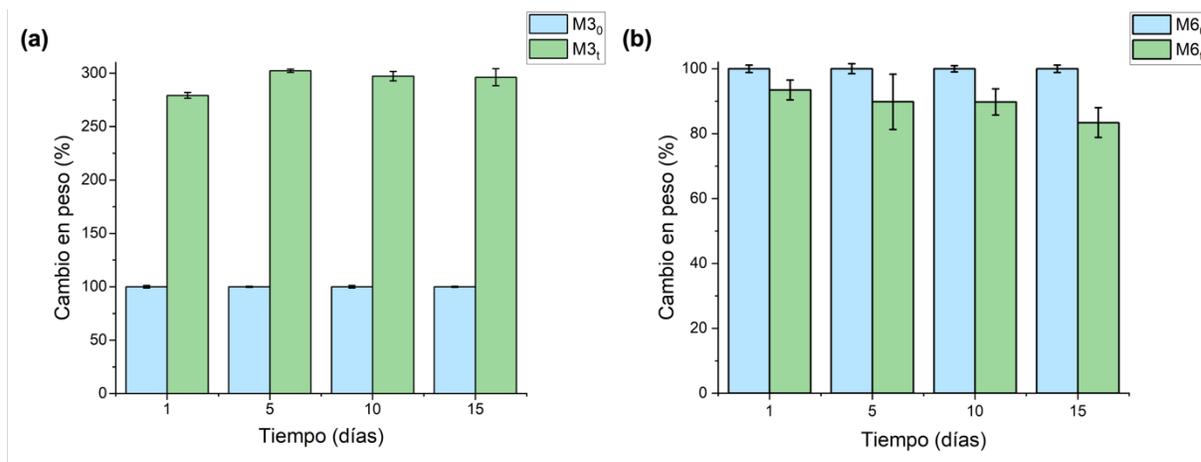


Figura 26. Gráficas de degradación enzimática con lisozima de membranas (a) M3 y (b) M6 a 1, 5, 10 y 15 días.

De primera instancia se observó que las membranas M3 de κ CA/NPs Ag- κ Ca (fig. 26a) aumentaron su peso casi tres veces su peso inicial, resultado contrario a lo que se esperaba. En la literatura se encontró que esta enzima tiende a formar complejos con polisacáridos sulfatados. Debido a que esta enzima cataliza la hidrólisis de las uniones *N*-acetil-*D*-glucosamina, la ausencia de estos enlaces en la κ CA inhibe la actividad catalítica de la enzima, por lo que se propone que la lisozima se une a los grupos sulfato de la κ CA que quedan libres en la periferia de la membrana y forma complejos supramoleculares estables.³⁷

En cambio, las pruebas de degradación enzimática de las membranas M6 de CH/NPs Ag-CH (fig. 26b) mostraron una pérdida en peso continua con respecto al tiempo. El porcentaje de degradación al día 15 fue de *ca.* 17%, esto demuestra que las membranas son viables como apósitos de heridas, ya que pueden permanecer en sistemas con condiciones biológicas y en presencia de enzimas sin alcanzar ni el 50% de degradación, en al menos 15 días.

6.8. Pruebas de citocompatibilidad de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido

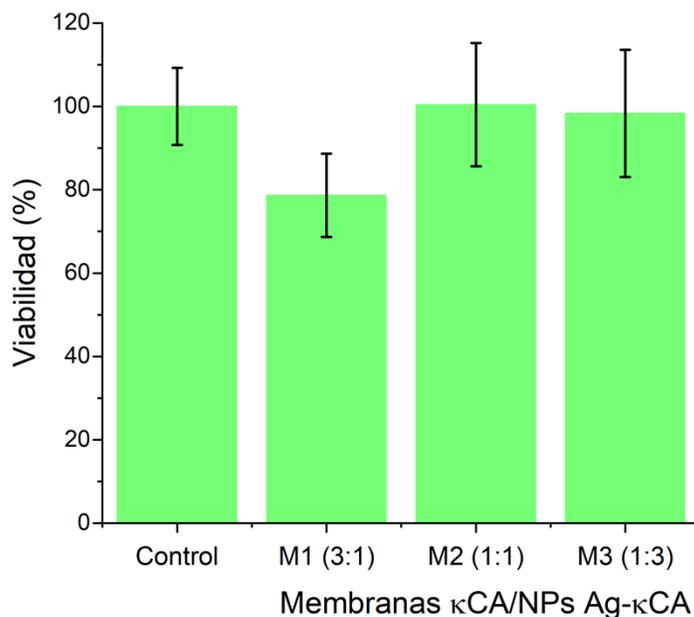


Figura 27. Viabilidad celular de membranas de κ CA/NPs Ag- κ CA (M1-M3).

Los resultados de los ensayos de citocompatibilidad reflejaron sistemas altamente biocompatibles con potenciales aplicaciones en sistemas biológicos.

De primera instancia se puede observar que los porcentajes obtenidos de ambos sistemas, en su mayoría, se encuentran arriba del 80% de viabilidad celular en presencia de los lixiviados de membrana. En el caso de las membranas con CH y NPs Ag-CH se puede observar porcentajes iguales, e incluso mayores, que el control negativo (fig. 28).

