

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

FACULTAD DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA EN MATERIALES

**“Biohidrogeles basados en complejos
polielectrolitos como apósitos para heridas”**

Micaela Ferrante

Tesis presentada para optar por el grado académico de Doctor en Ciencia de Materiales

Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina

Directora: Jimena Soledad González

Co-directora: Vera Alejandra Álvarez

Fecha de presentación: 17 de marzo de 2025.



RINFI es desarrollado por la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la
Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar
documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y
Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto
de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo
con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad
entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

FACULTAD DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA EN MATERIALES

**“Biohidrogeles basados en complejos
polielectrolitos como apósitos para heridas”**

Micaela Ferrante

Tesis presentada para optar por el grado académico de Doctor en Ciencia de Materiales

Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina

Directora: Jimena Soledad González

Co-directora: Vera Alejandra Álvarez

Fecha de presentación: 17 de marzo de 2025.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi directora, la Dra. Jimena González, por haber confiado en mí desde el inicio y haberme brindado la oportunidad de realizar este doctorado, aun sabiendo que provenía de una disciplina diferente. Siempre me sentí respaldada por su guía, sus comentarios alentadores y su enfoque positivo.

A mi codirectora, la Dra. Vera Álvarez, le agradezco profundamente su dedicación y el interés constante en mis avances. A pesar de sus numerosas responsabilidades, siempre encontró el tiempo para escuchar mis inquietudes, ofrecer orientación y compartir su conocimiento con generosidad.

Agradezco también a mis compañeros del grupo de Materiales Compuestos Termoplásticos del INTEMA, tanto a quienes me acompañan en la actualidad como a aquellos con quienes compartí parte de este recorrido en el pasado. Su calidez humana y disposición para el intercambio de ideas contribuyeron a generar un ambiente de trabajo ameno y enriquecedor, en el que siempre fue un placer estar.

Agradezco a CONICET, INTEMA y a la UNMDP por brindarme financiamiento y permitir llevar a cabo este proyecto.

Por otro lado, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia y amigos, cuyo apoyo incondicional ha sido un pilar fundamental en este camino. En especial, a mi abuelo Coco, quien me abrió las puertas de la ciencia desde pequeña y me enseñó a mirarla con curiosidad. Su influencia fue determinante para que hoy me dedique a la investigación.

A mis padres, por haberme acompañado en cada decisión y por demostrarme el orgullo que sienten por lo que hago.

A mi hermano, que ya sea en persona o a miles de kilómetros, estuvo presente y siempre dispuesto para escucharme, ayudarme y aconsejarme.

A Lucas, futuro esposo, que me acompañó con paciencia e interés en mi trabajo, compartió su conocimiento en cuestiones audiovisuales y siempre me alentó a seguir adelante con cada desafío que me propuse.

Abreviaturas

AFM: Microscopía de fuerza atómica.

AgNPs: Nanopartículas de plata.

CAGR: Tasa de crecimiento anual compuesta.

CNWs: Nanohilos de celulosa.

CoPECs: Complejos polielectrolitos compactos.

CS: Condroitín sulfato.

DRX: Difracción de rayos X.

DTGA: Derivada de la pérdida de masa en función de la temperatura.

E': Módulo de almacenamiento en compresión.

E'': Módulo de pérdida en compresión.

E_{Hertz}: Módulo elástico según el modelo de Hertz.

E_{JKR}: Módulo elástico según el modelo JKR.

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

Ge: Gelatina.

GF: Fracción de gel.

h_{max}: máxima penetración alcanzada en el ensayo de nanoindentación.

LD: Lidocaína.

MTT: 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NaN₃: Azida sódica.

NWVTR: Tasa de transmisión de vapor de agua normalizada.

P: Pectina.

P_{adh}: Fuerza de adhesión.

PECs: Complejos polielectrolitos.

P_{max}: Fuerza máxima correspondiente a la máxima profundidad de indentación.

Q: Quitosano.

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

SF: Solución fisiológica.

T_g: Temperatura de transición vítrea.

TGA: Análisis termogravimétrico.

T_{\max} : Temperatura donde ocurre la máxima tasa de pérdida de masa.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

WVTR: Tasa de transmisión de vapor de agua.

ν : Relación de Poisson.

$\Delta\gamma$: Trabajo de adhesión.

η : Viscosidad intrínseca.

η_r : Viscosidad relativa.

η_{sp} : Viscosidad específica.

RESUMEN

Los hidrogeles son materiales compuestos principalmente por una red polimérica y agua. Son reconocidos por su capacidad para absorber grandes cantidades de agua y por su aplicabilidad en diversos ámbitos. En el área biomédica, especialmente como apósitos para heridas, se utilizan debido a que permiten mantener niveles adecuados de humedad y temperatura, similares al ambiente corporal, favoreciendo el proceso de cicatrización, reduciendo tiempos y disminuyendo el riesgo de infecciones (Capítulo 1).

Un tipo particular de hidrogel son los formulados mediante complejos polielectrolitos (PECs), donde una solución de polianión interactúa con una solución de policación a través de sus grupos funcionales cargados. Cuando los hidrogeles se compactan, se los denomina complejos polielectrolitos compactos (CoPECs). La incorporación de sales como NaCl genera que los iones interactúen con las cadenas poliméricas, interfiriendo en la formación de la red y originando materiales saloplásticos con propiedades diferenciadas.

En este trabajo se desarrollaron y caracterizaron hidrogeles CoPECs utilizando polímeros naturales. En los primeros capítulos se trabajó con los polisacáridos quitosano y pectina. Para la formulación se variaron parámetros como el pH, el contenido de NaCl y la concentración polimérica (los materiales y métodos se describen en el Capítulo 2). Se obtuvieron CoPECs de quitosano y pectina de forma satisfactoria e incorporaron NaCl en algunos casos para evaluar su efecto sobre las propiedades finales de los hidrogeles. Además, se añadió un analgésico modelo, la lidocaína, y se realizaron estudios específicos para evaluar su aplicación potencial como apósitos para heridas. Los resultados permitieron determinar que podrían utilizarse en quemaduras de primer o segundo grado (Capítulo 3).

También se incorporaron refuerzos con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas y antimicrobianas de los hidrogeles. Los CoPECs de quitosano y pectina con nanohilos de celulosa (CNWs) demostraron resultados prometedores: los nanohilos se incorporaron de forma efectiva, mantuvieron el efecto antibacteriano, incrementaron la porosidad y los valores de tasa de transmisión de vapor de agua, y mejoraron las propiedades mecánicas superficiales (Capítulo 4).

Por otro lado, se desarrollaron CoPECs de gelatina y condroitín sulfato con o sin NaCl. Los materiales obtenidos fueron compactos y frágiles, lo que dificultaba su moldeado y limitaba su uso como apósitos. Mediante un cambio en el proceso de obtención, empleando secado por aspersion en

lugar de compactación por centrifuga, se lograron obtener microgeles de gelatina y condroitín sulfato. A estos microgeles se les incorporaron nanopartículas de plata (AgNPs), las cuales otorgaron propiedades antibacterianas. Además, se caracterizaron y analizaron otras propiedades de estos geles con miras a su uso en heridas agudas. En el ensayo de hemólisis, relacionado con su potencial aplicación, se observó que los microgeles con AgNPs presentaron un porcentaje de hemólisis mayor que los microgeles sin nanopartículas (Capítulo 5).

En conclusión, este trabajo aborda la formulación, caracterización y estudio de biohidrogeles compuestos con aplicación potencial en apósitos para distintos tipos de heridas.

ABSTRACT

Hydrogels are materials composed mainly of a polymeric network and water. They are known for their ability to absorb large amounts of water and their versatility for application in various fields. In the biomedical area, and more specifically as wound dressings, hydrogels must be capable of maintaining a moisture and temperature level similar to the body environment while promoting the healing process, reducing healing times, and decreasing the risk of infections (Chapter 1).

One type of hydrogel is formulated through polyelectrolyte complexes (PECs), where a solution containing a polyanion interacts with a solution containing a polycation via their charged functional groups. When these hydrogels are compacted, they are referred to as compact polyelectrolyte complexes (CoPECs). The addition of salts, such as NaCl, results in salt ions interacting with the polymer chains, interfering with the network formation and leading to the development of saloplastic materials with different properties.

In this study, CoPEC hydrogels were developed and characterized using natural polymers. In the initial chapters, the polysaccharides chitosan and pectin were employed. Parameters such as pH, NaCl content, and polymer concentration were varied during formulation (materials and methods are described in Chapter 2). CoPEC hydrogels composed of chitosan and pectin were successfully obtained, and NaCl was incorporated into some formulations to study its effects on the final properties of the hydrogels. A model analgesic, lidocaine, was also incorporated, and specific studies were conducted to evaluate its potential application as a wound dressing, concluding that these hydrogels could be suitable for first- or second-degree burns (Chapter 3). Additionally, reinforcements were incorporated to improve the mechanical and antimicrobial properties of the hydrogels. As a result,

CoPEC hydrogels of chitosan and pectin reinforced with cellulose nanowhiskers demonstrated promising properties, as the reinforcements were successfully incorporated, did not affect the antibacterial effect, increased porosity and water vapor transmission rate values, and improved surface mechanical properties (Chapter 4).

Furthermore, CoPEC hydrogels composed of gelatin and chondroitin sulfate were developed, with or without NaCl. The materials obtained were compact and fragile, making them difficult to mold and limiting their use as wound dressings. By modifying the production process through spray drying instead of centrifugal compaction, gelatin and chondroitin sulfate microgels were successfully obtained. Silver nanoparticles (AgNPs) were incorporated into these microgels, which imparted antibacterial properties. These microgels were further characterized, and their other properties were analyzed to evaluate their potential use in acute wounds. In the hemolysis assay related to their potential application, microgels with AgNPs showed higher hemolysis percentages compared to those without nanoparticles (Chapter 5).

In conclusion, this study focuses on the formulation, characterization, and investigation of composite biohydrogels with potential applications as wound dressings for various types of injuries.

Índice general

Capítulo 1.

Introducción a los hidrogeles, complejos polielectrolitos y sus usos como apósitos.....	1
1.1 Definición y clasificación de los hidrogeles.....	2
1.2 La piel y el proceso de curación: Una base para el diseño de apósitos.....	3
1.2.1 Tipos de heridas y sus desafíos para la cicatrización.....	5
1.2.2 Uso de hidrogeles como apósitos.....	8
1.3 Diseño de hidrogeles para aplicaciones biomédicas.....	8
1.3.1 Polielectrolitos.....	8
1.3.2 Estructura interna de los hidrogeles: Formación de la matriz polimérica.....	13
1.3.3 Incorporación de sales.....	14
1.4 Estado del arte: Revisión de patentes.....	15
1.5 Objetivos.....	18

Capítulo 2.

Materiales y métodos.....	20
2.1 Polímeros utilizados.....	21
2.2 Factores clave en el diseño de hidrogeles.....	21
2.2.1 pH.....	21
2.2.2 Concentración polimérica.....	22
2.2.3 Sal.....	22
2.3 Formulación de hidrogeles.....	22
2.3.1 Preparación de hidrogeles de quitosano y pectina.....	22
2.3.2 Síntesis de hidrogeles de gelatina y condroitín sulfato.....	23
2.3.3 Obtención de microgeles de gelatina y condroitín sulfato.....	24
2.4 Incorporación de refuerzos y principios activos a los hidrogeles.....	24
2.4.1 Nanopartículas de plata como refuerzo funcional.....	24
2.4.2 Incorporación de nanohilos de celulosa a la matriz del hidrogel.....	25
2.4.3 Lidocaína como compuesto activo en los hidrogeles.....	26
2.5 Caracterización de los polímeros de partida y de los hidrogeles.....	27
2.5.1 Cálculo del peso molecular del condroitín sulfato.....	27
2.5.2 Evaluación de la capacidad de hinchamiento y absorción de agua.....	28
2.5.3 Ensayo de fracción de gel.....	29
2.5.4 Análisis termogravimétrico.....	30
2.5.5 Técnicas de microscopía.....	30
2.5.6 Ensayo de durabilidad.....	31
2.5.7 Técnicas físico-químicas de caracterización de los hidro y microgeles.....	32
2.5.8 Caracterización mecánica.....	33
2.5.9 Ensayos de desempeño físico: Evaluación de la permeabilidad, degradabilidad y estabilidad de los hidrogeles.....	34
2.5.10 Ensayos biológicos.....	36

2.5.11 Esquema de la estructura de la tesis doctoral.....	41
---	----

Capítulo 3.

Hidrogeles basados en quitosano y pectina: Caracterización y funcionalidad.....	43
3.1 Introducción al capítulo 3.....	44
3.2 Hidrogeles obtenidos.....	45
3.3 Criterios para la selección de hidrogeles.....	47
3.3.1 Caracterización morfológica, textural y de formación.....	47
3.3.2 Estudio de la microestructura.....	49
3.3.3 Estudio de la estabilidad térmica de los hidrogeles.....	51
3.3.4 Capacidad de hinchamiento en condiciones controladas.....	53
3.3.5 Evaluación de la carga superficial en las soluciones precursoras de hidrogeles.....	57
3.4 Selección preliminar de formulaciones óptimas de CoPECs QP.....	59
3.4.1 Justificación de la selección.....	59
3.4.2 Justificación de exclusión de otros hidrogeles.....	60
3.5 Ensayos con los hidrogeles seleccionados.....	61
3.5.1 Comportamiento en condiciones fisiológicas: Hinchamiento.....	61
3.5.2 Caracterización físico-química de los materiales.....	64
3.5.3 Respuesta mecánica en ensayos de compresión.....	67
3.5.4 Evaluación de funcionalidad: Tasa de transmisión de vapor de agua.....	70
3.5.5 Actividad antibacteriana.....	71
3.5.6 Ensayo preliminar <i>In vivo</i>	72
3.6 Incorporación de un compuesto activo: Lidocaína.....	73
3.6.1 Síntesis de los hidrogeles QP con lidocaína.....	74
3.6.2 Evaluación de la encapsulación del compuesto activo.....	74
3.6.3 Liberación de lidocaína.....	74
3.6.4 Evaluación de la biocompatibilidad celular.....	76
3.7 Aplicación de los hidrogeles.....	77
3.8 Conclusiones del capítulo.....	78

Capítulo 4.

Nanocompuestos de quitosano y pectina.....	80
4.1 Introducción al capítulo 4.....	81
4.2 Utilización de nanopartículas de plata.....	81
4.2.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas.....	82
4.2.2 Incorporación de las nanopartículas de plata en los hidrogeles QP.....	83
4.2.3 Evaluación antibacteriana de los nanocompuestos.....	85
4.3 Refuerzos de nanohilos de celulosa.....	86
4.3.1 Ensayos de caracterización de los nanohilos.....	87
4.3.2 Métodos de incorporación de los nanohilos a los hidrogeles.....	90
4.3.3 Conclusiones preliminares sobre la integración de CNWs.....	95
4.3.4 Optimización del contenido de CNWs en hidrogeles para apósitos.....	96

4.3.5 Determinación de la formulación óptima para hidrogeles con CNWs	103
4.3.6 Análisis mecánico avanzado de hidrogeles seleccionados	104
4.3.7 Evaluación de modificaciones de la actividad antimicrobiana en hidrogeles reforzados	112
4.3.8 Efecto de la incorporación de refuerzos sobre la viabilidad celular	113
4.4 Evaluación de la vida útil de los hidrogeles.....	114
4.4.1 Ensayo de degradabilidad	114
4.4.2 Estabilidad mecánica y estructural durante el almacenamiento.....	116
4.5 Conclusiones del capítulo.....	121

Capítulo 5.

Diseño y caracterización de hidrogeles de CoPECs y microgeles de gelatina y condroitín sulfato.....	123
5.1 Introducción al capítulo 5.....	124
5.2 Caracterización físico-química del condroitín sulfato.....	125
5.2.1 Cálculo del peso molecular viscosimétrico	125
5.2.2 Caracterización físico-química del condroitín sulfato	126
5.3 Formulación de hidrogeles CoPECs	127
5.4 Selección de hidrogeles y evaluación de su rendimiento	128
5.4.1 Respuesta de los hidrogeles ante condiciones fisiológicas simuladas	128
5.4.2 Interacción y entrecruzamiento en hidrogeles formulados en distintas condiciones: Evaluación de fracción de gel y potencial zeta	130
5.5 Incorporación de nanohilos de celulosa y nanopartículas de plata a los hidrogeles de gelatina y condroitín sulfato	132
5.5.1 Formación y evaluación de hidrogeles de GCS compuestos con nanohilos de celulosa	132
5.5.2 Evaluación de la incorporación de nanopartículas de plata en los hidrogeles de GCS.....	132
5.6 Microgeles de GCS	133
5.6.1 Modificación en la síntesis	134
5.7 Análisis espectroscópico de los microgeles	137
5.8 Evaluación de las propiedades térmicas.....	138
5.9 Tamaño y morfología de las partículas de microgeles.....	139
5.10 Impacto de NaCl y AgNPs en la absorción de agua y el grado de hinchamiento de los microgeles	141
5.11 Estabilidad de los microgeles	144
5.12 Ensayos biológicos	145
5.12.1 Ensayos antimicrobianos	145
5.12.2 Hemólisis como prueba clave para la futura aplicación de los microgeles en heridas agudas.....	145
5.13 Conclusiones del capítulo.....	147
6 CONCLUSIONES GENERALES.....	149
6.1 Trabajos futuros.....	151

7 ANEXOS	152
ANEXO 1: Citotoxicidad celular	152
1.1 Evaluación del método de los estudios de citotoxicidad.....	152
1.1.1 Primer ensayo de citotoxicidad	152
1.1.2 Determinación del tamaño de placas adecuado.....	153
1.1.3 Método de medición de viabilidad: MTT o resazurina	154
ANEXO 2: Modificación en la síntesis de hidrogeles CoPECs de GCS a microgeles	156
ANEXO 3: Secado por aspersion	158
3.1 Modificación de parámetros del spray dryer y su influencia en el rendimiento	158
3.1.1 Muestra más diluida	158
3.1.2 Variación en la cantidad inicial de solución	158
3.1.3 Variación en las temperaturas iniciales	158
ANEXO 4: Interacción microgeles-glóbulos rojos	160
8 REFERENCIAS	161
9 INFORMACIÓN EXTRA:	188
9.1 Listado de publicaciones, ponencias, congresos:	188
9.1.1 Publicaciones	188
9.1.2 Congresos	189

Índice de figuras

Figura 1.1. Clasificación de los hidrogeles teniendo en cuenta distintos aspectos como su apariencia, composición, origen, entrecruzamiento, carga y aplicación.	3
Figura 1.2. Representación de la composición de la piel con sus capas y estructuras típicas.	3
Figura 1.3. Esquema de las principales fases de la curación de heridas.	5
Figura 1.4. Clasificación de heridas teniendo en cuenta su origen, profundidad y duración (García González et al., 2013; Percival, 2002).	6
Figura 1.5. Estructura química del quitosano con sus grupos amino ionizables.	10
Figura 1.6. Representación de la estructura química de la pectina, mostrando dos monómeros de ácido galacturónico sin metoxilación y uno con un grupo metoxilado.	11
Figura 1.7. Estructura química de la gelatina.	12
Figura 1.8. Estructura química del condroitín sulfato.	12
Figura 1.9. Resumen de las posibles maneras de entrecruzamiento polimérico para la síntesis de hidrogeles, de acuerdo a lo publicado por Akhtar et. al. (Akhtar et al., 2016).	13
Figura 1.10. Esquema que representa el efecto dopante de la sal al interferir en la interacción entre las cadenas de los polielectrolitos.	14
Figura 1.11. Cantidad de publicaciones más tempranas de patentes (por familia) con el paso de los años, desde 2004 hasta 2024 inclusive.	17
Figura 2.1. Esquema de la formulación de los hidrogeles.	23
Figura 2.2. Imagen que resume la tesis doctoral.	41
Figura 3.1. Ejemplo de hidrogeles de QP obtenidos, formulados a pH 4 con 10 mg/ml de polímeros. De izquierda a derecha: Sin NaCl, con 0,15 M NaCl y con 0,5 M NaCl. Regla de referencia en cm.	47
Figura 3.2. Porcentaje de hinchamiento de hidrogeles en pH 5 con o sin 0,15 M NaCl. a y b: Hidrogeles formulados a pH 4. c y d: Formulados a pH 4,5. e y f: Formulados a pH 5.	49
Figura 3.3. Micrografías de SEM de los hidrogeles formulados a pH 4. a, b y c corresponden a los hidrogeles con 5 mg/ml de polímeros y 0, 0,15 M y 0, 5 M NaCl, respectivamente; d, e y f corresponden a los hidrogeles con 10 mg/ml de polímeros y 0, 0,15 M y 0,5 M NaCl.	52
Figura 3.4. Resultados de TGA de los polímeros Q y P, con las curvas de masa residual (líneas sólidas) y de la DTGA (líneas discontinuas) en función de la temperatura.	54

Figura 3.5. Resultado de TGA de los hidrogeles QP, con las curvas de masa residual en función a la temperatura.	55
Figura 3.6. Resultado de TGA de los hidrogeles QP, con las curvas de la DTGA en función a la temperatura.	55
Figura 3.7. Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles QP en diferentes medios y condiciones, formulados sin NaCl (barras verdes) o con NaCl (barras celestes).	62
Figura 3.8. Espectros de FTIR para los hidrogeles QP y los polímeros solos.	64
Figura 3.9. Comparación entre espectros de DRX de los hidrogeles con o sin NaCl.	66
Figura 3.10. Ejemplo de curvas esfuerzo-deformación obtenidas en el ensayo de compresión de hidrogeles QP con o sin NaCl.	68
Figura 3.11. Resultados del ensayo de compresión para los hidrogeles QP-0 y QP-0,15 hinchados en distintas condiciones.	69
Figura 3.12. Actividad antibacteriana de los hidrogeles. Halo y pseudohalo de hidrogeles QP-0 en respuesta a <i>E. coli</i> (a) y <i>S. aureus</i> (c) e hidrogel QP-0,15 en respuesta a <i>E. coli</i> (b) o <i>S. aureus</i> (d).	72
Figura 3.13. Prueba <i>in vivo</i> de cicatrización de heridas del tratamiento con hidrogel en el día cuatro después de la lesión. a y b son grupos de control en el día 0 y el día 4, respectivamente. Tratamiento con hidrogel QP-0 (c y d) e hidrogel QP-0,15 (e y f).	73
Figura 3.14. Curva de liberación de LD de los hidrogeles a 37 °C en SF.	75
Figura 3.15. Resultados de viabilidad celular (%) para los hidrogeles QP-0 y QP-0,15 con o sin LD con sus respectivos errores.	76
Figura 3.16. Presentación de la versión comercial del hidrogel a modo de parche para su uso en apósitos, junto con un adhesivo para que quede sujeto en la piel a la hora de su aplicación. Idea desarrollada por las alumnas Estevez y Thames de la UBA.	77
Figura 3.17. Modelo de producción y logística para los hidrogeles como apósitos. Idea desarrollada por las alumnas Estevez y Thames de la UBA.	78
Figura 4.1. Caracterización de las AgNPs mediante TEM (a) y análisis de espectroscopía dispersiva de rayos X (EDS) (b).	82
Figura 4.2. Ejemplo de hidrogeles de QP con 1% AgNPs, con o sin 0,15 M NaCl.	83
Figura 4.3. Resultado de TGA de los hidrogeles compuestos con AgNPs, con las curvas de masa residual (líneas sólidas) y de la DTGA (líneas discontinuas) en función de la temperatura.	84

Figura 4.4. Comparación entre los halos de inhibición obtenidos contra <i>E. coli</i> (a y b) y <i>S. aureus</i> (c y d) para los hidrogeles QP sin NPs (a y c) o con AgNPs (b y d).	85
Figura 4.5. Micrografía de SEM de un agregado de CNWs (a) y resultado de AFM mostrando la longitud de los CNWs (b).	88
Figura 4.6. Espectro de FTIR para los CNWs, con la longitud de onda de los grupos funcionales destacada.	89
Figura 4.7. Espectro obtenido del ensayo de DRX realizado en muestras de CNWs y MCC.	90
Figura 4.8. Valores de potencial Zeta de soluciones de Q o P con o sin NaCl 0,15 M y CNWs. Las soluciones son las mismas que se usaron para fabricar hidrogeles con CNWs al 4 %.	91
Figura 4.9. Micrografías de SEM de hidrogeles sin NaCl con 0%, 4%, 10%, 20% y 30% CNWs. Los agregados de CNWs están marcados con círculos rojos.	94
Figura 4.10. Espectros de FTIR de los CNWs, el hidrogel QP-0 sin CNWs y los hidrogeles con CNWs adicionados por hinchamiento (a) o por incorporación a la solución madre (b) en distintos porcentajes (4, 10, 20 y 30%).	95
Figura 4.11. Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles QP con CNWs 0, 4, 10, 20 y 30%, formulados sin NaCl (barras verdes) o con NaCl (barras celestes).	97
Figura 4.12. Fotografías de los hidrogeles secos con o sin NaCl y con distintos porcentajes de CNWs.	99
Figura 4.13. Curvas de esfuerzo vs deformación para los hidrogeles QP-0.15 con distintos porcentajes de CNWs.	101
Figura 4.14. Módulo de compresión de hidrogeles QP-0-5 y QP-0,15-5 con CNWs a diferentes porcentajes, hinchados en SF previamente.	102
Figura 4.15. Resultados de NWVTR según el contenido de CNWs de los hidrogeles.	103
Figura 4.16. Resultados de las pruebas de frecuencia que muestran las curvas para hidrogeles con o sin NaCl y 10% p/p de CNWs. El módulo de almacenamiento se representa con cuadrados rellenos, mientras que los triángulos rellenos representan el módulo de pérdida.	105
Figura 4.17. Variación de módulo complejo entre 0,1 a 10 Hz de frecuencia.	107
Figura 4.18. Curvas de fuerza-desplazamiento en el formato de desplazamiento máximo de 500 nm.	108
Figura 4.19. Puntos de datos obtenidos en la curva E_{Hertz} vs P_{max} para hidrogeles con 10% CNWs.	109

Figura 4.20. Representación de puntos experimentales y promedios de E_{Hertz} en función de la P_{max} para el hidrogel QP-0 sin CNWs. Los puntos resaltados en azul son los correspondientes a los h_{max} 2000 y 3500 nm.	110
Figura 4.21. Representación de puntos experimentales y promedios de E_{Hertz} en función de la P_{max} para el hidrogel QP-0-10% CNWs.	110
Figura 4.22. Curvas teóricas y de ajuste de E_{Hertz} vs P_{max} en hidrogeles con o sin 10% CNW.....	111
Figura 4.23. Halo de inhibición generado alrededor de los hidrogeles incubados con <i>S. aureus</i> (izquierda) o <i>E. coli</i> (derecha) sin NaCl. Filas de arriba a abajo: con 0, 10 y 20% CNWs.	113
Figura 4.24. Resultados de viabilidad con diferentes muestras después de 1, 2, 4 y 7 días de incubación.	114
Figura 4.25. Resultados de la prueba de degradación de hidrogeles con o sin CNWs y NaCl, mostrando su pérdida de peso (%) a través del tiempo.	115
Figura 4.26. Resultados de módulo de compresión para los hidrogeles con o sin NaCl y/o CNWs conservados durante distintos tiempos.....	116
Figura 4.27. Micrografías de SEM de los hidrogeles QP-0-10%CNWs a los 0, 60, 120, 180 y 240 días de conservación.	120
Figura 4.28. Micrografías de SEM de los hidrogeles QP-0,15-10%CNWs a los 0, 60, 120, 180 y 240 días de conservación.	120
Figura 5.1. Espectro de FTIR del CS con la longitud de onda de sus grupos funcionales destacada.	126
Figura 5.2. Resultados del análisis de potencial zeta en hidrogeles GCS.	131
Figura 5.3. Hidrogeles compuestos con 1% p/p de AgNPs , con 15 mg/ml de concentración de Ge y CS sin NaCl (a) o con 0,15 M NaCl (b) y con el doble de Ge junto con la mitad del CS sin NaCl (c) o con 0,15 M NaCl (d).	133
Figura 5.4. Microgeles de GCS.....	136
Figura 5.5. Microgeles de GCS hidratados. De izquierda a derecha: muestra 1, 2, 3 y 4.	137
Figura 5.6. Espectros de FTIR de los polímeros Ge y CS y de los microgeles 1, 2, 3 y 4.	137
Figura 5.7. Resultado de TGA de los microgeles y de los polímeros Ge y CS, con las curvas de masa residual (líneas sólidas) y de DTGA (líneas discontinuas) en función a la temperatura.	139

Figura 5.8. Micrografías de SEM de hidrogeles GCS sin NaCl ni AgNPs: (a) polvo liofilizado de microgeles, (b) microgeles liofilizados tras hincharse en agua destilada y (c) hidrogeles con menor concentración en agua.	140
Figura 5.9. Resultado del área de las partículas de los diferentes microgeles.	141
Figura 5.10. Resultados de porcentaje de absorción de agua para los microgeles (1,2,3 y 4) y los polímeros solos (Ge y CS).	142
Figura 5.11. Porcentaje de hinchamiento obtenido para los hidrogeles y los polímeros a los distintos tiempos: 1, 6, 15, 30, 60 y 120 (de izquierda a derecha).	143
Figura 5.12. Desintegración del hidrogel de Ge solo (a) en comparación con la desintegración parcial del hidrogel de GCS(b) luego de 10 segundos de colocados en agua destilada a 37 °C.	144
Figura 5.13. Resultados de las pruebas hemolíticas de las cuatro muestras y los controles (positivos y negativos) y porcentaje de hemólisis de todas las muestras, notándose una diferencia significativa entre muestras con o sin AgNPs y con la adición de NaCl.	146

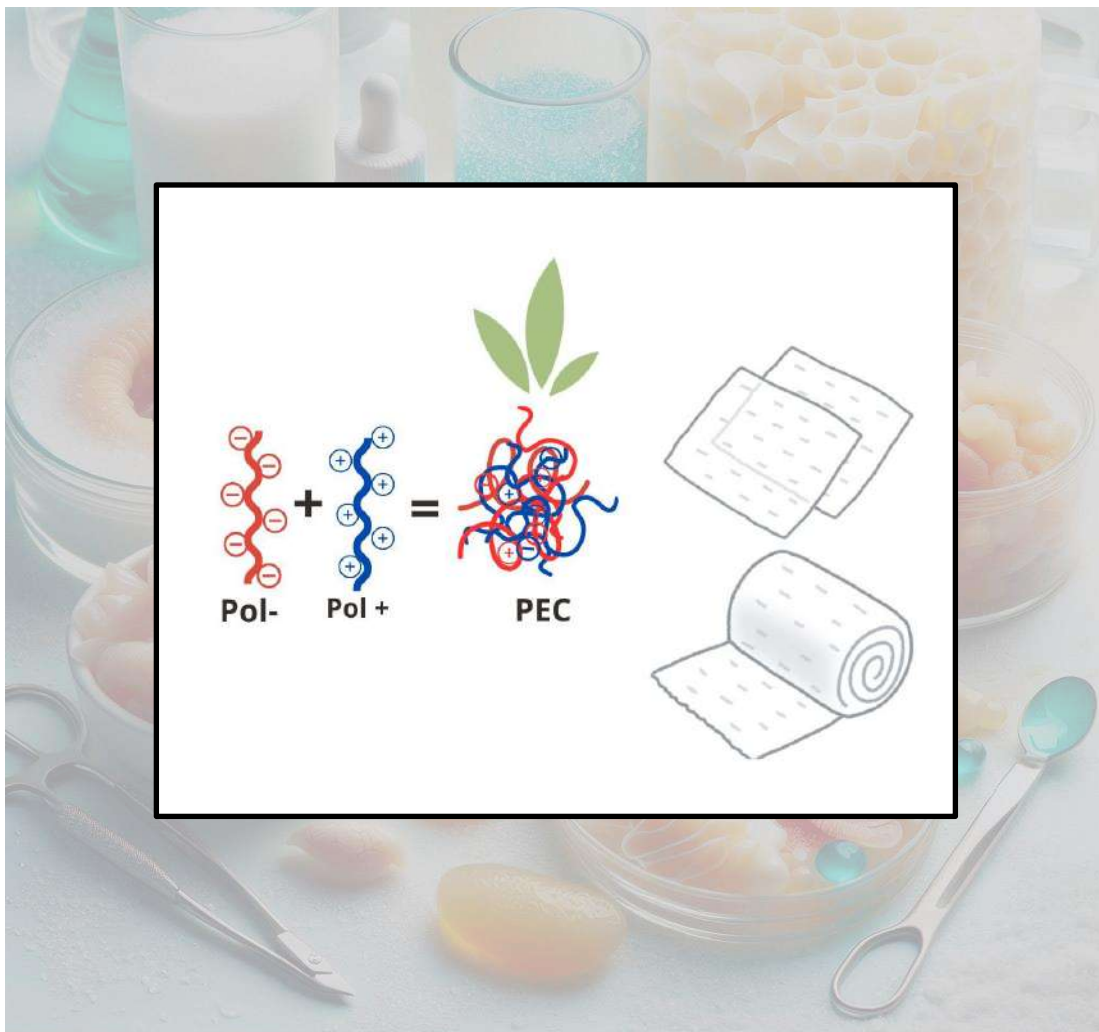
Índice de tablas

Tabla 1.1. Resultados de búsquedas de patentes donde se mencionan diferentes polímeros para la formulación de hidrogeles y el porcentaje en que estos aparecen en el total de publicaciones consideradas.....	18
Tabla 2.1. Nomenclatura de los hidrogeles y microgeles formulados exitosamente, algunos de ellos compuestos con la adición de refuerzos como AgNPs y CNWs o cargados con agentes activos como la LD.....	42
Tabla 3.1. Hidrogeles formulados. Variación de pH, concentración de polímeros y sal en la fabricación de los hidrogeles.....	46
Tabla 3.2. Valores obtenidos del espesor de la pared de los poros en los hidrogeles formulados a pH 4.....	52
Tabla 3.3. Temperatura inicial (T_i) y T_{max} de los hidrogeles formulados a pH 4 con los distintos parámetros, y cantidad de porcentaje de hidrogel presente a los 800 °C (M_f).....	56
Tabla 3.4. Resultados de Potencial Zeta y de conductividad para soluciones con P o Q y con o sin NaCl formuladas a pH 4, 4,5 y 5.....	58
Tabla 4.1. Medida de los halos y pseudohalos de inhibición (mm) en hidrogeles QP-0 con y sin AgNPs.....	86
Tabla 4.2. Temperatura de degradación de hidrogeles sintetizados a pH 4 sin NaCl (QP-0) o con NaCl 0,15 M (QP-0,15) con CNWs añadido mediante hinchamiento (a) o adición a soluciones de polímero (b) al 4, 10, 20 o 30 % CNWs.....	92
Tabla 4.3. Resultados de espesor de la pared de los poros en los hidrogeles con o sin nanocelulosa incorporada por distintos métodos.....	93
Tabla 4.4. Resultados de GF de los hidrogeles con o sin CNWs y con y sin NaCl.....	100
Tabla 4.5. Parámetros obtenidos del modelo híbrido, parámetro de ajuste de $R_{Pearson}$ y valores de trabajo de adhesión para las muestras analizadas.....	111
Tabla 4.6. Resultados de pérdida de peso para los hidrogeles con o sin NaCl y CNWs conservados durante distintos tiempos.....	118

Tabla 5.1. Valores obtenidos al medir el tiempo de flujo de distintas soluciones conteniendo CS a concentraciones diferentes, utilizando agua destilada como solvente. Valores de η_r y η_{sp} de las distintas soluciones.	125
Tabla 5.2. Combinaciones consideradas para la formulación de hidrogeles.	128
Tabla 5.3. Resultados de hinchamiento y de % de GF en hidrogeles a pH 3,5 (C, D, E) y a pH 4 (A y B).....	129
Tabla 5.4. Comparación entre los valores de rendimiento obtenidos para las distintas muestras luego de sintetizadas por spray drying.	135
Tabla 5.5. Medidas del halo de inhibición (mm) contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> luego de 24 horas de incubación.	145

Capítulo 1.

Introducción a los hidrogeles, complejos polielectrolitos y sus usos como apósitos.



1.1 Definición y clasificación de los hidrogeles.

Los hidrogeles son materiales constituidos por redes poliméricas tridimensionales, cuya estructura emula la de la matriz extracelular. Su principal característica radica en la capacidad de absorber agua, lo que les permite hincharse hasta varias veces su peso sin comprometer su integridad funcional bajo distintas condiciones (Ortega et al., 2023). El agua queda retenida en los hidrogeles mediante tres mecanismos principales: (1) interacción directa con los grupos funcionales polares de los polímeros, (2) interacción secundaria con grupos hidrofóbicos, en caso de que estén presentes, formando una capa de agua estructurada, y (3) agua libre captada por procesos de ósmosis y difusión (Op 'T Veld et al., 2020).

Estos materiales encuentran aplicaciones en diversos campos, entre los que se destacan el ámbito sanitario (por ejemplo, en vendajes, lentes de contacto y prótesis), el ambiental (tratamiento de agua y dispersantes), el tecnológico (protectores para dispositivos electrónicos) y el cosmético, entre otros. En los últimos años, han adquirido particular relevancia en aplicaciones biomédicas, especialmente en la regeneración tisular, el desarrollo de biosensores y su uso como apósitos para heridas (J. Xu et al., 2020). Esta utilidad se atribuye principalmente a su capacidad para prevenir la deshidratación y reducir el riesgo de infecciones (Khorasani et al., 2021). Además, se emplean como sistemas de liberación de agentes terapéuticos que contribuyen al manejo eficiente de las heridas (Alex et al., 2024).

La clasificación de los hidrogeles varía según su aplicación y otros factores, como se presenta en la Figura 1.1 (Mehta et al., 2023).

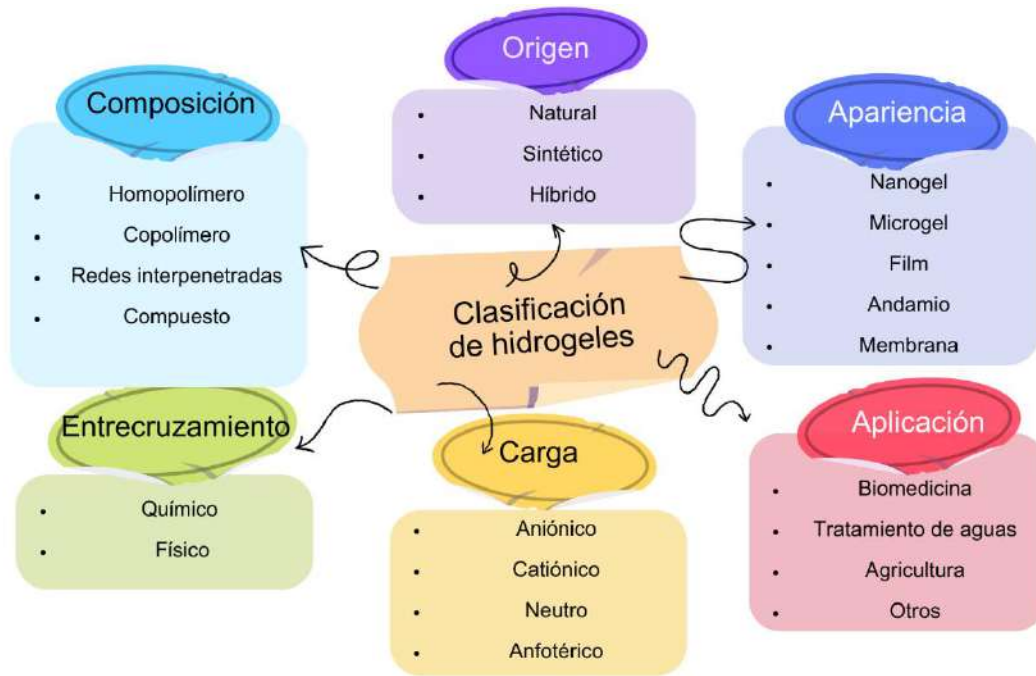


Figura 1.1. Clasificación de los hidrogeles teniendo en cuenta distintos aspectos como su apariencia, composición, origen, entrecruzamiento, carga y aplicación.