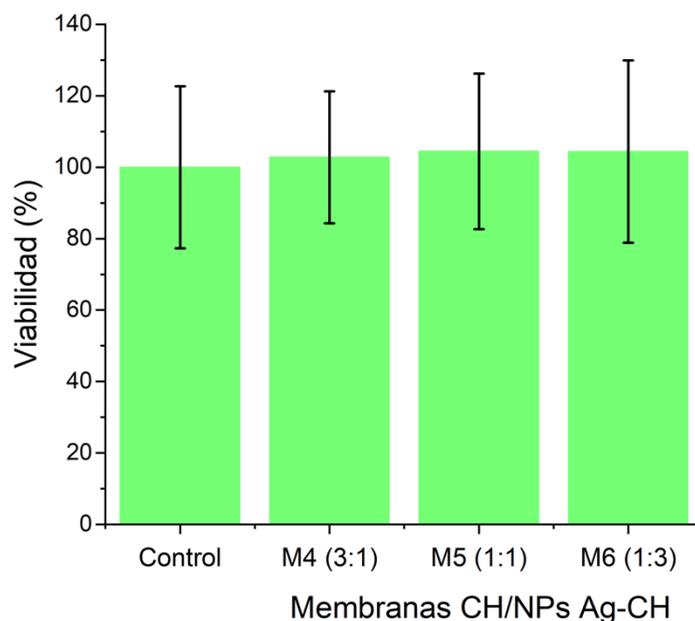


Figura 28. Viabilidad celular de membranas de CH/NPs Ag-CH (M4-M6).

En la fig. 29 se muestran las micrografías ópticas de las células adheridas a las placas de cultivo, después de su exposición a los lixiviados de membrana y su posterior tinción con cristal violeta.

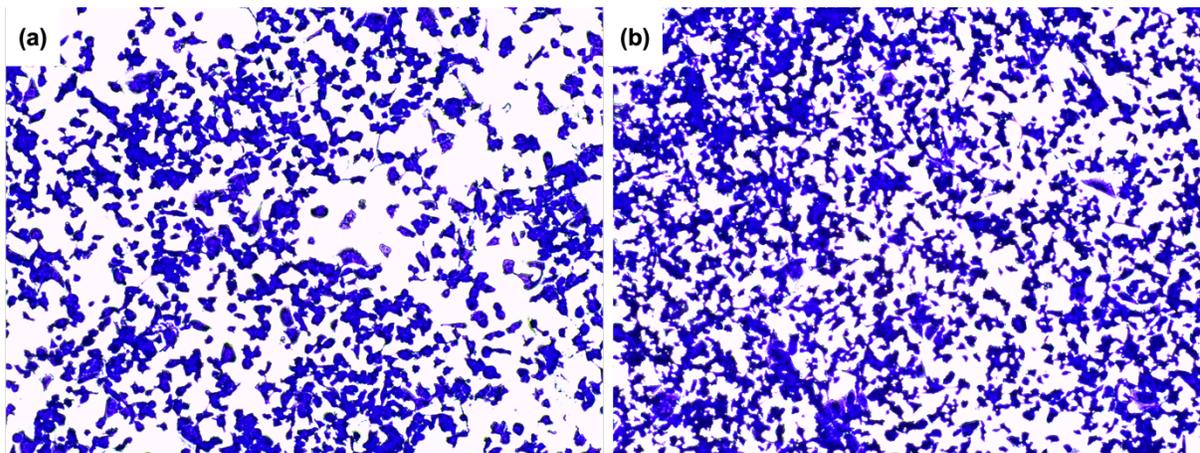


Figura 29. Micrografías ópticas de células fijadas y teñidas 24 h después de estar en presencia de los lixiviados de membrana (a) M3 y (b) M6.

La línea celular que se utilizó es de células adherentes, es decir que toda la población celular que se observa en las micrografías corresponde a células vivas que proliferaron en presencia de los compuestos evaluados (Anexo 7 y 8).

6.9. Pruebas de biocompatibilidad de membranas de polisacárido/NPs Ag-polisacárido en modelos animales

Se realizaron pruebas preliminares con modelos animales para evaluar la biocompatibilidad de las membranas M3 y M6 por ensayos de implantación *in vivo* en modelos animales.

En la fig. 30b y 30c se observan las membranas M3 y M6 implantadas en los modelos animales a un tiempo (t). En relación con el control, se puede destacar que en los especímenes con implantes de membrana M3 (κ CA/NPs Ag- κ CA) (fig. 30b) no se observa irritación del tejido o inflamación notable. En cambio, en los animales sometidos a implantación de la membrana M6 (CH/NPs Ag-CH) se observa la formación de tejido fibroso alrededor de la membrana e inflamación del tejido circundante como consecuencia de la respuesta inmunológica del cuerpo.

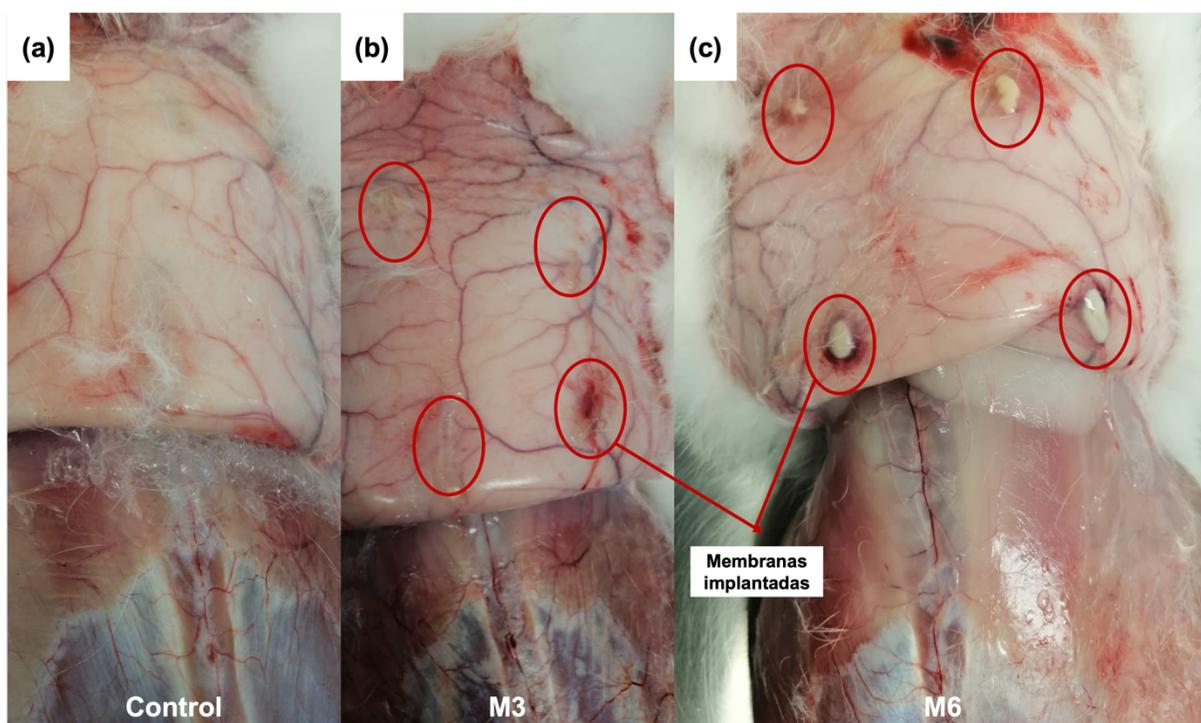


Figura 30. Imágenes de modelo animales de: (a) control sin implante, (b) implante de membrana M3 y (c) implante de membrana M6.

VII. CONCLUSIONES

- El uso de polisacáridos en la síntesis verde de NPs Ag da como resultado sistemas estables y con morfología esférica bien definida.
- El entrecruzamiento iónico de las membranas garantiza una estructura estable y confiere resistencia contra la disolución.
- Además, el cargado de NPs Ag a las membranas incrementa su densidad de reticulación, lo que resulta en un efecto mecánico reforzante.
- Se validó a las membranas como citocompatibles durante el periodo de observación (48 h).
- Los ensayos preliminares con modelos animales demostraron propiedades biocompatibles altas en las membranas M3, ya que cumplen con valores dentro del intervalo de referencia del experimento *in vivo*.
- La combinación de las propiedades de los polisacáridos y las NPs Ag sugieren a estos sistemas nanoestructurados como herramientas muy prometedoras para el tratamiento de lesiones tisulares.

VIII. REFERENCIAS

- (1) Natarajan, S.; Williamson, D.; Stiltz, A. J.; Harding, K. Advances in Wound Care and Healing Technology. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2000**, *1* (5), 269–275.
<https://doi.org/10.2165/00128071-200001050-00002>.
- (2) Rivera, A. E.; Spencer, J. M. Clinical Aspects of Full-Thickness Wound Healing. *Clin. Dermatol.* **2007**, *25* (1), 39–48.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.10.001>.
- (3) Attinger, C. E.; Janis, J. E.; Steinberg, J.; Schwartz, J.; Al-Attar, A.; Couch, K. Clinical Approach to Wounds: Débridement and Wound Bed Preparation Including the Use of Dressings and Wound-Healing Adjuvants. *Plast. Reconstr. Surg.* **2006**, *117* (7 Suppl), 72S-109S.
<https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225470.42514.8f>.
- (4) Vanwijck, R. [Surgical biology of wound healing]. *Bulletin et memoires de l'Academie royale de medecine de Belgique*. Belgium 2001, pp 175–184; discussion 185.
- (5) Broughton, G. 2nd; Janis, J. E.; Attinger, C. E. Wound Healing: An Overview. *Plast. Reconstr. Surg.* **2006**, *117* (7 Suppl), 1e-S-32e-S.
<https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9>.
- (6) Young, A.; McNaught, C.-E. The Physiology of Wound Healing. *Surg.* **2011**, *29* (10), 475–479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.011>.
- (7) Radhakumary, C.; Antonty, M.; Sreenivasan, K. Drug Loaded

- Thermoresponsive and Cytocompatible Chitosan Based Hydrogel as a Potential Wound Dressing. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 83 (2), 705–713.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.042>.
- (8) Gray, D.; White, R. Applied Wound Management. *Wounds UK Appl. Wound Manag. Suppl.* **2004**, 19, 1–35.
- (9) Mogoşanu, G. D.; Grumezescu, A. M. Natural and Synthetic Polymers for Wounds and Burns Dressing. *Int. J. Pharm.* **2014**, 463 (2), 127–136.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015>.
- (10) Emam, H. E.; Ahmed, H. B. Polysaccharides Templates for Assembly of Nanosilver. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 135, 300–307.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.095>.
- (11) Pillai, O.; Panchagnula, R. Polymers in Drug Delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5 (4), 447–451. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00227-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00227-1).
- (12) Zengjie, F.; Liu, B.; Wang, J.; Zhang, S.; Lin, Q.; Gong, P.; Ma, L.; Yang, S. A Novel Wound Dressing Based on Ag/Graphene Polymer Hydrogel: Effectively Kill Bacteria and Accelerate Wound Healing. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24.
<https://doi.org/10.1002/adfm.201304202>.
- (13) Huang, H.; Yuan, Q.; Yang, X. Preparation and Characterization of Metal–Chitosan Nanocomposites. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2004**, 39 (1), 31–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.08.014>.
- (14) Babu, R.; Zhang, J.; Beckman, E. J.; Virji, M.; Pasculle, W. A.; Wells, A. Antimicrobial Activities of Silver Used as a Polymerization Catalyst for a