1.2 La piel y el proceso de curación: Una base para el diseño de apósitos.

La piel está compuesta por un conjunto de células organizadas en tres capas principales: epidermis, dermis y tejido subcutáneo (Figura 1.2).

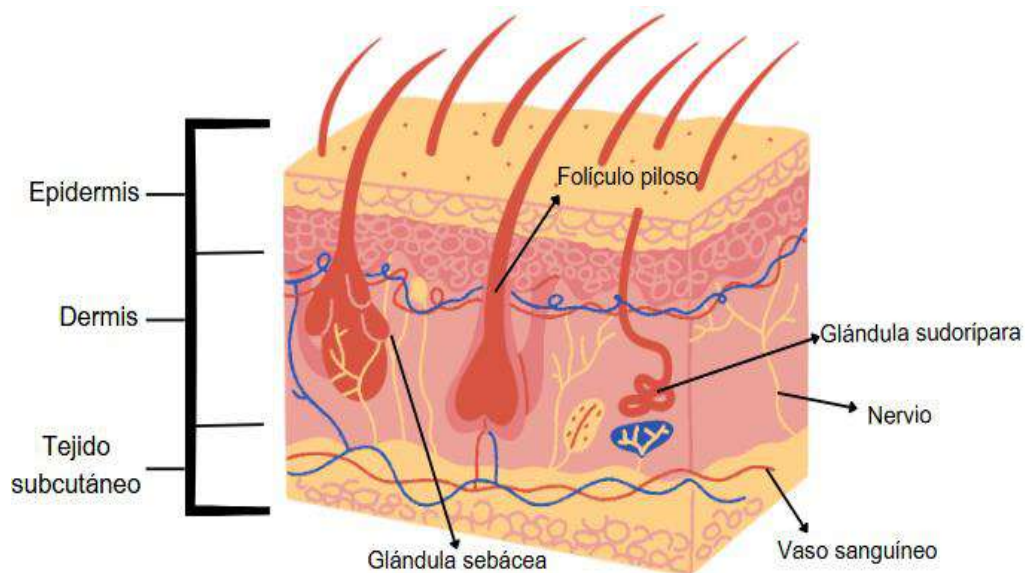


Figura 1.2. Representación de la composición de la piel con sus capas y estructuras típicas.

La **epidermis** constituye la capa más externa, carece de vascularización y actúa como una barrera protectora que impide el ingreso de microorganismos, reduciendo así el riesgo de infecciones, además de prevenir la pérdida de fluidos. La sección más externa de la epidermis, en contacto directo con el ambiente, se denomina estrato córneo. Este presenta propiedades mecánicas que varían en función de las condiciones de temperatura y humedad (Hendriks et al., 2006). Las células predominantes en esta capa son los **corneocitos**, que derivan de la diferenciación y migración de queratinocitos (Derler and Gerhardt, 2012). También se encuentran presentes células dendríticas. En la interfaz entre la epidermis y la dermis se localizan estructuras anexas, como glándulas (ecrinas y apocrinas) y unidades pilosebáceas (Kolarsick et al., 2011). La composición y cantidad de estas estructuras varían dependiendo de la región anatómica del cuerpo.

La **dermis** es la capa intermedia y está formada por fibras de colágeno, elastina y tejido conectivo. Este tejido contiene fibroblastos, que son los principales responsables de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular y desempeñan un papel crucial en la curación de heridas. La dermis está vascularizada y presenta terminaciones nerviosas, así como células del sistema inmunológico, como macrófagos y mastocitos, implicadas en la respuesta inflamatoria y la protección frente a patógenos (Gilaberte et al., 2016).

Por debajo de la dermis se encuentra el **tejido subcutáneo**, compuesto predominantemente por adipocitos. Este tejido cumple funciones esenciales, como el almacenamiento de energía, la regulación metabólica y la protección frente a traumatismos (Kolarsick et al., 2011).

El proceso de **curación de heridas** comprende cuatro fases principales (Shi et al., 2020), representadas esquemáticamente en la Figura 1.3:

- **Coagulación y hemostasia:** Detiene el flujo sanguíneo hacia la herida. Esta fase inicial, que tiene una función antiinflamatoria, se extiende por dos a tres días (Woollard et al., 2007).
- **Inflamación:** Aumenta la permeabilidad vascular, permitiendo el acceso de células del sistema inmunitario, enzimas y nutrientes al sitio de la lesión (Derakhshandeh et al., 2018).
- **Proliferación:** Se caracteriza por procesos como la angiogénesis, la formación de tejido de granulación y la migración y crecimiento de células epiteliales para llevar a cabo la

epitelización de la herida. En esta fase, los fibroblastos migran al sitio de la lesión y promueven la síntesis de colágeno (Dominguez-Saavedra and Hernández-Galván, 2022).

- **Remodelación:** Esta etapa final está relacionada con la formación de tejido cicatricial y puede extenderse durante años, dependiendo de las características específicas de la herida (Guarín-Corredor et al., 2013).

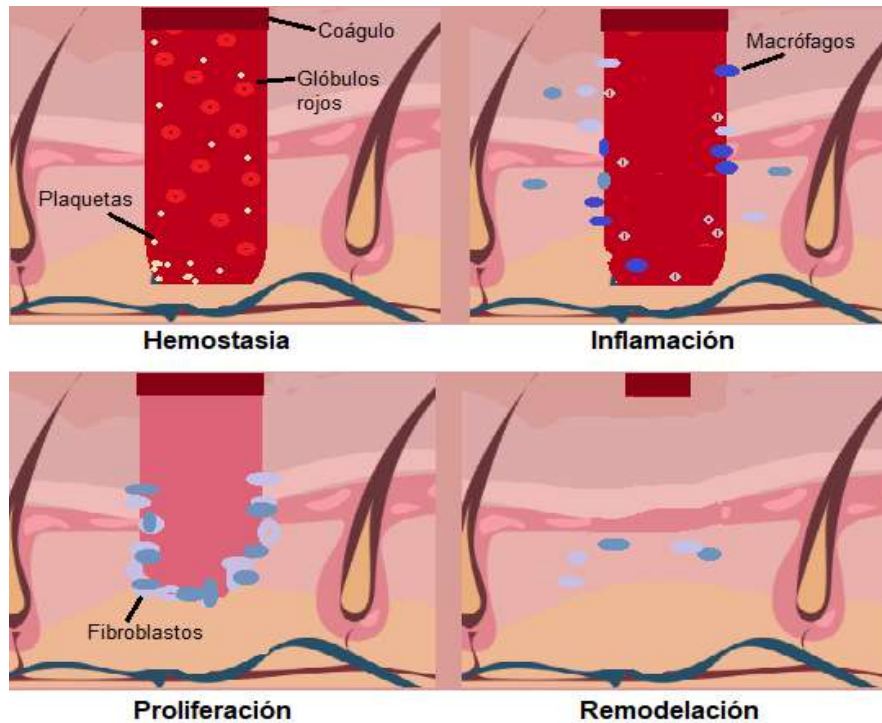


Figura 1.3. Esquema de las principales fases de la curación de heridas.

1.2.1 Tipos de heridas y sus desafíos para la cicatrización.

Si bien no existe una clasificación universalmente aceptada para las heridas, estas pueden clasificarse considerando diversos factores, como el origen, la zona afectada, la duración, entre otros, tal como se observa en la Figura 1.4 (Percival, 2002). Bajo este marco, se describen a continuación algunos tipos de heridas en las cuales la aplicación de hidrogeles resulta especialmente beneficiosa.



Figura 1.4. Clasificación de heridas teniendo en cuenta su origen, profundidad y duración (García González et al., 2013; Percival, 2002).

Las heridas ocasionadas por **quemaduras** se clasifican según su profundidad en tres grados principales:

- **Primer grado:** Afectan únicamente a la epidermis y, en general, no presentan complicaciones significativas, logrando cicatrizar en un plazo de una a dos semanas.
- **Segundo grado:** Pueden dividirse en superficiales y profundas, y presentan un mayor riesgo de infección debido a la afectación de capas más internas de la piel.
- **Tercer grado:** Son las más graves, caracterizadas por la formación de ampollas y la pérdida total de las capas superficiales y profundas de la piel.

Las heridas cutáneas, especialmente las quemaduras de segundo y tercer grado, tienen una alta susceptibilidad a infecciones por microorganismos. En estos casos, resulta conveniente el uso de vendajes que incluyan agentes antimicrobianos en su composición. Dichos componentes antisépticos pueden utilizarse tanto de manera preventiva como en heridas que ya se encuentran infectadas (Norman et al., 2017).

Entre los beneficios adicionales de los hidrogeles en el tratamiento de quemaduras se encuentra su capacidad para reducir la temperatura en el área afectada, lo cual resulta crucial para evitar la extensión de la lesión, proteger las membranas basales celulares y disminuir el riesgo de formación de cicatrices (Surowiecka et al., 2022). Asimismo, dependiendo de su composición, los hidrogeles pueden proporcionar analgesia, reduciendo significativamente el dolor asociado. Su suavidad, elasticidad y flexibilidad facilitan su aplicación, mejorando la comodidad del paciente. Por estas razones, entre otras, los hidrogeles son ampliamente reconocidos como la opción más adecuada para el tratamiento de heridas por quemaduras (Alex et al., 2024).

En el tratamiento de heridas **agudas** de origen **traumático** o **quirúrgico**, el objetivo inicial consiste en detener el sangrado y controlar la inflamación. Para este propósito, los hidrogeles con capacidad hemostática representan una herramienta eficaz, ya que contribuyen a reducir el sangrado y facilitan el cierre de la herida. Entre las alternativas, se destacan los hidrogeles inyectables (Zhu et al., 2022) o formulados en formato de polvo. Las partículas de **microgeles** en polvo presentan ventajas significativas para la hemostasia de heridas agudas, dado que su mayor superficie específica permite la absorción de grandes cantidades de agua. Esto favorece la concentración de células sanguíneas en la zona afectada, promoviendo así el cese del sangrado. Además, su aplicación en formato de polvo asegura una mejor adaptación a distintas formas y ubicaciones de las heridas (Yan et al., 2017).

Por otro lado, ciertas heridas pueden evolucionar hacia una condición **crónica** con el paso del tiempo. Por ejemplo, en pacientes con diabetes, el proceso de cicatrización suele estar alterado, ya que las heridas crónicas tienden a permanecer en la fase inflamatoria. Una complicación frecuente en estos pacientes es la aparición de úlceras en los pies, que, si no son tratadas adecuadamente, pueden tardar meses en cicatrizar y presentar un alto riesgo de infección (Dumville et al., 2017). Otro tipo de heridas crónicas son las úlceras por presión o escaras, que ocurren como consecuencia de una movilidad reducida, lesiones medulares o una perfusión deficiente. Estas heridas no solo generan dolor, sino que también impactan negativamente en la calidad de vida de las personas afectadas. El tratamiento habitual incluye vendajes y agentes tópicos como cremas, geles o ungüentos (Westby et al., 2017).

El uso de hidrogeles como apósitos representa una alternativa prometedora, ya que permiten mantener la zona afectada hidratada, condición esencial para el proceso de cicatrización. En la actualidad, se investigan hidrogeles enriquecidos con agentes antioxidantes capaces de favorecer la curación de las heridas (Z. Xu et al., 2020). Asimismo, se evalúa el diseño de hidrogeles con inmunomoduladores que regulen la actividad de los macrófagos, promoviendo la transición de la fase inflamatoria hacia las etapas posteriores de cicatrización. Otras estrategias incluyen la liberación controlada de fármacos por parte de los hidrogeles o el desarrollo de hidrogeles proangiogénicos, que podrían mejorar significativamente el tratamiento de este tipo de lesiones (Firlar et al., 2022).

1.2.2 Uso de hidrogeles como apósitos.

Idealmente, las heridas deben mantenerse en condiciones de humedad y temperatura similares a las del ambiente corporal interno. Con este objetivo, los materiales utilizados en estos casos, como los hidrogeles, son diseñados para conservar dichas condiciones mediante la absorción de exudados, el mantenimiento de la hidratación y la protección frente a microorganismos (Wang et al., 2023). En este contexto, una de las propiedades clave a considerar en el desarrollo de estos materiales es su capacidad de absorción e hinchamiento.

Asimismo, se ha observado que el uso de hidrogeles fomenta la proliferación, diferenciación y migración de células epiteliales (Shi et al., 2020), procesos esenciales para la curación de heridas. Estos materiales suelen ser biocompatibles, especialmente cuando están compuestos por polímeros naturales, y presentan propiedades mecánicas similares a las de ciertos tejidos (Kaith et al., 2021).

Una de las principales complicaciones asociadas a las heridas es el desarrollo de infecciones. Cuando esto ocurre, la fase inflamatoria se prolonga, retrasando el proceso de cicatrización (Shen et al., 2023). En este sentido, los hidrogeles pueden adquirir actividad antimicrobiana debido a la naturaleza de los polímeros empleados, que pueden presentar esta propiedad de forma intrínseca, o mediante funcionalización, como la incorporación de compuestos activos o nanopartículas. Adicionalmente, el uso de hidrogeles como apósitos puede prevenir complicaciones relacionadas con la inflamación crónica, el aumento de la presión local, el exceso de exudados y la baja perfusión (Derakhshandeh et al., 2018). Otra ventaja destacada de los hidrogeles radica en su estructura blanda y porosa, que facilita el transporte de oxígeno hacia la herida (Sarmah et al., 2023). Las ventajas específicas de estos materiales dependen tanto de su composición como del tipo de heridas en las que se aplican.

1.3 Diseño de hidrogeles para aplicaciones biomédicas.

1.3.1 Polielectrolitos.

Los polímeros se encuentran cargados en soluciones acuosas a pH específicos, actuando como polianiones o policationes según si poseen carga negativa o positiva, respectivamente. Estos polímeros interactúan principalmente mediante fuerzas electrostáticas entre sus cargas opuestas, aunque también pueden contribuir otros tipos de interacciones, como los puentes de hidrógeno o las

interacciones hidrofóbicas, dependiendo de las características químicas de los polímeros involucrados (Hu et al., 2020). Los hidrogeles formados por estos mecanismos se denominan hidrogeles físicos y pueden presentar propiedades mecánicas equivalentes o incluso superiores a las de los hidrogeles químicos, dependiendo de las interacciones no covalentes involucradas. Estas redes físicamente entrecruzadas destacan por su capacidad de recuperación frente a esfuerzos mecánicos, ya que las interacciones reversibles permiten disipar energía y reconstruir la red tras ciclos de carga y descarga, lo que las hace dinámicas y adaptables (Shu et al., 2019).

1.3.1.1 Quitosano.

El quitosano es un biopolímero biodegradable y ecoamigable, lo que lo hace adecuado para su aplicación en la industria biomédica. Se obtiene mediante la desacetilación de la quitina, una proteína presente en el exoesqueleto de insectos, crustáceos, cefalópodos y algunos hongos (Moeini et al., 2020; Soubhagya et al., 2020). Según Bano et al., su aplicación en apósitos para heridas permite reducir complicaciones tales como las infecciones, además de promover la revascularización, disminuir el sangrado y ofrecer propiedades analgésicas. Tanto el quitosano como la quitina han demostrado capacidad para aliviar el dolor asociado a la inflamación de heridas (Bano et al., 2017).

Químicamente, el quitosano se conoce como β -(1-4) -2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa y está compuesto por unidades de N-acetil-glucosamina y N-glucosamina (Figura 1.5) (Moeini et al., 2020). Sus grupos amino le confieren un carácter catiónico en solución, permitiéndole formar complejos polielectrolitos (PECs) en medios ácidos cuando el pH está por debajo de su punto isoeléctrico (cerca de 6,3) (Popat et al., 2012). Aunque el quitosano es insoluble en agua, se disuelve en solventes orgánicos, como el ácido acético, dependiendo del pH del medio y del grado de desacetilación (Pillai et al., 2009).

Las propiedades del quitosano varían según su peso molecular, grado de acetilación y estructura, entre otros factores (Hamedi et al., 2018). Sin embargo, una de las principales limitaciones de este polímero es su baja resistencia mecánica y estabilidad (Khorasani et al., 2021). Por este motivo, se utiliza en combinación con otros polímeros para potenciar sus beneficios en la curación de heridas.

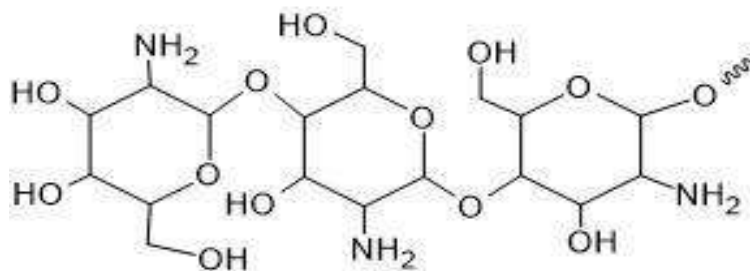


Figura 1.5. Estructura química del quitosano.

1.3.1.2 Pectina.

La pectina es un heteropolisacárido natural presente en las paredes celulares de las plantas. Este polímero es biodegradable, biocompatible, de bajo costo y cuenta con diversas aplicaciones en biomedicina (Giusto et al., 2017). Además, posee propiedades antiinflamatorias (Wu et al., 2020) y antibacterianas (Kocaağa et al., 2024), lo que la hace especialmente interesante para el desarrollo de apósitos para heridas (Alsakhawy et al., 2022; Koshy and Sangeetha, 2024).

Desde el punto de vista químico, la pectina está compuesta por una cadena de ácido galacturónico, cuyos grupos carboxilo pueden estar parcial o totalmente esterificados con grupos metoxilo (Edirisinghe et al., 2020), como se ilustra en la Figura 1.6. Dependiendo de su grado de esterificación, la pectina puede clasificarse en dos tipos principales: (1) Pectina de alta esterificación, posee un alto contenido de grupos metoxilo, lo que reduce la cantidad de grupos carboxilo disponibles con carga negativa, (2) Pectina de baja esterificación, contiene menos grupos metoxilo, lo que permite una mayor disponibilidad de grupos carboxilo con carga negativa (Amirian et al., 2021). El grado de esterificación afecta directamente las propiedades fisicoquímicas de la pectina y, por ende, su comportamiento en diferentes aplicaciones. La carga negativa de los grupos carboxilo depende del pH del medio, se observa en valores de pH superiores a su punto isoeléctrico (pI), el cual es de aproximadamente 3,5 (Flutto, 2003). Por esta razón, al diseñar materiales a base de pectina, es crucial considerar tanto el pH de trabajo como el grado de metoxilación, ya que estos factores determinan las interacciones entre polímeros y su funcionalidad en aplicaciones específicas (Ofori-Kwakye et al., 2006; Yoo et al., 2006).