- Wound-Healing Matrix. *Biomaterials* **2006**, 27 (24), 4304–4314.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.038>.
- (15) Emam, H. E.; Ahmed, H. B. Polysaccharides Templates for Assembly of Nanosilver. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 135, 300–307.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.095>.
- (16) Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M. Nanosilver as a New Generation of Nanoproduct in Biomedical Applications. *Trends Biotechnol.* **2010**, 28 (11), 580–588. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>.
- (17) Nam, G.; Rangasamy, S.; Purushothaman, B.; Song, J. M. The Application of Bactericidal Silver Nanoparticles in Wound Treatment. *Nanomater. Nanotechnol.* **2015**, 5, 23. <https://doi.org/10.5772/60918>.
- (18) Zhang, X.-F.; Liu, Z.-G.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17 (9).
<https://doi.org/10.3390/ijms17091534>.
- (19) Galdiero, S.; Falanga, A.; Vitiello, M.; Cantisani, M.; Marra, V.; Galdiero, M. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Molecules* **2011**, 16 (10), 8894–8918. <https://doi.org/10.3390/molecules16108894>.
- (20) Chakraborty, B.; Pal, R.; Ali, M.; Singh, L. M.; Rahman, D. S.; Ghosh, S. K.; Sengupta, M. Immunomodulatory Properties of Silver Nanoparticles Contribute to Anticancer Strategy for Murine Fibrosarcoma. *Cell. Mol. Immunol.* **2016**, 13 (2), 191–205. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.05>.
- (21) Tian, J.; Wong, K. K. Y.; Ho, C. M.; Lok, C. N.; Yu, W. Y.; Che, C. M.; Chiu, J.

- F.; Tam, P. K. H. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem* **2007**, 2 (1), 129–136.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.200600171>.
- (22) Murali Krishna, I.; Bhagavanth Reddy, G.; Veerabhadram, G.; Madhusudhan, A. Eco-Friendly Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Salmalia Malabarica*: Synthesis, Characterization, Antimicrobial, and Catalytic Activity Studies. *Appl. Nanosci.* **2016**, 6 (5), 681–689. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0479-6>.
- (23) Kim, B.; Rutka, J.; Chan, W. Nanomedicine. *N. Engl. J. Med.* **2010**, 363, 2434–2443. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912273>.
- (24) Vega-Baudrit, J.; Solano-Umaña, V. The New Field of the Nanomedicine. *Int. J. Appl. Sci. Technol.* **2015**, 5, 79.
- (25) Yang, Y.; Chawla, A.; Zhang, J.; Esa, A.; Jang, H. L.; Khademhosseini, A. Chapter 29 - Applications of Nanotechnology for Regenerative Medicine; Healing Tissues at the Nanoscale. In *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*; Atala, A., Lanza, R., Mikos, A. G., Nerem, R., Eds.; Academic Press: Boston, 2019; pp 485–504. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00029-1>.
- (26) Dvir, T.; Timko, B. P.; Kohane, D. S.; Langer, R. Nanotechnological Strategies for Engineering Complex Tissues. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6 (1), 13–22.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2010.246>.
- (27) Liu, X.; Lee, P.; Ho, C.-M.; Lui, V.; Chen, Y.; Che, C.-M.; Tam, P.; Wong, K. Silver Nanoparticles Mediate Differential Responses in Keratinocytes and

- Fibroblasts during Skin Wound Healing. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 468–475.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.200900502>.
- (28) Travan, A.; Pelillo, C.; Donati, I.; Marsich, E.; Benincasa, M.; Scarpa, T.; Semeraro, S.; Turco, G.; Gennaro, R.; Paoletti, S. Non-Cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (6), 1429–1435.
<https://doi.org/10.1021/bm900039x>.
- (29) Prajapati, V. D.; Maheriya, P. M.; Jani, G. K.; Solanki, H. K. RETRACTED: Carrageenan: A Natural Seaweed Polysaccharide and Its Applications. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *105*, 97–112.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.067>.
- (30) Li, L.; Ni, R.; Shao, Y.; Mao, S. Carrageenan and Its Applications in Drug Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *103*, 1–11.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.008>.
- (31) Zepon, K. M.; Marques, M. S.; da Silva Paula, M. M.; Morisso, F. D. P.; Kanis, L. A. Facile, Green and Scalable Method to Produce Carrageenan-Based Hydrogel Containing in Situ Synthesized AgNPs for Application as Wound Dressing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 51–58.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.096>.
- (32) Murugadoss, A.; Chattopadhyay, A. A “green” Chitosan-Silver Nanoparticle Composite as a Heterogeneous as Well as Micro-Heterogeneous Catalyst. *Nanotechnology* **2008**, *19* (1). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/01/015603>.
- (33) Sanyasi, S.; Majhi, R. K.; Kumar, S.; Mishra, M.; Ghosh, A.; Suar, M.; Satyam,

- P. V.; Mohapatra, H.; Goswami, C.; Goswami, L. Polysaccharide-Capped Silver Nanoparticles Inhibit Biofilm Formation and Eliminate Multi-Drug-Resistant Bacteria by Disrupting Bacterial Cytoskeleton with Reduced Cytotoxicity towards Mammalian Cells. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (October 2015), 1–16.
<https://doi.org/10.1038/srep24929>.
- (34) Xie, Y.; Liao, X.; Zhang, J.; Yang, F.; Fan, Z. Novel Chitosan Hydrogels Reinforced by Silver Nanoparticles with Ultrahigh Mechanical and High Antibacterial Properties for Accelerating Wound Healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 119, 402–412.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.060>.
- (35) Elsupikhe, R. F.; Shamel, K.; Ahmad, M. B.; Ibrahim, N. A.; Zainudin, N. Green Sonochemical Synthesis of Silver Nanoparticles at Varying Concentrations of κ -Carrageenan. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, 10 (1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s11671-015-0916-1>.
- (36) 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 (1), 291–301. <https://doi.org/10.1021/bm401541v>.
- (37) Huang, H.; Yang, X. Synthesis of Polysaccharide-Stabilized Gold and Silver Nanoparticles: A Green Method. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339 (15), 2627–2631.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.08.005>.
- (38) El-Rafie, H. M.; El-Rafie, M. H.; Zahran, M. K. Green Synthesis of Silver

Nanoparticles Using Polysaccharides Extracted from Marine Macro Algae.

Carbohydr. Polym. **2013**, 96 (2), 403–410.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.071>.

- (39) Santamaría Vanegas, J.; Rozo Torres, G.; Barreto Campos, B.

Characterization of a κ -Carrageenan Hydrogel and Its Evaluation as a Coating

Material for Fertilizers. *J. Polym. Environ.* **2019**, 27 (4), 774–783.

<https://doi.org/10.1007/s10924-019-01384-4>.

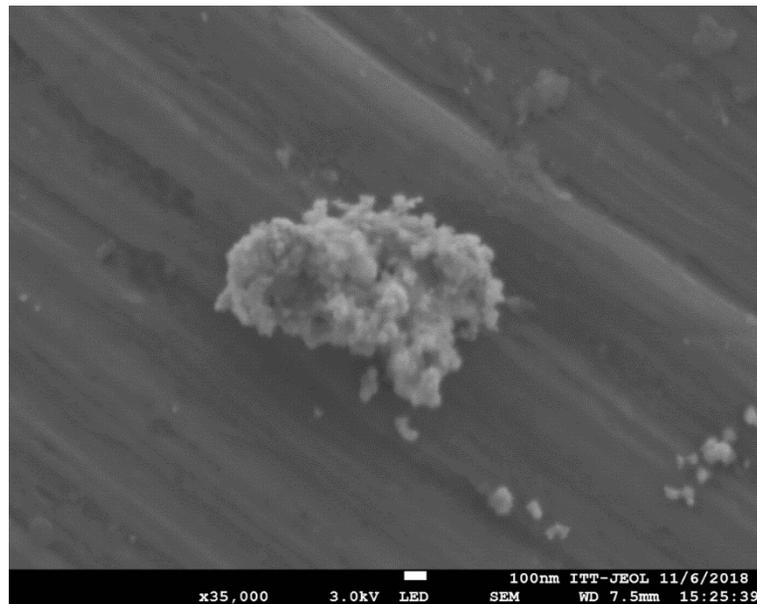
- (40) Baskar, D.; Sampath Kumar, T. S. Effect of Deacetylation Time on the

Preparation, Properties and Swelling Behavior of Chitosan Films. *Carbohydr.*

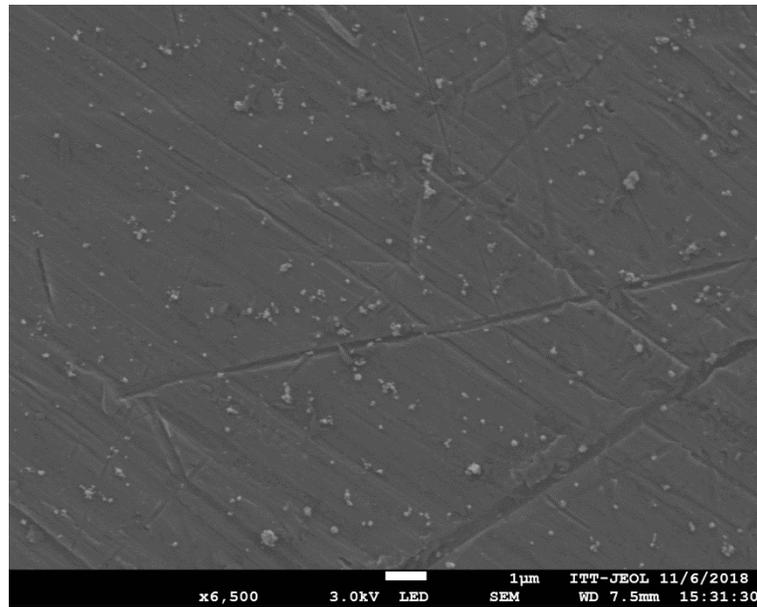
Polym. **2009**, 78 (4), 767–772.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.013>.