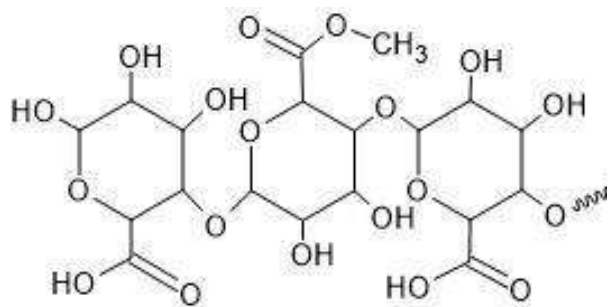


Figura 1.6. Representación de la estructura química de la pectina.

1.3.1.3 Gelatina.

La gelatina es un polímero natural y biocompatible, es una proteína de origen animal que se obtiene a partir de la degradación del colágeno (Fakhouri et al., 2013). Este material presenta utilidad en el desarrollo de apósitos para heridas debido a su alta capacidad de absorción de exudados y fluidos celulares (Chaibi et al., 2015). Además, su similitud con la matriz extracelular le permite inducir una respuesta celular (Anitua et al., 2022).

En la Figura 1.7 se presenta su estructura química. La gelatina está compuesta por macromoléculas formadas por residuos de aminoácidos, cuya proporción relativa y distribución a lo largo de la cadena polimérica puede variar (Chaibi et al., 2015). La carga de la gelatina depende del pH del medio en el que se encuentra. Al tratarse de un polímero anfotérico, su comportamiento iónico varía según el pH: en condiciones ácidas, la gelatina adquiere una carga neta positiva, ya que tanto los grupos amino como carboxilo se encuentran protonados. En cambio, a pH elevados, la carga neta se vuelve negativa debido a la desprotonación de los grupos carboxilo (COOH), que pasan a formar grupos carboxilato (COO⁻). Por su parte, los grupos amino tienden a permanecer desprotonados en medios alcalinos, dado que la alta concentración de iones hidroxilo (OH⁻) compite por los protones disponibles, dificultando su protonación. Estas características hacen que la gelatina sea capaz de formar PECs y le permiten actuar como polianión o policación, dependiendo del pH del medio en el que se emplee (Devi et al., 2016).

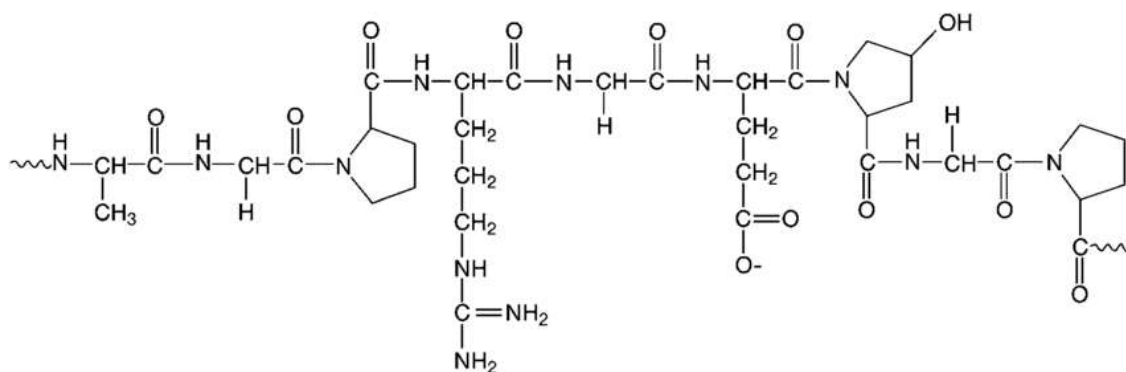


Figura 1.7. Estructura química de la gelatina.

1.3.1.4 Condroitín sulfato.

Se trata de un polímero natural obtenido de la matriz extracelular de animales. Su aplicación en el ámbito biomédico se debe a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiapoptóticas, antitumorales y anticoagulantes. Además, su durabilidad puede incrementarse mediante la formación de PECs con compuestos catiónicos (Bonkovoski et al., 2021).

Desde el punto de vista químico, es un glicosaminoglicano compuesto por ácido glucurónico y unidades disacáridas de N-acetil-galactosamina (Nakano et al., 2010). En solución, cuando el pH es superior a su pl, adquiere una carga neta negativa debido a la presencia de grupos sulfato en su estructura (Figura 1.8) (Gonzalez et al., 2020). La funcionalidad biológica y las propiedades físicas de este polímero dependen en gran medida de estos grupos sulfato, ya que le otorgan características polielectrolíticas, facilitando su interacción con otras moléculas cargadas y regulando diversos procesos biológicos. Además, los grupos carboxilo presentes en los ácidos glucurónicos también contribuyen a la carga negativa del condroitín (Sharma et al., 2019).

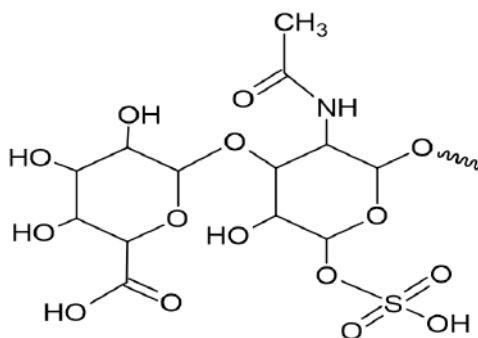


Figura 1.8. Estructura química del condroitín sulfato.

1.3.2 Estructura interna de los hidrogeles: Formación de la matriz polimérica.

Los polímeros pueden interactuar de diversas maneras para formar hidrogeles, ya sea mediante interacciones físicas o químicas, como se ilustra en la Figura 1.9 (Akhtar et al., 2016).



Figura 1.9. Resumen de las posibles maneras de entrecruzamiento polimérico para la síntesis de hidrogeles, de acuerdo a lo publicado por Akhtar et. al. (Akhtar et al., 2016).

En esta tesis se explora específicamente la interacción iónica entre polímeros como método de entrecruzamiento. Este tipo de interacción considera el punto isoeléctrico (pI) de los polímeros al preparar soluciones acuosas, ajustando el pH de manera que estos adquieran cargas positivas o negativas. La mezcla de una solución de un polianión con una de un polication genera la formación de PECs (Meka et al., 2017).

Posteriormente, es posible compactar estos complejos para obtener complejos polielectrolitos compactos (CoPECs). Este proceso suele realizarse mediante centrifugación, aunque también se pueden emplear otros métodos, como la extrusión (Schaaf and Schlenoff, 2015). La compactación de los hidrogeles ofrece varias ventajas, entre las que destaca la mejora de sus propiedades mecánicas. Además, la estructura interna y la interacción entre las cadenas poliméricas sufren modificaciones significativas durante este proceso, lo que puede dar lugar a la formación de poros según la naturaleza de las interacciones entre los polielectrolitos (Hariri and Schlenoff, 2010).

1.3.3 Incorporación de sales.

A los PECs se les pueden adicionar sales inorgánicas con el propósito de incrementar su conductividad eléctrica, disminuir su punto de congelamiento y/o mejorar sus propiedades mecánicas (S. Li et al., 2020). La morfología de los hidrogeles formados mediante PECs varía en función de la cantidad de sales incorporadas, la concentración de polímeros utilizados y el balance de agua presente en el sistema (Wang and Schlenoff, 2014).

Las interacciones predominantes entre las cadenas poliméricas de policación y polianión pueden ser desplazadas o modificadas por las interacciones electrostáticas con los iones provenientes de la sal. Como resultado, las propiedades mecánicas y la movilidad de las cadenas del hidrogel experimentan variaciones significativas dependiendo de la cantidad de sal incorporada (Bediako et al., 2023).

Tal como se ilustra en la Figura 1.10, los iones de la sal, como el NaCl, interactúan electrostáticamente con las cadenas poliméricas, lo que genera cambios en la red tridimensional del hidrogel. Estas modificaciones en la red polimérica afectan tanto su estructura como sus propiedades funcionales, influyendo directamente en su aplicabilidad.

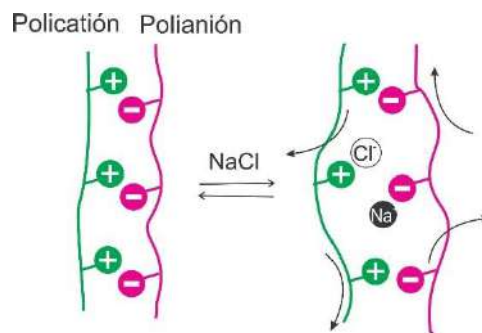


Figura 1.10. Esquema que representa el efecto dopante de la sal al interferir en la interacción entre las cadenas de los polielectrolitos.

El efecto descrito se conoce como efecto dopante de la sal. Sin embargo, en algunos casos, la incorporación de sal no afecta de manera significativa la estructura del hidrogel (Dautzenberg, 1997). Este efecto depende de los polímeros empleados y de la densidad de carga final del hidrogel, la cual puede aumentar o disminuir como consecuencia de la adición de NaCl. Los hidrogeles que contienen sal en su composición son denominados saloplásticos (Bediako et al., 2023).

En el diseño de hidrogeles para su uso como apósitos para heridas, es esencial que estos materiales presenten una rigidez adecuada que permita su adaptación a la morfología de la herida. Simultáneamente, deben mantener una resistencia mecánica suficiente para evitar su ruptura durante el proceso de aplicación y uso. La adición de NaCl también puede contribuir al efecto antimicrobiano de los hidrogeles, ya que se sabe que presenta actividad antibacteriana y, además, puede aportar una mayor estabilidad estructural (Sofos, 1984; Wijnker et al., 2006).

Por otro lado, la viscoelasticidad de los hidrogeles puede verse afectada, la incorporación de NaCl puede incrementar la rigidez de las cadenas poliméricas (Yang et al., 2020). Este efecto se observa particularmente a bajas concentraciones de sal, mientras que a altas concentraciones las interacciones electrostáticas entre las cadenas se debilitan. Asimismo, la adición de NaCl modifica las características estructurales de los PECs (Kulkarni et al., 2016), lo que impacta en la respuesta de los hidrogeles ante diferentes estímulos. En este contexto, resulta relevante estudiar la formulación y caracterización de hidrogeles con NaCl en su composición, considerando sus propiedades mecánicas, antimicrobianas y estructurales.

1.4 Estado del arte: Revisión de patentes.

El mercado del cuidado avanzado de heridas ha surgido como respuesta a la necesidad de optimizar la curación de heridas crónicas y agudas, impulsado especialmente por el descubrimiento en 1962 de que las heridas cicatrizan más rápido en condiciones húmedas. Este hallazgo catalizó el desarrollo de productos innovadores, como apósitos oclusivos y semioclusivos, marcando el inicio de una industria en constante expansión (Madden and Stark, 2019). Actualmente, este mercado incluye el desarrollo de nuevos materiales para vendajes, materiales inteligentes que actúan como andamios o sistemas de liberación de fármacos, así como avances en terapia celular y trasplantes de tejido (Mirhaj et al., 2022). Según un informe de *Markets and Markets*, se espera que el mercado global de cuidado avanzado de heridas alcance aproximadamente \$17.7 mil millones para 2027, con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 9,4% desde 2022 hasta 2027 (Markets and Markets, n.d.). Además, un estudio de *Grand View Research* estimó que el mercado global de apósitos avanzados para heridas se valoró en aproximadamente \$7,4 mil millones en 2022 y se espera que crezca a una CAGR del 4,5% desde 2023 hasta 2030. Este crecimiento está impulsado por la ascendente demanda

debido a los avances tecnológicos y el aumento de la prevalencia de heridas crónicas (Grand View Research, n.d.).

En este contexto, los derechos de propiedad intelectual (PI), particularmente las patentes, desempeñan un papel fundamental en la protección de invenciones innovadoras y formulaciones novedosas de hidrogeles. Estas garantías no solo otorgan exclusividad a los investigadores y desarrolladores, fomentando la inversión en investigación y desarrollo, sino que también refuerzan la ventaja competitiva y facilitan la exclusividad en el mercado. Además, las patentes abren oportunidades para licencias y asociaciones estratégicas, promoviendo la colaboración entre universidades e industrias y acelerando la innovación en aplicaciones de hidrogeles, como en sistemas de liberación de fármacos o ingeniería de tejidos (Saha and Bhattacharya, 2011). Este marco permite a los titulares de patentes monetizar sus invenciones a través de acuerdos de licencia, consolidando el papel de la PI en un mercado altamente competitivo.

Para explorar las tendencias en el patentamiento de productos basados en hidrogeles destinados al cuidado de heridas, se realizó una búsqueda de patentes en Espacenet, una plataforma gratuita y accesible, desarrollada por la Oficina Europea de Patentes, que alberga aproximadamente 150 millones de documentos de todo el mundo ("Espacenet – patent search," n.d.). La estrategia de búsqueda consistió en una consulta avanzada utilizando palabras clave en inglés como "hydrogels," "polyelectrolyte complexes," "wound dressings," y "natural polymers," tanto en singular como en plural, junto con sus sinónimos, que referencian estas palabras en cualquier parte del texto. Los resultados incluyeron patentes publicadas en los últimos 20 años a nivel global.

La búsqueda inicial arrojó 753 resultados. Posteriormente, al aplicar un filtro de periodo entre 2004 y 2024, se redujeron los resultados a 681, lo que indica que una gran proporción de las publicaciones relevantes se concentra en las últimas dos décadas. Esto podría reflejar un incremento en la investigación y desarrollo en este campo durante este periodo, aunque debe considerarse que la antigüedad de las patentes en Espacenet puede variar dependiendo de las oficinas de origen y las políticas de indexación. Para refinar aún más los resultados, se aplicaron filtros de Clasificación Internacional de Patentes (IPC) y Clasificación Cooperativa de Patentes (CPC). Para ello previamente se realizó una búsqueda en el apartado "Búsqueda de clasificación" para evaluar qué clasificación sería la más cercana a lo que buscamos. De esta manera se seleccionaron los incluidos en el grupo "A61" (Salud; Ciencias médicas o veterinarias; higiene), con 538 resultados. Cabe destacar que

podrían incorporarse otras clasificaciones para abordar aspectos relacionados con procesos químicos de síntesis u otros parámetros.

La Figura 1.11 ilustra el número anual de publicaciones de patentes, centrándose en la fecha de publicación más temprana de cada familia de patentes, ya que esto proporciona una indicación más clara del cronograma de innovación. El año 2011 tuvo el mayor número de publicaciones con un total de 41, seguido del 2012 y 2017 con 39 publicaciones cada uno, reflejando tendencias clave en la innovación del sector.

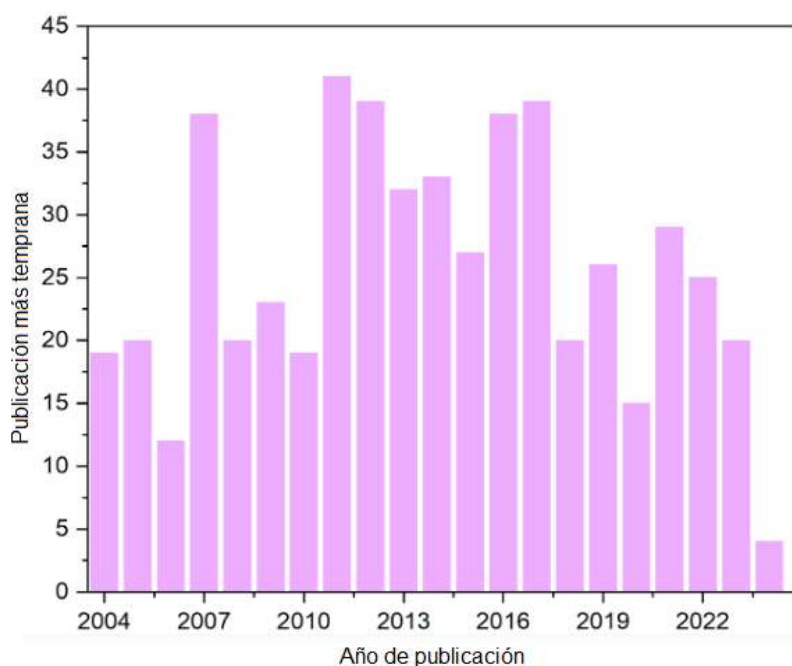


Figura 1.11. Cantidad de publicaciones más tempranas de patentes (por familia) con el paso de los años, desde 2004 hasta 2024 inclusive.

Sabiendo que existen diferentes métodos de síntesis de hidrogeles, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos por otras técnicas, excluyendo la formación de PECs. De esta manera, se identificaron 13,611 patentes relacionadas con otros métodos de síntesis, lo que permite inferir que la formación de PECs para la cicatrización de heridas representa solo alrededor del 4% de las técnicas descritas.

Además, se analizó la frecuencia de uso de diferentes polímeros en las patentes. En el caso de los PECs, el quitosano fue el polímero predominante, mencionado en el 76,3% de las patentes, seguido por la celulosa, la gelatina y el alginato. Para los hidrogeles sintetizados por otros métodos, los polímeros más mencionados fueron la celulosa, el colágeno y la gelatina, destacando también el

alginato, el quitosano y el ácido hialurónico. Estos resultados destacan la versatilidad y popularidad de estos polímeros en PECs y pueden observarse resumidos en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Resultados de búsquedas de patentes donde se mencionan diferentes polímeros para la formulación de hidrogeles y el porcentaje en que estos aparecen en el total de publicaciones consideradas.

Polímero	Polímero utilizado para hidrogeles PECs (%)	Polímero utilizado para hidrogeles por otros métodos de síntesis (%)
Agarosa	26,7	19,9
Alginato	70,3	48,8
Celulosa	71,8	66,4
Quitosano	76,3	44,9
Condroitín sulfato	36,4	13,8
Colágeno	73,5	64,6
Dextrano	47,7	34,4
Elastina	27,6	19,7
Gelatina	70,5	60,7
Goma arábica	12,2	12,9
Heparina	50,8	28,9
Ácido hialurónico	67,2	44,7
Pectina	24,3	18,2
Seda	21,2	18,7

1.5 Objetivos.

El **objetivo general** de esta tesis fue desarrollar hidrogeles compuestos a partir de polielectrolitos naturales con potencial aplicación futura como apósitos para heridas.

Para lograr el objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- Estudiar el efecto de los parámetros de formulación en las propiedades de los hidrogeles (morfológicas, texturales y de hinchamiento), considerando variables como el pH, la concentración polimérica y la concentración de NaCl.
- Caracterizar los hidrogeles obtenidos mediante técnicas avanzadas, tales como análisis termogravimétrico (para propiedades térmicas), microscopía electrónica de transmisión o barrido (para características morfológicas), difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja por

transformada de Fourier y potencial zeta (para propiedades físico-químicas). Asimismo, realizar ensayos de compresión estática y dinámica, así como nanoindentación, para evaluar sus propiedades mecánicas.

- Evaluar las propiedades biológicas específicas para su uso como apósitos para heridas mediante ensayos *in vitro* con células o microorganismos y ensayos *in vivo*.
- Seleccionar los hidrogeles más adecuados para aplicaciones potenciales en la cicatrización de heridas, considerando los resultados de las caracterizaciones previamente mencionadas.
- Optimizar las propiedades de los hidrogeles para aplicaciones biomédicas mediante la incorporación de NaCl, nanopartículas de plata, nanohilos de celulosa y lidocaína, con el objetivo de mejorar su funcionalidad, incluyendo propiedades antibacterianas, mecánicas y capacidad de liberación de fármacos.

Capítulo 2.

Materiales y métodos.