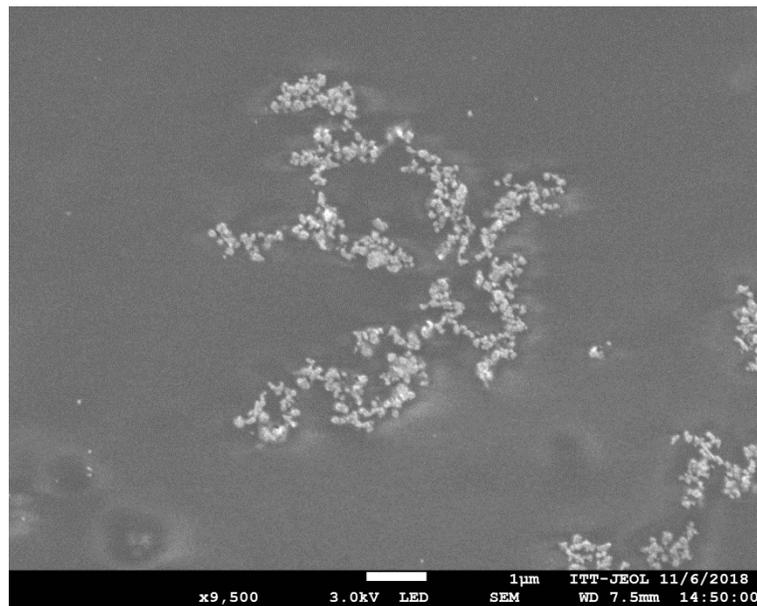
IX. ANEXOS



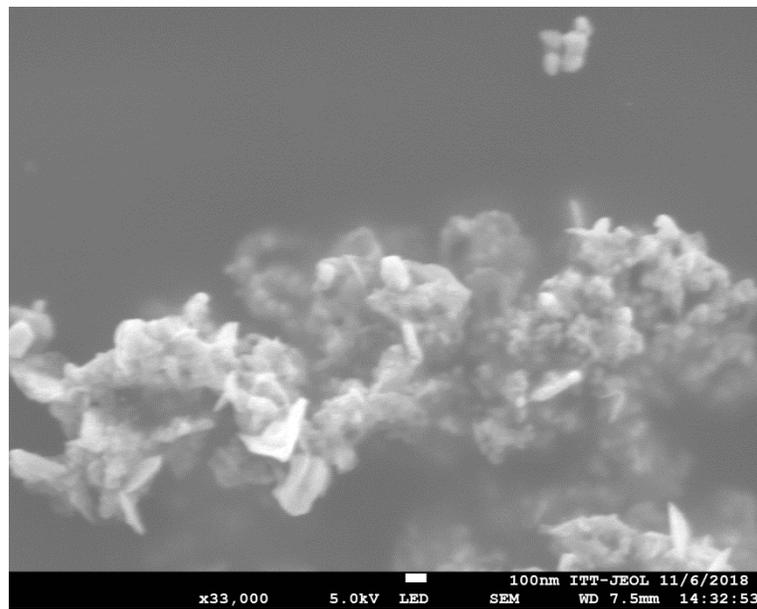
Anexo 1. Micrografía FE-SEM de agregado de NPs Ag-κCA.



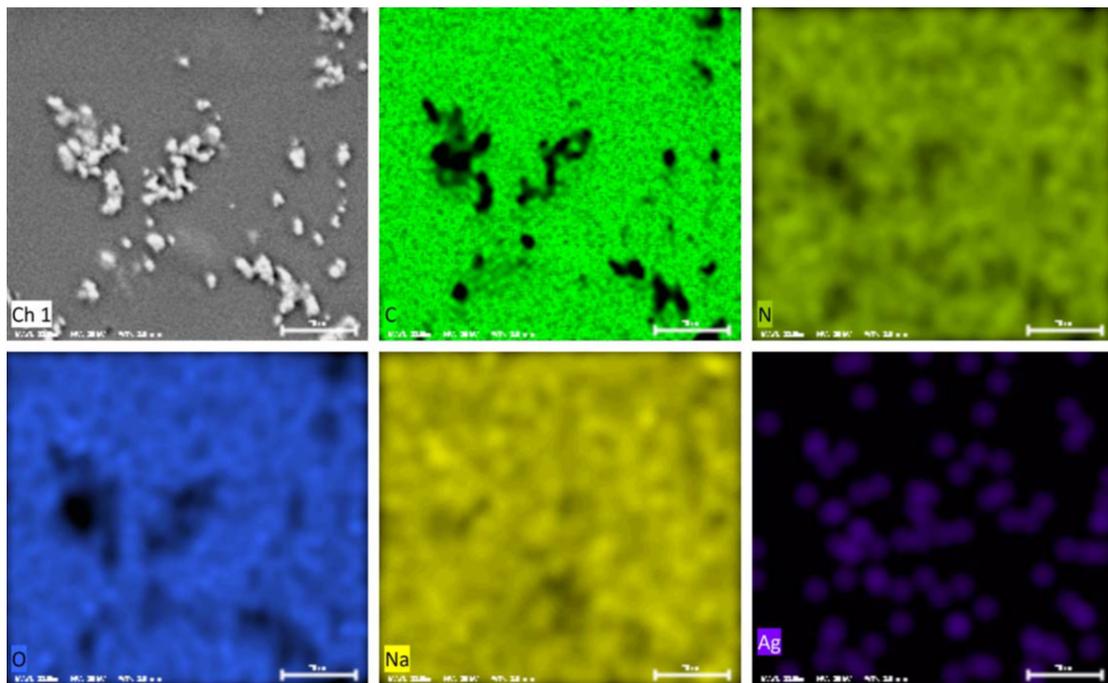
Anexo 2. Micrografía FE-SEM de NPs Ag-κCA.



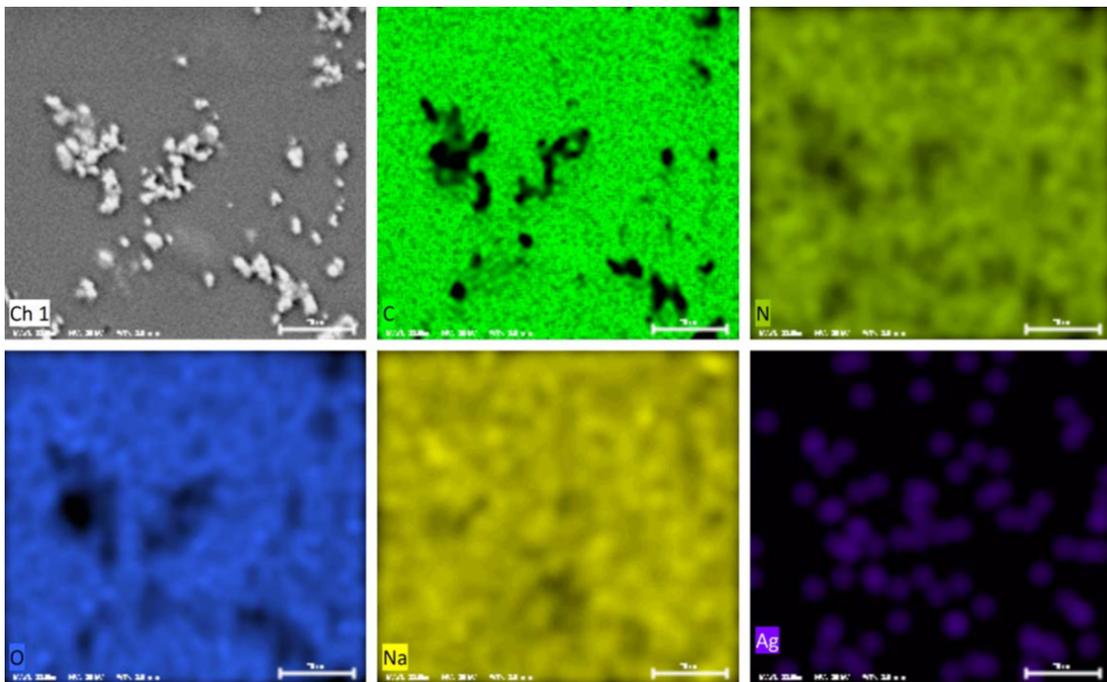
Anexo 3. Micrografía FE-SEM de NPs Ag-CH.



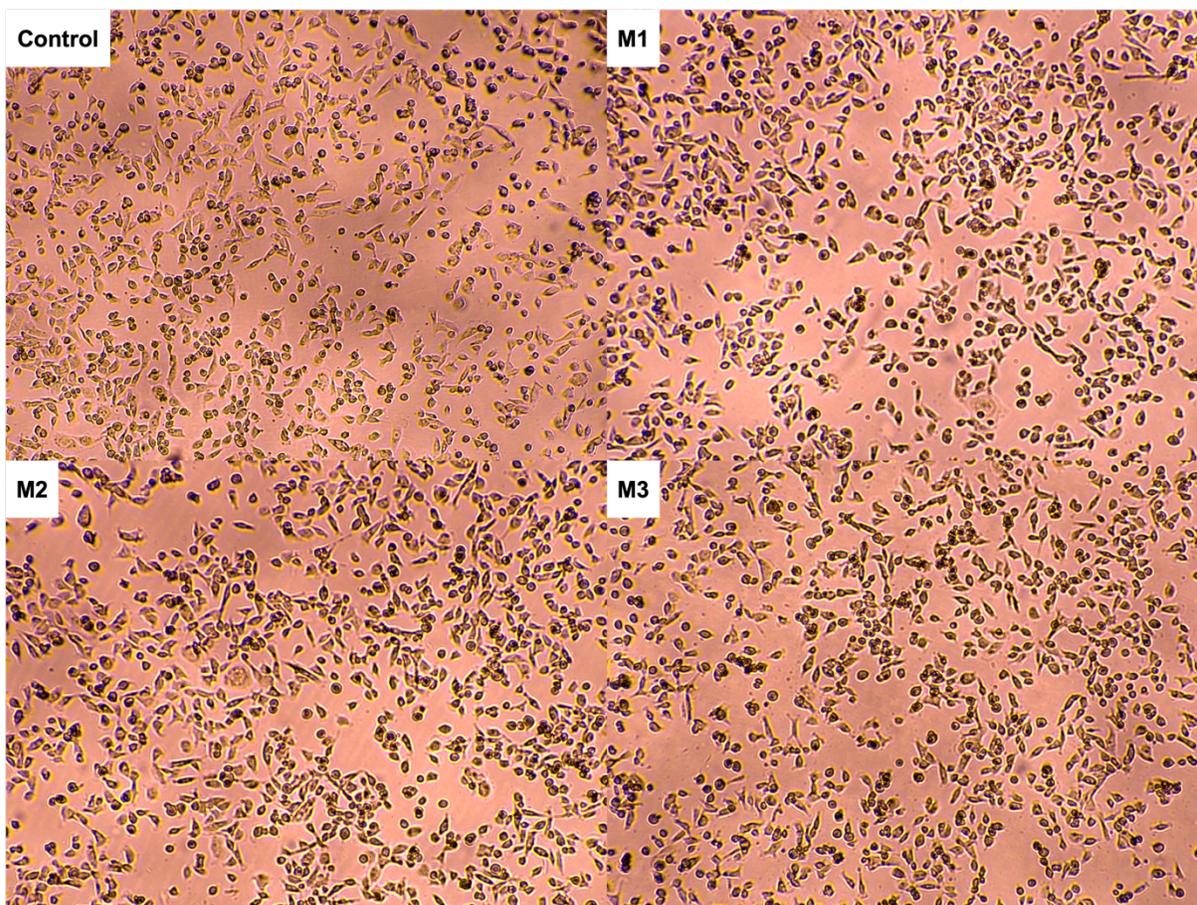
Anexo 4. Micrografía FE-SEM de agregado de NPs Ag-CH.