2.1 Polímeros utilizados.

Dos de los polímeros naturales utilizados para la elaboración de los hidrogeles fueron **quitosano (Q)** y **pectina (P)**. El Q fue adquirido en una farmacia local en Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, con un peso molecular de 230 kDa, medido mediante Ubbelohde modelo 1c, y un grado de desacetilación del 95,0 %, determinado mediante Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) mediante la relación entre las bandas de los grupos amino y amida. La P fue adquirida en Sigma-Aldrich, con un contenido de ácido galacturónico $\geq 74\%$, peso molecular de 485 kDa y grado de metoxilación de 57,9 % (W. Wang et al., 2020).

Asimismo, se elaboraron hidrogeles utilizando otros dos polímeros. Se utilizó **gelatina (Ge)** comercial de Sigma-Aldrich, derivada de piel de cerdo, tipo A, con determinación cuantitativa entre 70-90% (ensayo de Biuret) y un pl entre 7 y 9,5. Además, se utilizó **condroitín sulfato (CS)**, adquirido en una farmacia local de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, con un peso molecular aproximado de 108 kDa, determinado mediante Ubbelohde modelo 1c.

2.2 Factores clave en el diseño de hidrogeles.

En el diseño de los hidrogeles, se consideró que el grado de interacción para la formación de los PECs varía según el pH utilizado y la concentración de los polímeros. Además, se incorporó NaCl con el fin de obtener materiales saloplásticos y permitir la comparación de sus propiedades.

2.2.1 pH.

Para la formulación de los hidrogeles de quitosano y pectina (QP), se prepararon soluciones buffer utilizando ácido acético glacial (99,5 % de Laboratorios Cicarelli) y bicarbonato de sodio (Química Industrial KUBO S.A.) para obtener pHs de 4, 4,5 y 5. Estos valores de pHs fueron seleccionados teniendo en cuenta los pl de Q y P, ya que en este rango ambos polímeros presentan sus grupos funcionales cargados. De acuerdo con esta consideración, también se elaboraron los hidrogeles de gelatina y condroitín sulfato (GCS), utilizando pHs de 3,5 y 4. Estos valores fueron seleccionados a partir de los resultados obtenidos en estudios previos en los que se emplearon estos polímeros (González et al., 2020).

2.2.2 Concentración polimérica.

Para los hidrogeles de QP, se evaluó la formulación utilizando concentraciones de polímeros de 5 mg/ml o 10 mg/ml, en una proporción 1:1, ya que esta proporción suele ser empleada para la formulación de hidrogeles (Birch et al., 2015; Bombaldi de Souza et al., 2019). Las concentraciones utilizadas son relativamente bajas, ya que de esa manera se favorece la difusión y cinética permitiendo que la interacción entre los polielectrolitos sea mayor (Schaaf and Schlenoff, 2015).

Para los hidrogeles de GCS, se evaluaron diversas concentraciones poliméricas (5, 10, 15, 20 y 25 mg/ml), así como diferentes combinaciones de proporciones entre los polímeros. Esta variabilidad se debió a que algunos de los hidrogeles no se formaron correctamente en un principio. Además, se consideraron los resultados del estudio realizado por González et al. (Gonzalez et al., 2020). La proporción en la que se combinaron las soluciones poliméricas y las concentraciones finales consideradas óptimas para la formulación de microgeles con estos polímeros se determinaron a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización.

2.2.3 Sal.

Se incorporaron distintas concentraciones de NaCl: 0, 0,15 y 0,5 M, con el objetivo de evaluar cómo se modificaban las propiedades de los hidrogeles debido a esta incorporación y si los efectos se acentuaban o no al variar la concentración de sal. La elección de NaCl se fundamentó en los efectos que los iones ejercen sobre los PECs, tal como se detalló en el Capítulo 1, sección 1.3.3.

2.3 Formulación de hidrogeles.

2.3.1 Preparación de hidrogeles de quitosano y pectina.

Se prepararon 36 soluciones (18 de Q y 18 de P), variando los parámetros mencionados, y se homogeneizaron mediante agitación magnética hasta la completa disolución de los polímeros. Posteriormente, se mezclaron por goteo ambas soluciones poliméricas, manteniendo la agitación magnética constante a 300 rpm (Stuart CD162 Digital Stirrer/Hotplate). Las soluciones se dejaron interactuar en agitación durante una hora. A continuación, se transfirieron a tubos Falcon y se centrifugaron a 8000 rpm durante 30 minutos (High Speed Centrifuge, Neofuge 15), hasta obtener los geles compactos al fondo del tubo, como se observa en la Figura 2.1.

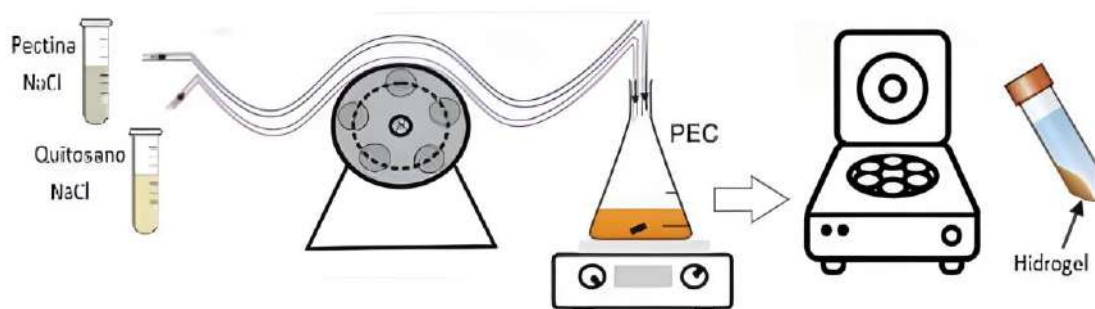


Figura 2.1. Esquema de la formulación de los hidrogeles QP.

El sobrenadante se descartó, y los hidrogeles se pesaron, fotografiaron y almacenaron en heladera hasta las próximas caracterizaciones. Además, se calculó el porcentaje teórico de agua presente en los hidrogeles, considerando que la totalidad de la masa de polímeros y sal quedaron en el hidrogel después de la centrifugación.

Para corroborar que se necesitan ambos polielectrolitos para formar los hidrogeles, se realizaron soluciones de Q con NaCl y de P con NaCl a pH 4 y, una vez homogéneas, se centrifugaron.

2.3.2 Síntesis de hidrogeles de gelatina y condroitín sulfato.

Primero se prepararon las soluciones buffer correspondientes. Luego, estas se dividieron en distintos tubos y a algunos se les incorporó NaCl. A continuación, se añadieron los polímeros en la concentración deseada, y se dejaron homogeneizar con agitación magnética durante el tiempo necesario (aproximadamente 1 hora). En el caso de las soluciones que contenían Ge, se homogeneizaron a 40 °C para favorecer su disolución.

Una vez realizadas las soluciones y ajustado el pH correspondiente, se mezclaron, por goteo, la solución de Ge con la de CS, manteniendo agitación constante a 300 rpm y 40 °C (Stuart CD162 Digital Stirrer/Hotplate). Posteriormente, se dejó en agitación durante 50 minutos adicionales.

Para obtener los hidrogeles compactos, se centrifugaron las muestras. Antes de realizar este paso, se colocaron en tubos Falcon y se dejaron en heladera durante un mínimo de 30 minutos. La centrifugación se llevó a cabo a 8000 rpm durante 30 minutos (High Speed Centrifuge, Neofuge 15). Una vez centrifugadas, las muestras volvieron a la heladera durante al menos 30 minutos, y se descartó el sobrenadante.

2.3.3 Obtención de microgeles de gelatina y condroitín sulfato.

Los microgeles son un tipo específico de hidrogel con dimensiones micrométricas. Para mayor claridad y evitar confusiones entre los términos "hidrogeles" y "microgeles", se diferenciarán en este trabajo, a pesar de que ambos se consideran parte de la categoría general de hidrogeles.

Para la síntesis de microgeles, se modificó la etapa de compactación: no se centrifugaron las mezclas poliméricas, sino que se secaron por aspersion (LSD-48 mini spray dryer JISL) hasta obtener un polvo. Los parámetros de funcionamiento del equipo de secado por aspersion fueron: temperatura de entrada 120 °C, temperatura de salida 73 °C, presión del aspirador 55 (entre 200-210 mm de mercurio) y alimentación de la bomba al 20%. Estos parámetros fueron seleccionados luego de varios ensayos de prueba, en los cuales se modificaron las temperaturas (Anexo 3).

2.4 Incorporación de refuerzos y principios activos a los hidrogeles.

2.4.1 Nanopartículas de plata como refuerzo funcional.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) fueron obtenidas en colaboración con otro grupo de investigación del Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC). Su formulación se llevó a cabo mediante técnicas eco-amigables, partiendo de *Trichoderma harzianum*, una especie de hongo que reduce el nitrato de plata (Consolo et al., 2020). Las AgNPs son esféricas, con un tamaño de 19 ± 6 nm, determinado mediante microscopía (Ferrante et al., 2025).

2.4.1.1 Incorporación a hidrogeles de QP.

La incorporación de AgNPs a los hidrogeles se realizó pesando las nanopartículas de forma que representaran un 1% del peso de los polímeros. Las AgNPs se colocaron en la solución buffer correspondiente y se homogeneizó mediante agitación constante durante al menos 1 hora. Luego, la solución con las AgNPs se dividió y se le añadió NaCl y Q o P, según corresponda. El resto del procedimiento es igual al descrito para la formulación de los hidrogeles sin nanopartículas.

2.4.1.2 Incorporación a hidrogeles y microgeles de gelatina y condroitín sulfato.

El ensayo de potencial zeta a pH 3,5 con una concentración de nanopartículas de 0,05 mg/ml arrojó un valor de $-13,5 \pm 4,3$ mV. Teniendo en cuenta este valor, se decidió que la mejor estrategia

era incorporar las nanopartículas a la solución de CS y luego combinarla con la de Ge para obtener un hidrogel compuesto por un 1% de AgNPs sobre la masa total de polímeros. Su incorporación se realizó tanto para los hidrogeles como para el polvo de microgeles.

2.4.2 Incorporación de nanohilos de celulosa a la matriz del hidrogel.

Se partió de celulosa microcristalina (MCC, Sigma Aldrich), se realizaron dispersiones de MCC en agua destilada y se aplicó energía ultrasónica a través de una punta (30 minutos al 40% de amplitud y 58653 J de energía). Luego, se descartó el sobrenadante y se liofilizó el contenido para obtener los nanohilos de celulosa (CNWs). Para este proceso se utilizó un equipo de punta ultrasónica: modelo Vibra-cell VCX750; potencia 750 W; frecuencia 20 kHz; sonda estándar VCX750; punta modelo 219-B (630-0219); diámetro de la punta 13 mm.

2.4.2.1 Incorporación a hidrogeles de quitosano y pectina.

Los CNWs se incorporaron a los hidrogeles siguiendo dos estrategias:

- a) *Hinchamiento en una dispersión de CNWs de los hidrogeles formados:* Se añadió 1 mg/ml de concentración de CNWs a 10 ml de agua destilada y se hincharon las muestras de hidrogeles de 0,25 g promedio de QP con o sin NaCl en su composición durante 24 horas.
- b) *Adición a una solución de polímeros antes del proceso de gelificación:* Se incorporaron partes iguales de CNWs a las soluciones precursoras de Q y P, teniendo o no NaCl en su composición. Los mg de CNWs se calcularon considerando una cantidad total de 4, 10, 20 o 30% de nanohilos en comparación con la masa de los polímeros.

2.4.2.2 Incorporación a hidrogeles de GCS.

Se utilizó la misma nanocelulosa que fue sintetizada y caracterizada para los hidrogeles de QP. La incorporación del refuerzo se realizó en la solución madre de polímeros a distintos porcentajes: 4, 10, 20 y 30% de masa de CNWs sobre masa de los polímeros. Esto se realizó a pH 3,5 con una concentración de 15 mg/ml de polímeros y 0 o 0,15 M de NaCl, y con 20 mg/ml de condroitín y 10 mg/ml de Ge sin NaCl.

2.4.3 Lidocaína como compuesto activo en los hidrogeles.

2.4.3.1 Incorporación a hidrogeles de quitosano y pectina.

Se utilizó lidocaína (LD) viscosa al 2% p/p de Denver Farma (Argentina). Se prepararon 6 ml de solución de LD con 54 ml de buffer (para obtener una concentración final de 2 mg/ml de LD en la muestra). La mezcla se mantuvo en agitación durante unos minutos para homogeneizar, y luego se incorporaron los polímeros y la sal.

2.4.3.2 Eficiencia de encapsulación de lidocaína.

Dado que la LD se detecta a 255 nm en espectroscopía UV-Visible (Abou-Okeil et al., 2018; Long et al., 2019), se decidió determinar la cantidad de LD que retiene el hidrogel. Para esto, después de mezclar las soluciones poliméricas y centrifugar para obtener los hidrogeles, se conservó el sobrenadante y se determinó la cantidad de LD libre.

Para la determinación de LD, se utilizó una bolsa de diálisis en la que se incorporaron 10 ml del sobrenadante. El sistema se colocó en un vaso de precipitados con 250 ml de agua destilada y se dejó en agitación a 200 rpm durante 7 días. El peso molecular de corte de la bolsa de diálisis es de 12-14.000 Da, lo que permite que la LD pase a través de los poros y no así los polímeros que no se hayan entrecruzado. Tras este tiempo, se determinó la absorbancia en el UV-Visible correspondiente a la longitud de onda de la LD. Posteriormente, se realizó una curva de calibración de lidocaína en agua destilada para poder calcular la concentración. Con este valor, se obtuvieron los mg presentes en el sobrenadante y, por diferencia, los mg de lidocaína presentes en el hidrogel.

Para determinar la eficiencia de encapsulación, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{LD_{enc}}{LD_{total}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Donde LD_{enc} equivale a los mg de LD presentes en el hidrogel en ese tiempo y LD_{total} corresponde a la cantidad total de mg adicionados. Sabiendo los mg de lidocaína que quedaron retenidos en el hidrogel, se pesó el hidrogel y se realizaron tres réplicas para llevar a cabo la curva de liberación de lidocaína.

2.4.3.3 Curva de liberación de la lidocaína.

Para realizar la curva de liberación de LD, se colocó una réplica de hidrogel en tres bolsas de diálisis junto con 3 ml de buffer fosfato salino (PBS) en cada una. Estas bolsas se sumergieron en 150 ml de PBS. Se utilizó este buffer con el objetivo de simular condiciones fisiológicas y mantener el pH del medio en un rango cercano a 7,4. Los sistemas se colocaron en un agitador orbital dentro de una estufa a 37 °C. Cada 30 minutos, durante un período de 5 horas, se extrajeron alícuotas de cada sistema y se midió la absorbancia en UV-Visible a 255 nm (Abou-Okeil et al., 2018; Long et al., 2019). Posteriormente, el volumen extraído para las mediciones fue devuelto a su frasco correspondiente con el fin de mantener un volumen constante.

El cálculo del porcentaje de liberación de LD se basó en la máxima concentración teórica de LD (LD_0), definida como la cantidad total que podría liberarse. Esta concentración se determinó a partir de los miligramos de LD incorporados en el hidrogel, considerando la eficiencia de encapsulación. Además, se midió la concentración acumulada de LD liberada en un tiempo específico (LD_t). Para ello, se utilizó la siguiente ecuación, reportada por He et al. (He et al., 2004):

$$\text{Liberación de LD (\%)} = \frac{LD_t}{LD_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

2.5 Caracterización de los polímeros de partida y de los hidrogeles.

2.5.1 Cálculo del peso molecular del condroitín sulfato.

Para determinar el peso molecular del CS, se utilizó un viscosímetro Ubbelohde modelo 1c. El día previo al ensayo, se prepararon soluciones diluidas de CS y se dejaron reposar a temperatura ambiente (21 °C). El día del experimento, el viscosímetro se lavó con agua destilada, y posteriormente se realizaron tres mediciones cronometrando el tiempo que tardó el agua destilada en atravesar los aforos. El procedimiento se repitió utilizando las soluciones de CS preparadas.

Teniendo el tiempo de dilución promedio del agua destilada (t_0) y los tiempos de dilución de las muestras (t), se calcularon la viscosidad relativa (η_r) y la viscosidad específica (η_{sp}) mediante las siguientes ecuaciones:

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

Una vez determinadas la η_r y la η_{sp} , estos valores se emplearon para obtener la viscosidad intrínseca (η). Esta se calculó como el promedio de la extrapolación a cero de las curvas η_{sp}/C y $\ln \eta_r/C$ en función de la concentración (C) de CS en las soluciones, expresada en g/ml (Paz et al., 2013).

Posteriormente, se consideraron las constantes de Mark–Houwink–Sakurada, k y a , las cuales son específicas del polímero bajo determinadas condiciones experimentales. En este caso, se utilizaron las constantes reportadas en literatura para CS en condiciones experimentales similares a las del laboratorio ($k = 0,031$ ml/g y $a = 0,74$) (Mori and Barth, 1999). Con estos datos, se determinó el peso molecular viscosimétrico (Mv) de acuerdo a la ecuación de Mark–Houwink–Sakurada:

$$Mv = \left(\frac{\eta}{k}\right)^{1/a} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

2.5.2 Evaluación de la capacidad de hinchamiento y absorción de agua.

Para los ensayos de hinchamiento, los hidrogeles se colocaron en una solución con un pH, salinidad y temperatura determinados, según las condiciones de evaluación. Los hidrogeles se pesaron antes y después del ensayo; una vez que el peso dejó de variar con el tiempo, se consideró que se había alcanzado el equilibrio. El porcentaje de hinchamiento se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{M_f - M_i}{M_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

Donde M_i y M_f hacen referencia al peso de los hidrogeles antes y después del ensayo, respectivamente. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

El ensayo de hinchamiento también se realizó en los microgeles de GCS (1: GCS-0, 2: GCS-0,15, 3: GCS-0-AgNPs y 4: GCS-0,15-AgNPs). Para este propósito, se pesaron 10 mg de cada muestra y se colocaron en tubos Eppendorf con 1 ml de solución fisiológica (SF), registrando previamente la masa de los Eppendorf vacíos. Se realizaron tres réplicas por cada muestra. Los tubos se agitaron brevemente con un vórtex y se dejaron en una estufa a 37 °C durante los tiempos establecidos (2 h, 1

h, 30 min, 15 min, 6 min y 1 min). Al finalizar, los tubos se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos (High Speed Centrifuge, Neofuge 15), se descartaron los sobrenadantes y se volvieron a pesar los Eppendorf. El hinchamiento se calculó utilizando la Ecuación 2.6.

Para los ensayos de hinchamiento y absorción de agua en los microgeles, se siguió un protocolo basado en el descrito por Chen et al. (Chen et al., 2017), con algunas modificaciones. Para asegurar la eliminación de humedad residual, los hidrogeles se secaron previamente en estufa a 40 °C durante 24 horas. Posteriormente, se colocaron 10 mg de cada muestra (M_0) sobre papel de filtro (90 mm, grado 102) en un embudo. El ensayo se realizó en triplicado para cada muestra. Con una pipeta Pasteur, se agregó agua destilada por goteo hasta observar la caída de una gota a través del embudo. A continuación, los hidrogeles se retiraron y se pesaron (M_1). Este procedimiento se realizó tanto en los cuatro microgeles como en los polímeros solos.

La tasa de absorción de agua se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de absorción de agua (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

Siendo W_0 y W_1 el peso al iniciar y al finalizar el ensayo, respectivamente.