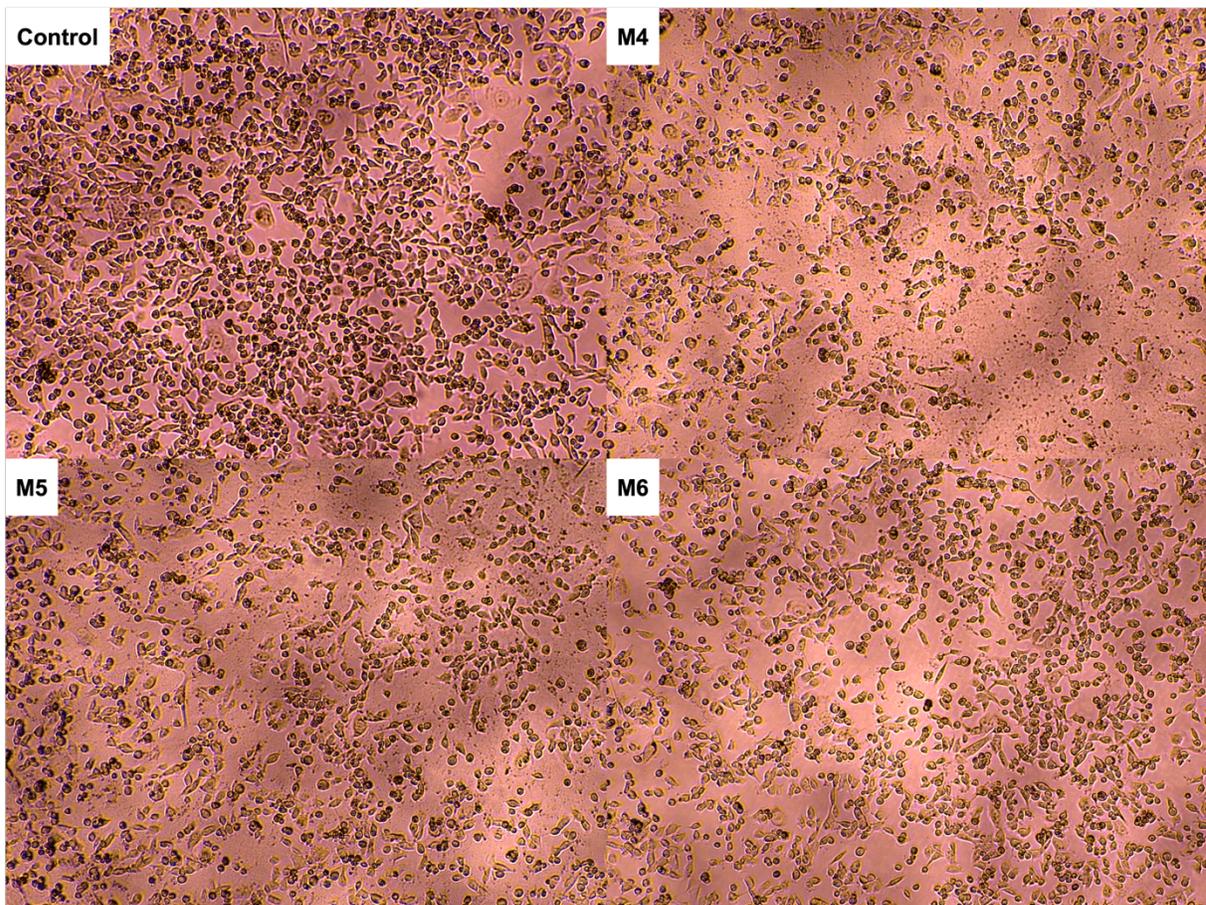
Anexo 5. Mapeo de distribución de elementos químicos por EDX de NPs Ag- κ CA.



Anexo 6. Mapeo de distribución de elementos químicos por EDX de NPs Ag-CH.



Anexo 7. Micrografías ópticas de células adherentes (24 h) sin lixiviados y en presencia de lixiviados de membranas M1-M3.



Anexo 8. Micrografías ópticas de células adherentes (24 h) sin lixiviados y en presencia de lixiviados de membranas M4-M6.