2.5.3 Ensayo de fracción de gel.

Se cortaron muestras de geles de igual masa y se llevaron a estufa a 30 °C por 24 horas. Luego, se pesaron nuevamente y se anotó el valor (M_0). Posteriormente, las muestras se sumergieron en agua destilada, aquellas sin NaCl, o en una solución salina de 0,15 M NaCl, aquellas formuladas con 0,15 M NaCl, durante 4 días a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los geles se secaron nuevamente en estufa a 30 °C por 24 horas y se anotó la masa final (M_f), la cual permaneció constante con el paso del tiempo.

La ecuación que se utilizó para el cálculo de fracción de gel (GF) fue la siguiente:

$$GF(\%) = \frac{M_f}{M_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

Para los geles compuestos, se utilizó una ecuación modificada que considera la masa del refuerzo incorporado (M_c), como nanohilos de celulosa o nanopartículas de plata, quedando de la siguiente forma:

$$GF (\%) = \frac{M_f - M_c}{M_0 - M_c} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.9})$$

2.5.4 Análisis termogravimétrico.

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un rango de temperatura desde 25 °C hasta 800 °C, con una tasa de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de nitrógeno. El equipo utilizado fue un TGA TAQ500 v20.13. Antes del estudio, los hidrogeles y microgeles se secaron en una estufa durante 48 horas para eliminar el agua residual.

El análisis se llevó a cabo tanto en los polímeros individuales como en los hidrogeles de QP, con y sin refuerzos, y en los microgeles GCS.

2.5.5 Técnicas de microscopía.

2.5.5.1 Microscopía electrónica de barrido.

Las muestras fueron liofilizadas, criofracturadas y metalizadas previamente al análisis. El equipo utilizado fue un FE-SEM ZEISS Modelo Crossbeam 350. Este estudio se llevó a cabo en los hidrogeles de QP con y sin NaCl, y con y sin CNWs.

El espesor de la pared de los poros se calculó utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ, realizando 30 mediciones por micrografía y obteniendo el promedio y la desviación estándar.

También se tomaron imágenes de los microgeles de GCS con o sin NaCl y AgNPs. Para preparar estas muestras, se utilizó literatura previa sobre materiales similares (Berger et al., 2009; Christodoulakis and Vamvakaki, 2010; Sahiner et al., 2006). Para ello, los microgeles se liofilizaron para asegurarse la eliminación completa de agua y luego se los metalizó con partículas de oro, para que sean conductoras. También se dispersó el polvo en agua y luego se liofilizó. Por lo tanto, utilizamos el microgel de diferentes maneras a modo comparativo:

- Polvo liofilizado.
- Polvo disperso en agua (1,5 y 5 mg/ml) y luego liofilizado.

2.5.5.2 Microscopía de fuerza atómica.

Para el análisis de microscopía de fuerza atómica (AFM), se prepararon dispersiones con el objetivo de observar las estructuras de los CNWs. El equipo utilizado fue un 5500 Scanning Probe Microscopy de Agilent Technologies, operando en modo contacto.

2.5.6 Ensayo de durabilidad.

Dado que los hidrogeles están compuestos por materiales biodegradables, su deterioro a lo largo del tiempo puede variar según las condiciones ambientales. Por ello, se llevó a cabo un ensayo de durabilidad con el fin de determinar la vida útil del material y las condiciones óptimas de conservación para su uso futuro.

Los hidrogeles se mantuvieron a temperatura ambiente (21 °C) y sumergidos en agua destilada para evitar su desecación. Se añadió azida sódica (NaN_3) al medio a una concentración de 0,1 g/L para prevenir contaminación microbiana (Lichstein and Soule, 1944). Las muestras se guardaron en frascos plásticos, manteniéndose en oscuridad.

Para este ensayo, se prensaron los hidrogeles entre dos placas metálicas y se cortaron en discos de 7 mm de diámetro, las muestras ensayadas fueron QP con o sin NaCl y CNWs 10%. Las muestras se lavaron con agua destilada, se pesaron y luego se colocaron en agua destilada con NaN_3 . Se mantuvieron a temperatura ambiente durante períodos controlados.

El análisis se hizo por cuadruplicado, midiendo diferentes propiedades en intervalos de tiempo específicos. Entre las evaluaciones realizadas, se incluyen:

- Propiedades mecánicas: Evaluadas en compresión estática utilizando los parámetros detallados en la sección 2.5.8.1.
- Pérdida de peso: Calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.10})$$

- Además, se hicieron ensayos de microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Análisis físico-químico mediante FTIR.

Estas mediciones fueron realizadas en los días 1, 60, 120, 180 y 240.

2.5.7 Técnicas físico-químicas de caracterización de los hidro y microgeles.

2.5.7.1 Potencial zeta.

Para la medición del potencial zeta, se prepararon soluciones de los polímeros en diferentes concentraciones, disueltos en el buffer correspondiente y con o sin la incorporación de NaCl o nanopartículas. Las muestras de Q y P se analizaron utilizando un equipo Malvern Zetasizer ZS 90, equipado con un láser de 633 nm (He-Ne) a 25 °C. Adicionalmente, este equipo fue empleado para medir la conductividad de las soluciones. En el caso de las muestras de Ge y CS, se utilizó un equipo Horiba SZ-100 para los análisis correspondientes.

2.5.7.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.

Esta técnica se empleó para caracterizar la absorbancia asociada a las reacciones químicas y las interacciones entre los grupos funcionales presentes en las muestras (Farrukh, 2012). En este estudio, los análisis se realizaron en modo de reflectancia total atenuada (ATR) con una resolución de 4 cm^{-1} y un total de 32 escaneos en un rango espectral de 600 a 4000 cm^{-1} , utilizando un instrumento Thermo Scientific FTIR-Nicolet 6700.

En casos específicos, se llevaron a cabo mediciones en modo de transmisión mediante la preparación de pastillas de bromuro de potasio (KBr) que contenían la muestra analizada. Este método se aplicó a las muestras en polvo, tales como los polímeros puros o los microgeles de GCS.

2.1.6.4 Difracción de Rayos X.

La difracción de rayos X (DRX) se utilizó para determinar el grado de cristalinidad de los hidrogeles. Para este propósito, los hidrogeles fueron secados hasta formar un film, el cual

posteriormente fue sometido al análisis. Las condiciones experimentales incluyeron un rango de 2θ entre 2° y 50° , con una velocidad de barrido de $2^\circ/\text{min}$. Las mediciones se realizaron en un difractómetro de rayos X PAnalytical X'pert PRO, equipado con un tubo de Cu y radiación K-alpha.

Además, se realizaron análisis en muestras en polvo de nanohilos de celulosa (CNWs) y celulosa microcristalina (MCC), empleando los mismos parámetros instrumentales.

2.5.8 Caracterización mecánica.

2.5.8.1 Análisis de compresión.

El análisis de compresión se llevó a cabo en hidrogeles de QP con y sin la incorporación de NaCl y CNWs, con el objetivo de evaluar el módulo de compresión y la deformación alcanzada. Para asegurar una estructura geométrica uniforme, los hidrogeles fueron prensados entre dos placas metálicas y posteriormente colocados en una solución buffer a pH 4 o en SF durante 24 horas. Luego, las muestras se recortaron en discos de 10 mm de diámetro.

Los parámetros experimentales empleados incluyeron una temperatura de 20°C , placas paralelas, un desplazamiento máximo de compresión de 10 mm, una fuerza inicial de 5 nN, una velocidad de carga de 100 nN/min y una fuerza final de 8000 nN. Los ensayos se realizaron utilizando un instrumento Perkin Elmer DMA 7e y, para garantizar la reproducibilidad, se efectuaron al menos tres réplicas por cada muestra.

2.5.8.2 Estudio reológico de frecuencias.

El estudio reológico se llevó a cabo en hidrogeles de QP, con y sin la adición de NaCl y CNWs al 10 %. Las mediciones se realizaron en platos paralelos de 10 mm de diámetro, donde la altura de las muestras fue determinada automáticamente por el equipo sin aplicar fuerza previa. El ensayo consistió en barridos de frecuencia en un rango de 0,1 a 10 Hz, con una fuerza estática de 30 mN y una fuerza dinámica de 15 mN. La temperatura de análisis fue establecida en 37°C .

Para preparar las muestras, los hidrogeles fueron prensados, sometidos a un proceso de hinchamiento en SF durante 24 horas y cortados en discos de aproximadamente 8 mm de diámetro. Cada ensayo incluyó cuatro réplicas por muestra. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando un instrumento Perkin Elmer DMA 7e.

2.5.8.3 Nanoindentación.

La caracterización mediante nanoindentación se realizó utilizando un equipo Triboindenter Hysitron (Módulo Nano), equipado con un indentador Berkovich. Las mediciones se llevaron a cabo con un indentador esférico de zafiro de 500 μm de radio, bajo un esquema de control por desplazamiento (displacement control, "DC"), siguiendo la norma ISO 14577-1 (International Organization for Standardization, 2015).

Las pruebas incluyeron indentaciones a profundidades variables, desde 500 nm hasta un máximo de 4000 nm. En cada región de las muestras se realizó una única indentación, empleando la función Imaging del equipo para garantizar precisión. Durante el ensayo, se monitoreó la deformación lenta (creep) bajo carga constante en la fase inicial de contacto, previa al inicio del proceso de indentación.

En cuanto a la preparación de las muestras, los hidrogeles fueron prensados para garantizar una altura uniforme y se sometieron a un proceso de hinchamiento en SF durante 24 horas antes de la prueba.

2.5.9 Ensayos de desempeño físico: Evaluación de la permeabilidad, degradabilidad y estabilidad de los hidrogeles.

2.5.9.1 Tasa de transmisión de vapor de agua.

Se realizó un ensayo para evaluar la permeabilidad de los hidrogeles, considerando que este parámetro está directamente relacionado con la efectividad en la cicatrización de heridas. Los hidrogeles fueron prensados y secados bajo flujo laminar para obtener películas uniformes, que posteriormente se recortaron en discos de 10 mm de diámetro. El espesor de las películas se determinó utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo).

Para el ensayo, se incorporaron 9 ml de agua destilada en tubos de ensayo y se sellaron las películas de hidrogel en la boca de los tubos utilizando adhesivo acrílico. Los sistemas se pesaron antes y después de la prueba, la cual se realizó en una cámara a 37 °C y con una humedad relativa constante del 90 % durante un período de 4 días.

La tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) se calculó empleando la ecuación descrita por Gonzalez et. al. (Gonzalez et al., 2014):

$$WVTR = \frac{M_0 - M_1}{72 \times A} \quad (\text{Ecuación 2.11})$$

Donde A es el área de la boca del tubo (m^2), M_0 y M_1 son las masas del sistema antes y después del ensayo, respectivamente.

Además, los valores se ajustaron considerando el espesor de la película (es) de la siguiente manera:

$$NWVTR = WVTR \times es \quad (\text{Ecuación 2.12})$$

2.5.9.2 Ensayo de degradabilidad y estabilidad de hidro y microgeles.

Hidrogeles QP

El ensayo de degradabilidad de los hidrogeles de QP, con o sin NaCl y/o CNWs, se realizó siguiendo el protocolo descrito por Alizadeh et. al. (Alizadeh et al., 2013) y Rodrigues et. al. (Rodrigues et al., 2016), con modificaciones específicas. Los hidrogeles se prensaron y se recortaron en discos de, aproximadamente, 7 mm de diámetro. Para cada punto temporal, se prepararon tres réplicas por muestra.

Antes de iniciar el ensayo, los discos se sumergieron en agua destilada durante al menos 2 horas y luego se secaron en una estufa a 40 °C durante 24 horas. Las muestras secas se pesaron y se colocaron en tubos Eppendorf que contenían PBS y NaN_3 , (0,5 g/L) para evitar la contaminación microbiana (Lichstein and Soule, 1944). Los tubos se mantuvieron a 37 °C para simular la temperatura corporal, dado el contexto de aplicación en apósitos.

El análisis se realizó en los días 1, 5, 12 y 21. Las muestras se retiraron de los tubos, se lavaron con agua destilada y se secaron nuevamente en una estufa a 40 °C durante 24 horas antes de ser pesadas. El porcentaje de pérdida de peso se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.13})$$

Donde W_i y W_f son los pesos inicial y final, respectivamente, de los hidrogeles secos.

Microgeles GCS

Se evaluó la degradación de los geles obtenidos a partir de Ge sola y de los entrecruzados. Inicialmente, las muestras se hincharon en agua destilada y las suspensiones resultantes se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos utilizando una centrífuga de alta velocidad (High Speed Centrifuge, Neofuge 15). Luego, el precipitado obtenido fue liofilizado para formar estructuras compactas, las cuales se colocaron en tubos con agua destilada y se mantuvieron a 37 °C. La estabilidad de las muestras se evaluó determinando el tiempo de desintegración de las estructuras.

2.5.10 Ensayos biológicos.

2.5.10.1 Antibacterianos.

2.5.10.1.1 Medición del halo de inhibición.

Se realizaron ensayos tomando como modelo de Gram (-) a *Escherichia coli* ATCC 8739 y de Gram (+) a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (ATCC, American Type Culture Collection). Estas cepas se cultivaron en agar eosina-azul de metileno (EMB) y Baird Parker, respectivamente. Las bacterias fueron incubadas en agar Mueller Hinton a $37 \pm 0,5$ °C por 24 horas. Luego, el inóculo fue suspendido en agua destilada estéril y se ajustó la densidad bacteriana hasta una turbidez igual a 0,5 Mc Farland. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los hidrogeles QP sin NaCl o con 0,15 M NaCl. Por otro lado, el mismo procedimiento mencionado se realizó para los microgeles GCS.

El estudio se realizó en colaboración con el grupo del Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente (IIPROSAM). Para realizar el test, se siguió el trabajo de Pereda et al. (Pereda et al., 2011). Los geles QP se habían conservado previamente prensados y cortados en discos de 4 mm de diámetro, aproximadamente, y se guardaron de esa manera en un recipiente en heladera hasta el momento de uso. Para corroborar la carga microbiológica inicial de los hidrogeles se los incubó sin bacterias. En cuanto a la preparación de las muestras de microgeles, se utilizó 10 mg

de cada polvo muestra por triplicado. Luego, para medir la actividad antibacteriana, se siguió el mismo procedimiento que se mencionó antes. Se realizaron controles con inoculación bacteriana sin la muestra y, al igual que para los hidrogeles QP, también se comprobó la carga microbiana inicial y no se vio crecimiento.

Las muestras se colocaron en las placas previamente sembradas con 100 μ L de inóculo con aproximadamente 10^5 – 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de cada bacteria analizada. Se dejaron en incubación 24 horas a 37 °C.

La zona de inhibición se midió desde el centro de los hidrogeles o microgeles utilizando un calibrador manual (Mitutoyo, Japón).

Por otro lado, para los hidrogeles QP con CNWs en su composición, este ensayo se realizó en colaboración con el departamento de ingeniería química y de materiales, en la facultad de ingeniería de la Universidad de Alberta (Edmonton, Canadá). Se partió de hidrogeles previamente prensados, cortados en discos de 4 mm de diámetro y liofilizados. Los geles fueron esterilizados bajo luz UV durante 15 minutos de cada lado. Se los hinchó en PBS y luego se los colocó en placas conteniendo 10^8 UFC/ml de *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 25923). Las placas se dejaron en incubación a 37 °C durante 24 horas y se fotografiaron los resultados. Como controles se utilizaron los geles sin CNWs. Cabe destacar que en este último ensayo las cepas utilizadas son distintas que las que se usaron en el resto de los ensayos de actividad antibacteriana

2.5.10.2 Estudios celulares en hidrogeles.

2.5.10.2.1 *In vivo*.

Los animales y el modelo de curación de heridas utilizados consistieron en cuatro ratas Wistar hembra de 16 semanas de edad, con un peso de 360-400 g. Los animales fueron obtenidos de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA) y mantenidos en el Centro de Recursos Animales (CEFYO) en condiciones libres de patógenos. Las ratas se alojaron en una habitación con clima controlado y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. La alimentación consistió en comida estándar para ratas de laboratorio y agua *ad libitum*. Todos los animales recibieron cuidados de acuerdo con las normas locales de bienestar animal, y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Facultad de Medicina de la UBA.

Para los experimentos de cicatrización de heridas, las ratas fueron alojadas en jaulas individuales. La anestesia se llevó a cabo mediante la administración intraperitoneal de una combinación de ketamina (20-45 mg/kg) y midazolam (45 mg/kg). Se eliminó el pelo de la región dorsal utilizando tijeras eléctricas, y se generaron tres heridas de espesor completo en la piel dorsal con un trocar de biopsia de 8 mm, atravesando dos capas de piel. En cada animal, una de las heridas se utilizó como control interno, mientras que las otras dos fueron tratadas.

Se aplicaron hidrogeles QP con NaCl en concentraciones de 0 y 0,15 M sobre las heridas tratadas, cubriéndolas completamente. Para la herida de control, se utilizó una gasa furacinada en lugar del hidrogel. Para evitar el desplazamiento de los hidrogeles y las gasas, se cubrió la región dorsal de las ratas con cinta hipoalérgica y Tegaderm. El proceso de curación se analizó retirando los vendajes en animales anestesiados, tomando al menos tres imágenes de cada herida para evaluar el área y determinar el porcentaje de cierre mediante la fórmula (Bagher et al., 2020):

$$\text{Cierre de herida (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Área de la herida abierta}}{\text{Área de la herida inicialmente}}\right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.14})$$

Las mediciones se realizaron los días 0, 1, 4, 6, 8, 12, 15 y 19 tras la lesión. El área de cierre de las heridas se calculó empleando el software ImageJ. Para determinar la escala en cada fotografía, se utilizó una regla, y posteriormente se analizó el área.

2.5.10.2.2 *In vitro*.

Para los estudios *in vitro* se emplearon placas de 24 pocillos, en las que se sembraron 60.000 células por pocillo. Las células utilizadas fueron fibroblastos dérmicos humanos adultos (HDFa), y el ensayo se realizó siguiendo el método de citotoxicidad directa descrito en la norma ISO 10993-5 (International Organization for Standardization, 2009), poniendo los hidrogeles en contacto directo con la monocapa celular. La viabilidad celular se determinó mediante el uso de resazurina, cuya elección fue fundamentada tras ensayos preliminares comparativos con el método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Estos ensayos demostraron que resazurina genera menos desviación entre réplicas en los controles, además de evitar el uso de solventes que podrían alterar la estructura del hidrogel, como se describe en el Anexo 1. Además, en el Anexo se detallan estudios previos para conocer el tamaño óptimo de las placas y la concentración celular a utilizar. Estos estudios se llevaron

a cabo en el Departamento de Ingeniería Química y de Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Alberta (Edmonton, Canadá).

Inicialmente, las células fueron sembradas en medio Eagle modificado de Dulbecco completo y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 24 horas, verificando la formación de una monocapa bajo microscopía. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo y se colocaron los hidrogeles previamente hinchados y esterilizados. Se utilizaron pocillos con células pero sin hidrogeles como control positivo para evaluar la viabilidad celular en ausencia de materiales potencialmente tóxicos, y pocillos sin células como controles negativos para establecer la línea base de fluorescencia del reactivo de resazurina. Los hidrogeles, en forma de discos liofilizados de 4 mm de diámetro y 1 mm de espesor, fueron esterilizados mediante exposición a luz UV durante 15 minutos por cada lado (Bento et al., 2023; Rodrigues et al., 2016) y posteriormente hidratados con PBS estéril hasta alcanzar la saturación. Las muestras analizadas incluyeron a los hidrogeles QP con o sin NaCl y CNWs al 10% p/p y aquellos con LD 1% p/p. Cada una se evaluó en ocho réplicas y se incubaron durante 1, 2, 4 y 7 días.

Se determinó la viabilidad celular utilizando resazurina y aplicando la siguiente fórmula:

$$Viabilidad (\%) = \frac{Abs\ muestra - Abs\ Control\ neg}{Abs\ Control\ pos} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.15})$$

Las mediciones se realizaron dos horas después de la incorporación de resazurina, momento en que el cambio de color en las placas evidenció la actividad metabólica celular asociada a la reducción de resazurina en resorufina (Chen et al., 2018). Durante este ensayo, se retiraron los hidrogeles previamente a la lectura de resultados, permitiendo que las células contenidas en el interior de los hidrogeles reaccionaran con el reactivo, lo que aseguró una determinación más precisa de la viabilidad. La fluorescencia de cada pocillo fue medida a 530 y 570 nm utilizando el lector de placas Thermo Fisher Varioskan LUX, y el porcentaje de viabilidad celular se calculó conforme a la Ecuación 2.15.

2.5.10.2.2.1 Ensayos de hemólisis en microgeles de gelatina y condroitín sulfato.

La prueba se realizó con sangre de donantes voluntarios, anónimos y mayores de edad. El porcentaje de hemólisis de todas las muestras se determinó mediante un protocolo basado en otros

trabajos con materiales similares (Peng et al., 2021; Zhang et al., 2023). Los eritrocitos se separaron mediante centrifugación y se diluyeron al 2% (v/v) en SF. Posteriormente, se pesaron 15 mg de cada muestra y se colocaron en una placa de 24 pocillos, a la que se añadieron 1,5 ml de solución de eritrocitos en cada pocillo. Como control negativo, se emplearon soluciones de eritrocitos sin muestra, mientras que como control positivo se utilizaron eritrocitos mezclados con agua destilada. La prueba se realizó por triplicado.

Las soluciones se incubaron a 37 °C durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, las suspensiones se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante se utilizó para medir la absorbancia a 540 nm utilizando el equipo UV-Visible (UNICO SQ-2800).

El porcentaje de hemólisis se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{Abs_s - Abs_n}{Abs_p - Abs_n} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.16})$$

Donde Abs_s es la absorbancia de la muestra y Abs_n y Abs_p la absorbancia del control negativo y positivo, respectivamente.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial: Principios éticos para la investigación médica en seres humanos. Todos los procedimientos se realizaron de conformidad con las leyes pertinentes y las directrices institucionales. La aprobación ética para este estudio se obtuvo del Comité de Ética en Investigación del Programa Temático Interdisciplinario en Bioética (PTIB), adscrito a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Mar del Plata, el 8 de julio de 2024. El protocolo fue registrado con el número NO-2024-27503325-GDEBA-DPEGSFFMSALGP en La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2.5.11 Esquema de la estructura de la tesis doctoral.

Como se muestra en la Figura 2.2, esta tesis se centra en la formulación y caracterización de materiales basados en dos sistemas principales: hidrogeles de quitosano y pectina (QP) y sistemas de

gelatina y condroitín sulfato (GCS). En este último, se desarrollaron tanto hidrogeles como microgeles. Para ambos sistemas, se evaluó la incorporación de refuerzos o compuestos activos, se realizaron ensayos de caracterización bajo distintas condiciones y se analizaron sus propiedades en función de su potencial aplicación como apósitos para diferentes tipos de heridas.

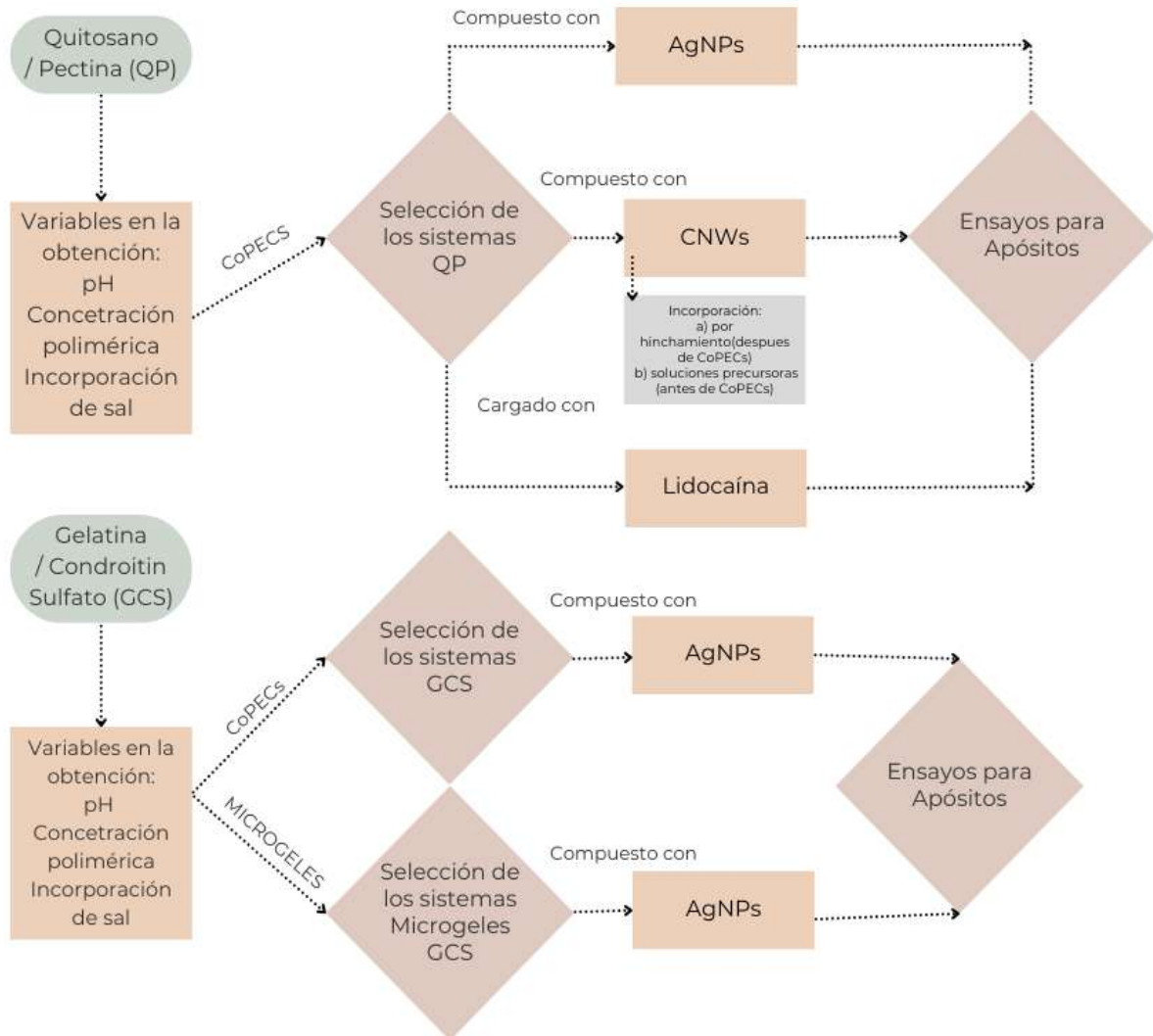


Figura 2.2. Imagen que resume la tesis doctoral.

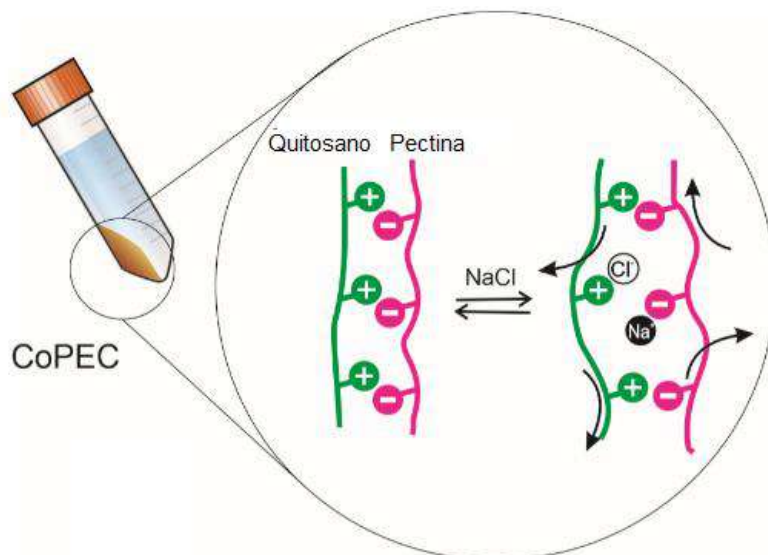
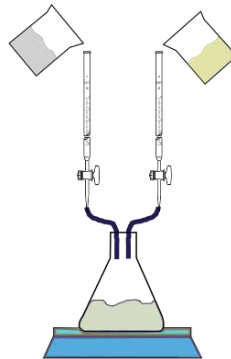
En la Tabla 2.1 se observa un resumen de los diferentes hidrogeles y microgeles con agentes activos o refuerzos.

Tabla 2.1. Nomenclatura de los hidrogeles y microgeles formulados exitosamente, algunos de ellos compuestos con la adición de refuerzos como AgNPs y CNWs o cargados con agentes activos como la LD.

Muestra	PEC	NaCl (M)	AgNPs (% p/p)	CNW	LD (% p/p)
QP-0	QP	0	0	0	0
QP-0,15	QP	0,15	0	0	0
QP-0-AgNPs	QP	0	1	-	0
QP-0,15-AgNPs	QP	0,15	1	-	0
QP-0-CNWs-a	QP	0	0	Por hinchamiento	0
QP-0,15-CNWs-a	QP	0,15	0	Por hinchamiento	0
QP-0-4%CNWs	QP	0	0	4%	0
QP-0,15-4%CNWs	QP	0,15	0	4%	0
QP-0-10%CNWs	QP	0	0	10%	0
QP-0,15-10%CNWs	QP	0,15	0	10%	0
QP-0-20%CNWs	QP	0	0	20%	0
QP-0,15-20%CNWs	QP	0,15	0	20%	0
QP-0-30%CNWs	QP	0	0	30%	0
QP-0,15-30%CNWs	QP	0,15	0	30%	0
QP-0-LD	QP	0	0	0	2
QP-0,15-LD	QP	0,15	0	0	2
1: GCS-0	GCS	0	0	0	0
2: GCS-0,15	GCS	0,15	0	0	0
3: GCS-0-1%AgNPs	GCS	0	1	0	0
4: GCS-0,15-1%AgNPs	GCS	0,15	1	0	0

Capítulo 3.

Hidrogeles basados en quitosano y pectina: Caracterización y funcionalidad.



3.1 Introducción al Capítulo 3.

Los polímeros Q y P pueden utilizarse para la formación de hidrogeles mediante PECs, siempre que se encuentren cargados en solución. Las cargas positivas del Q interactúan con las cargas negativas de la P, lo que da lugar a la formación de una red polimérica. La modificación de parámetros como la concentración de polímeros o el pH de formulación afecta directamente el grado de entrecruzamiento, generando hidrogeles con propiedades diferenciadas. Por otro lado, la incorporación de NaCl altera las interacciones entre los polímeros, promoviendo la formación de materiales saloplásticos. Además, estos sistemas han demostrado ser útiles para la liberación de fármacos, con reportes previos que destacan su efectividad en este ámbito.

En los últimos años, se han desarrollado hidrogeles basados en Q y P para diversas aplicaciones, como la liberación controlada de fármacos (Morris et al., 2010; Neufeld and Bianco-Peled, 2017), la cicatrización de heridas (Amirian et al., 2021), entre otras. Estos hidrogeles pueden presentarse en diferentes formatos, incluyendo películas (Chetouani et al., 2017; Shanti et al., 2022), hidrogeles inyectables (D. Li et al., 2020) o andamios porosos (Martins et al., 2018a). Además, estudios recientes han explorado propiedades adicionales de estos sistemas. Por ejemplo, en 2022 se reportaron hidrogeles QP con actividad antioxidante y anticancerígena (Dziadek et al., 2022). Ese mismo año, también se reportó el uso de nanocápsulas compuestas de estos polímeros para la liberación de fármacos, con la incorporación de un antibiótico (Mohan et al., 2022). Adicionalmente, en 2023 se emplearon hidrogeles polielectrolitos de Q y P para la liberación de medicamentos (Vildanova et al., 2023). Asimismo, un estudio reciente evaluó cómo el pH y la concentración de sal influyen en los complejos de Q con goma arábica (Schröder et al., 2023).

Sin embargo, hasta el momento no se han desarrollado materiales saloplásticos basados en CoPECs de Q y P que analicen el efecto de parámetros como pH, contenido de NaCl y concentración de polímeros para optimizar formulaciones dirigidas a apósitos para heridas. Tampoco se ha evaluado la liberación de lidocaína a partir de estos materiales. Por estas razones, se realizaron los ensayos descritos en este capítulo.

En el presente capítulo se detallan los hidrogeles de Q y P formulados bajo distintas condiciones y se analizan tanto a nivel macroscópico como microscópico. También se describen los ensayos llevados a cabo para su caracterización, incluyendo hinchamiento en diferentes medios, análisis térmicos, medición del potencial zeta, entre otros. Los hidrogeles que presentaron mejores

propiedades fueron seleccionados para una caracterización más profunda, que incluyó la variación de condiciones de hinchamiento, análisis de sus características físico-químicas, mecánicas, GF, permeabilidad al vapor de agua y ensayos biológicos específicos relacionados con la aplicación propuesta. Se realizaron ensayos antibacterianos y estudios preliminares *in vivo*. Finalmente, se evaluó la incorporación de lidocaína en los hidrogeles, midiendo la eficiencia de encapsulación y su liberación al medio.

3.2 Hidrogeles obtenidos.

Como se observa en la Tabla 3.1, se obtuvieron 18 hidrogeles variando los parámetros mencionados en el Capítulo 2, sección 2.2 (pH, concentración polimérica y NaCl). Cada hidrogel se preparó utilizando 20 ml de buffer con las concentraciones correspondientes de polímeros y NaCl.

Tabla 3.1. Hidrogeles formulados. Variación de pH, concentración de polímeros y sal en la fabricación de los hidrogeles.

pH	NaCl (M)	Concentración polimérica (mg/ml)	Masa total (g)	Contenido de agua teórico (%)	Comportamiento al tacto
4	0	5	0,8	87,5	Rígido
		10	1,5	86,7	Maleable
	0,15	5	1,4	78,6	Maleable
		10	1,2	68,3	Ligeramente rígido
	0,5	5	1,7	59,7	Maleable
		10	2,8	72,0	Maleable
4,5	0	5	1,6	93,7	Frágil
		10	3,4	94,1	Maleable
	0,15	5	1,8	84,4	Frágil
		10	4,1	90,7	Maleable
	0,5	5	1,9	63,9	Maleable
		10	3,1	74,7	Maleable
5	0	5	1,0	90,0	Maleable
		10	2,1	90,5	Maleable
	0,15	5	1,5	81,3	Frágil
		10	2,4	84,2	Maleable
	0,5	5	1,7	59,7	Rígido
		10	2,8	72,0	Maleable

El aspecto macroscópico de los hidrogeles fue similar en coloración y forma, como se muestra en la Figura 3.1. Sin embargo, se encontraron variaciones en el peso y la textura de los hidrogeles formulados.



Figura 3.1. Ejemplo de hidrogeles de QP obtenidos, formulados a pH 4 con 10 mg/ml de polímeros. De izquierda a derecha: Sin NaCl, con 0,15 M NaCl y con 0,5 M NaCl. Regla de referencia en cm.

Además, se confirmó que ambos polielectrolitos son esenciales para la formación de los hidrogeles. Soluciones de Q y NaCl o de P y NaCl, preparadas a pH 4 bajo las mismas condiciones de síntesis, no formaron geles. Esto demuestra que la incorporación de NaCl por sí sola no es suficiente; es necesaria la interacción entre ambos polielectrolitos. La capacidad de los iones de NaCl para interactuar con los polielectrolitos, como se menciona en la introducción, no genera redes tridimensionales, a diferencia de las interacciones entre ambos polímeros.

3.3 Criterios para la selección de hidrogeles.

3.3.1 Caracterización morfológica, textural y de formación.

Los 18 hidrogeles se formaron correctamente. La mayoría fueron maleables al tacto, aunque algunos presentaron mayor rigidez (Tabla 3.1). Los más rígidos fueron los formulados a pH 4 con 5 mg/ml de polímeros y sin NaCl, y los preparados a pH 5 con 5 mg/ml de polímeros y 0,5 M NaCl. Algunos hidrogeles resultaron frágiles y se desarmaron al intentar moldearlos, lo cual es relevante considerando aplicaciones en apósitos, donde se requiere resistencia mecánica.

En cuanto a su composición, se verificó que los hidrogeles contienen mayoritariamente agua (entre 60% y 95%). Este contenido fue mayor en hidrogeles sin NaCl y en estos casos no presentó diferencias significativas ($\pm 0,5\%$) entre concentraciones de polímeros de 5 y 10 mg/ml. La presencia de NaCl modifica la estructura de las cadenas poliméricas, neutralizando los grupos funcionales

cargados mediante interacciones iónicas y disminuyendo la afinidad del hidrogel por el agua (Costa et al., 2015).

Se observó un comportamiento consistente en los hidrogeles con NaCl, a mayor concentración de polímeros (10 mg/ml), el contenido de agua aumentó en la mayoría de los casos. Sin embargo, en hidrogeles formulados a pH 4 con 0,15 M NaCl, el contenido de agua fue mayor con 5 mg/ml de polímeros (78,6% frente a 68,3%). La concentración de NaCl también influyó. A bajas concentraciones (0,15 M), las estructuras fueron menos rígidas debido a la neutralización parcial de las cadenas poliméricas, esto disminuye las repulsiones electrostáticas, permitiendo un mayor enrollamiento de las cadenas. Por otro lado, a concentraciones más altas (0,5 M) este efecto fue más pronunciado y promovió la formación de agregados macroscópicos (Meka et al., 2017). Por lo tanto, excepto en los hidrogeles formulados a pH 4 con 0,15 NaCl, se observó que el contenido de agua fue mayor en aquellos con 0,15 M NaCl en comparación con los que contenían 0,5 M.

Por otro lado, en los hidrogeles formulados a pH 4, al incorporar el doble de polímeros (10 mg/ml frente a 5 mg/ml), el peso de los hidrogeles con NaCl fue menor al esperado; incluso se obtuvo más hidrogel con 0,15 M NaCl y 5 mg/ml (1,73 g) que con 10 mg/ml (1,22 g). Además, este último mostró una estructura más rígida. A pH 4,5 y 5, sí se obtuvo más hidrogel cuando se agregó el doble de polímeros en todos los casos. Sin embargo, dos de los seis hidrogeles formulados a pH 4,5 presentaron una estructura frágil y fácil de desarmar; esta misma fragilidad se observó en uno de los hidrogeles formulados a pH 5. Este comportamiento se dio en los hidrogeles con 5 mg/ml de polímeros con 0 o 0,15 M de NaCl formulados a pH 4,5 y 5.

La elección del pH de formulación juega un papel crucial en la obtención de los hidrogeles, ya que determina los grupos funcionales cargados de las cadenas poliméricas, lo que a su vez influye en las características de los hidrogeles obtenidos (Altam et al., 2021). Además, se observó que el pH afecta tanto el peso como la morfología de los hidrogeles, alterando su estructura interna. Por ejemplo, en los hidrogeles sin NaCl y con 5 mg/ml de polímeros, se obtuvo una estructura más rígida a pH 4, mientras que a pH 4,5 el hidrogel se desarmó y a pH 5 fue maleable. En las formulaciones con 0,15 M de NaCl, se observó que a pH 4 los hidrogeles eran maleables, mientras que a pH 4,5 y 5 presentaban una estructura más frágil. Esto demuestra que no solo la presencia de NaCl influye en las características de los hidrogeles, sino también el pH de formulación.

La fragilidad observada en algunos hidrogeles puede explicarse por las interacciones entre las cadenas de polielectrolitos, que se ven afectadas tanto por la interferencia de los iones de la sal como por el estado de los grupos funcionales, que pueden estar cargados o no según el pH. Estos factores modifican significativamente las interacciones entre los polielectrolitos. Estas interacciones tienen un impacto directo en la resistencia mecánica y la estabilidad de los hidrogeles, propiedades fundamentales para apósitos que necesitan permanecer íntegros durante su aplicación y uso.

Por otro lado, en cuanto a la técnica de síntesis, se sabe que al preparar soluciones más diluidas y ensamblarlas mediante goteo, se favorece la equimolaridad (Schaaf and Schlenoff, 2015), ya que esta técnica permite una mejor dispersión de las moléculas y una interacción más eficiente, formando complejos más uniformes. Este aspecto resulta especialmente relevante para el diseño de hidrogeles destinados a apósitos, ya que, como se discutirá en las siguientes secciones, las características internas de los hidrogeles, determinadas por los parámetros seleccionados para su síntesis, tienen un impacto significativo en sus propiedades macroscópicas y funcionales.

Uno de los posibles ensayos para analizar estas interacciones más a fondo es el análisis de Potencial Zeta. Además, para caracterizar de mejor manera la estructura de los hidrogeles, se pueden hacer estudios de hinchamiento en distintas condiciones, análisis de propiedades térmicas y observaciones al microscopio para evaluar la cantidad y distribución de los poros.

3.3.2 Capacidad de hinchamiento en condiciones controladas.

El grado de hinchamiento varía según las características de los PECs y del medio en el que se hinchan (Sakiyama et al., 1993). Los resultados experimentales obtenidos al someter los hidrogeles a distintas condiciones de hinchamiento se presentan en la Figura 3.2, donde se observa cómo dichas condiciones influyen en su capacidad de absorción.

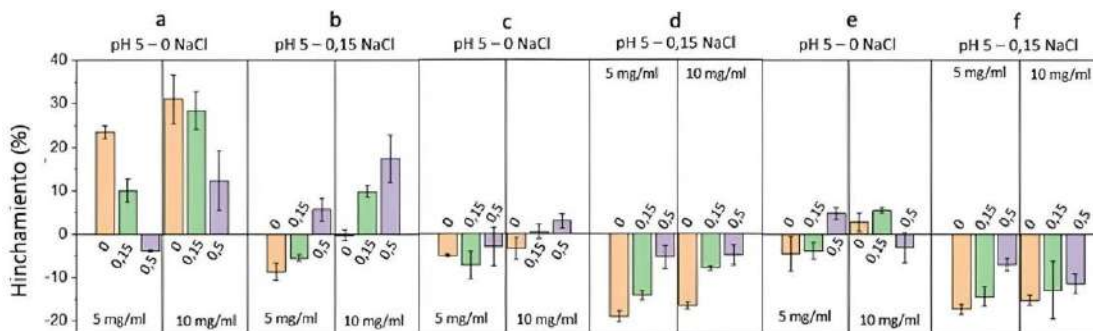


Figura 3.2. Porcentaje de hinchamiento de hidrogeles en pH 5 con o sin 0,15 M NaCl. a y b: Hidrogeles formulados a pH 4. c y d: Formulados a pH 4,5. e y f: Formulados a pH 5.

Los hidrogeles formados por PECs entre Q y P presentan sensibilidad a cambios de pH y a la concentración de polímeros empleada, lo que genera variaciones en su capacidad de hinchamiento (Bigucci et al., 2008; Chang and Lin, 2000). Este tipo de hidrogeles, que responden a estímulos externos como pH, temperatura o fuerza iónica de la solución, son clasificados como materiales inteligentes (Erceg et al., 2021). A medida que disminuye la densidad de entrecruzamiento, como ocurre en muestras con concentraciones poliméricas menores, se observa un mayor hinchamiento, aunque estas formulaciones suelen ser más frágiles (Chen et al., 2024). Adicionalmente, la estructura y el tamaño de los poros de los hidrogeles, observables mediante microscopía electrónica de barrido, son factores que influyen en su capacidad de hinchamiento al facilitar, o limitar, el pasaje de solutos (Amirian et al., 2021).

En ciertos casos, los hidrogeles no solo se hinchan, sino que también se deshinchan al ser colocados en soluciones específicas, presentando un peso final menor al inicial (Neufeld and Bianco-Peled, 2017). Esta capacidad de deshinchamiento puede ser beneficiosa en aplicaciones específicas, ya que permite una mayor difusión y liberación controlada de compuestos activos, dependiendo de las características del medio.

El rango de pH de la epidermis oscila entre 4,1 y 5,8 y se sabe que las condiciones ácidas favorecen la curación de heridas (Proksch, 2018). Teniendo esto en cuenta, los hidrogeles fueron ensayados inicialmente a pH 5, utilizando soluciones con y sin NaCl (0 o 0,15 M) para evaluar su comportamiento ante posibles cambios osmóticos. Tras 2 horas de inmersión, los hidrogeles alcanzaron un peso de equilibrio, manteniéndose estables en su estructura y sin presentar desintegración durante el ensayo. Para el cálculo del peso final, M_f , se consideró las 24 horas posteriores al hinchamiento.

Los resultados evidenciaron que los hidrogeles formulados a pH 4 exhibieron un mayor hinchamiento y capacidad de deshinchamiento en comparación con aquellos preparados a pH 5. Como se muestra en la Figura 3.2, la presencia de NaCl en el medio de hinchamiento tuvo un impacto significativo en el comportamiento de estos materiales. La capacidad de deshinchamiento, observada especialmente en los hidrogeles formulados a pH 4, es una característica positiva que podría favorecer la liberación de compuestos activos añadidos al hidrogel según las condiciones del entorno. Asimismo, esta capacidad, junto con el hinchamiento, es fundamental para aplicaciones en apósitos, ya que

permite absorber exudados de heridas o mantener la hidratación de la zona afectada, dependiendo del tipo de herida y de las necesidades específicas de absorción (Op 'T Veld et al., 2020).

Considerando las razones previamente mencionadas, y teniendo en cuenta también los resultados de morfología y textura de los hidrogeles, se seleccionaron aquellos formulados a pH 4 para continuar con el resto de los estudios. Durante los próximos ensayos descritos estos hidrogeles serán rotulados según sus parámetros como: QP-[NaCl]-[polímeros]; por ejemplo, el hidrogel formulado a pH 4 con 0,15 M NaCl y 5 mg/ml de polímeros se nombrará como QP-0,15-5.

3.3.3 Estudio de la microestructura.

Los CoPECs presentan una estructura porosa cuya forma y tamaño de poros dependen de diversos factores, como la velocidad de compactación durante la síntesis, los cambios en la presión osmótica asociados a la incorporación de NaCl en la solución polimérica y las concentraciones de polímeros empleadas (Schaaf and Schlenoff, 2015). La relevancia del tamaño de los poros radica en su impacto sobre la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles, el ingreso y crecimiento de células, así como el pasaje de exudados en apósitos diseñados para el tratamiento de heridas (Chang et al., 2011). Es por eso que se resalta la importancia de controlar el tamaño y la forma de los poros durante la síntesis, ya que estos parámetros afectan directamente las propiedades funcionales de los hidrogeles como apósitos, especialmente en términos de permeabilidad, capacidad de hinchamiento y biocompatibilidad con los tejidos afectados.

En este estudio, se esperaba observar diferencias microscópicas relacionadas con el contenido de NaCl en los hidrogeles. De manera similar a lo reportado previamente, se anticipaba que la incorporación de sal aumentaría el tamaño de los poros debido a una menor compactación estructural ocasionada por la interacción de las contracciones de la sal con las cadenas poliméricas. Los resultados confirmaron que un mayor contenido de sal generó una mayor rugosidad en las paredes de los poros (Figura 3.3). En particular, los hidrogeles formulados con 0,15 M de NaCl presentaron poros de mayor tamaño y una microestructura más visible en comparación con los hidrogeles sin NaCl, en los cuales la porosidad era menos evidente. Asimismo, en los hidrogeles con sal se observaron cristales atribuidos a la presencia de NaCl.

Por otro lado, aunque una mayor porosidad debería, en principio, facilitar el intercambio de solventes, los hidrogeles hinchados a pH 5 en la sección anterior y con un mayor contenido de NaCl mostraron un menor hinchamiento. Este comportamiento podría explicarse por la influencia del medio de ensayo y por el hecho de que los hidrogeles frescos ya contenían agua en su estructura.

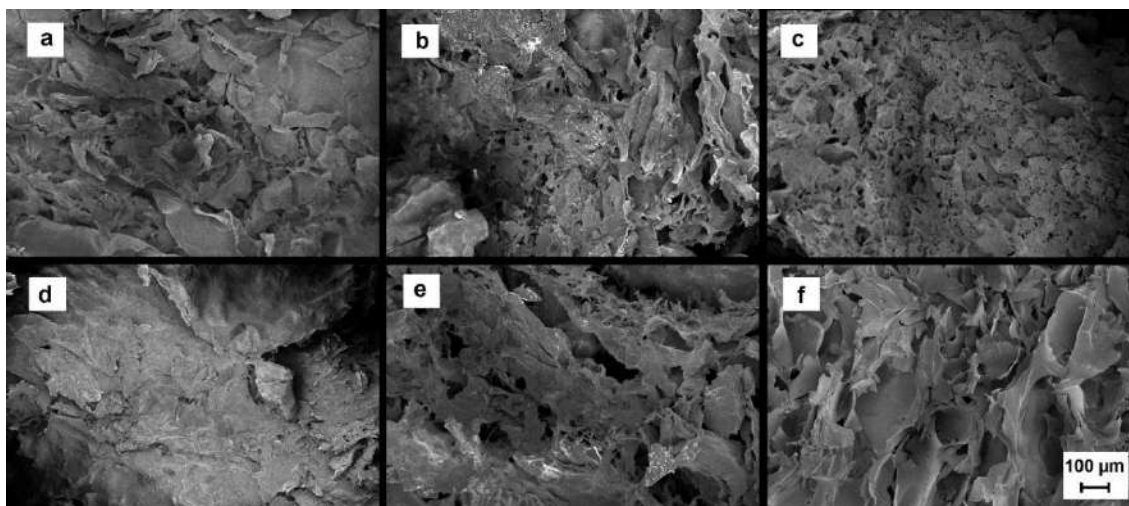


Figura 3.3. Micrografías de SEM de los hidrogeles formulados a pH 4. a, b y c corresponden a los hidrogeles con 5 mg/ml de polímeros y 0, 0,15 M y 0, 5 M NaCl, respectivamente; d, e y f corresponden a los hidrogeles con 10 mg/ml de polímeros y 0, 0,15 M y 0,5 M NaCl.

En cuanto a las variaciones estructurales asociadas con la concentración de polímeros utilizada, no se observaron cambios significativos en la microestructura. Todos los hidrogeles presentaron un aspecto heterogéneo, con zonas que aparentaban ser más densas que otras.

Los valores de espesor de las paredes de los poros se encuentran detallados en la Tabla 3.2. Los resultados indicaron que el espesor de las paredes fue mayor en el hidrogel formulado con una concentración de 5 mg/ml de polímeros y 0,15 M de NaCl, en comparación con el resto de las formulaciones analizadas.

Tabla 3.2. Valores obtenidos del espesor de la pared de los poros en los hidrogeles formulados a pH 4.

	QP-0-5	QP-0,15-5	QP-0,5-5	QP-0-10	QP-0,15-10	QP-0,5-10
Espesor pared de poro (µm)	2,2 ± 1,1	4,7 ± 1,2	1,3 ± 0,6	1,6 ± 0,7	2,7 ± 1,8	2,4 ± 0,4

Si bien se esperaba un incremento progresivo en el espesor de las paredes con el aumento de la concentración de NaCl, como lo sugiere la literatura (Naficy et al., 2020), este comportamiento no se observó en los hidrogeles que contenían 0,5 M de NaCl. Este fenómeno sugiere que, bajo las condiciones experimentales empleadas, concentraciones elevadas de NaCl no promovieron cambios estructurales significativos en el grosor de la pared de los poros. Este resultado podría estar relacionado con un posible efecto de la alta concentración de NaCl sobre el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles. Por otra parte, al comparar los hidrogeles QP-0-5 y QP-0,15-5, se constató que el hidrogel QP-0,15-5 presentó un diámetro de las paredes de los poros casi el doble que el observado en QP-0-5.

3.3.4 Estudio de la estabilidad térmica de los hidrogeles.

Otro método utilizado para la caracterización de los hidrogeles es el TGA. Este estudio permite determinar las temperaturas a las cuales los hidrogeles comienzan a degradarse. En la Figura 3.4 se observan los resultados obtenidos, con las curvas de masa residual y de la derivada de la pérdida de masa en función de la temperatura (DTGA). La temperatura de degradación máxima (T_{max}), definida como la temperatura a la que ocurre la mayor tasa de pérdida de masa, fue de 224,8 °C para el Q y de 287,4 °C para la P.

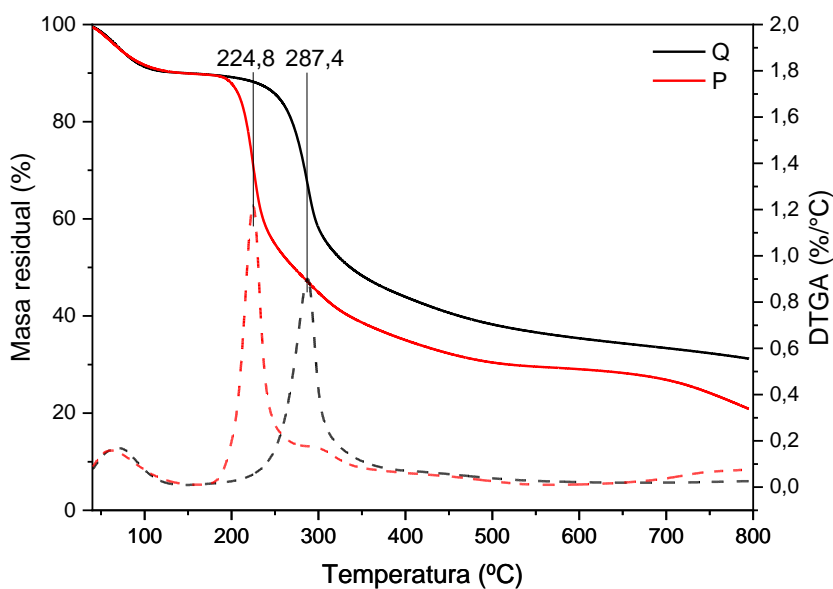


Figura 3.4. Resultados de TGA de los polímeros Q y P, con las curvas de masa residual (líneas sólidas) y de la DTGA (líneas discontinuas) en función de la temperatura.

En función de los valores de T_{max} obtenidos para los polímeros, se analizaron los correspondientes a los hidrogeles. Como se ilustra en las Figuras 3.5 y 3.6, todos los hidrogeles formulados a pH 4 experimentaron degradación en dos o tres etapas. La primera etapa de descomposición se produjo en el rango de 150 a 250 °C, intervalo en el cual se registró la mayor pérdida de masa durante el ensayo. Antes de alcanzar este rango, también se observó una pequeña pérdida de masa asociada a la eliminación del agua residual presente en los materiales, un fenómeno común en este tipo de sistemas (Panwar et al., 2023).

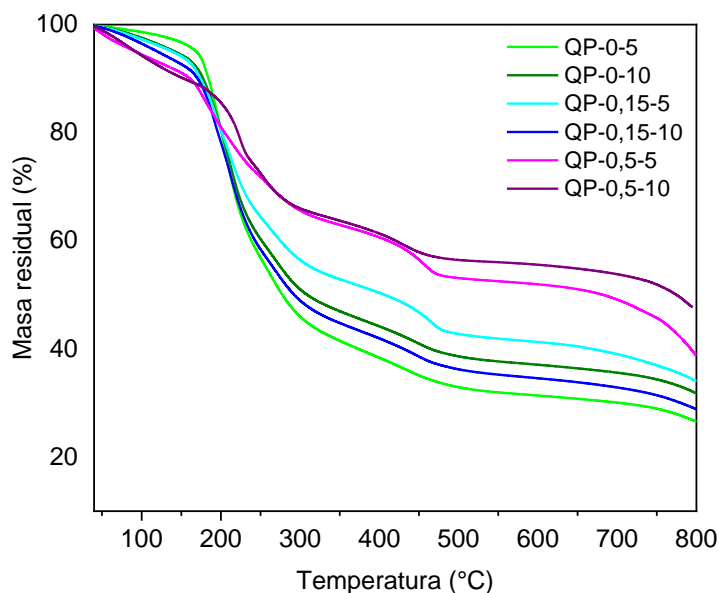


Figura 3.5. Resultado de TGA de los hidrogeles QP, con las curvas de masa residual en función a la temperatura.

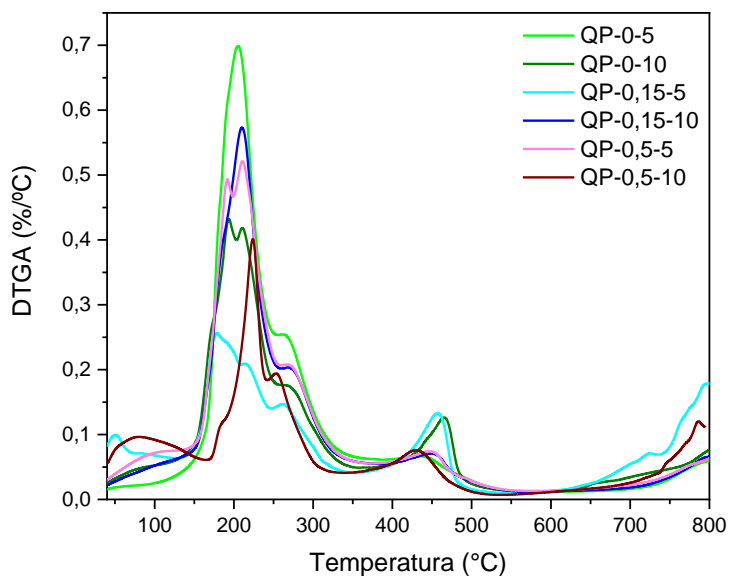


Figura 3.6. Resultado de TGA de los hidrogeles QP, con las curvas de la DTGA en función a la temperatura.

Con la adición de NaCl a los hidrogeles, se observó una disminución en la T_{max} con el aumento de la concentración de sal en hidrogeles formulados con 5 mg/ml de concentración de polímeros (Tabla 3.3). Este fenómeno podría asociarse al efecto dopante de la sal, tal como se describe en el Capítulo

1, sección 1.3.3, o a la interdifusión de sal (Porcel and Schlenoff, 2009), que interfiere en las interacciones entre las cadenas poliméricas, resultando en una estructura más susceptible a la degradación, especialmente en concentraciones elevadas de NaCl.

Tabla 3.3. Temperatura inicial (T_i) y T_{max} de los hidrogeles formulados a pH 4 con los distintos parámetros, y cantidad de porcentaje de hidrogel presente a los 800 °C (M_f).

	QP-0-5	QP-0,15-5	QP-0,5-5	QP-0-10	QP-0,15-10	QP-0,5-10
T_i (°C)	169,2	138,9	92,4	141,8	120,1	76,5
T_{max} (°C)	205,5	193,6	179,1	210,3	210,8	224,1
M_f (%)	26,6	34,0	38,7	31,8	28,8	47,0

Por otro lado, la T_{max} fue mayor en los hidrogeles formulados con 10 mg/ml de concentración de polímeros en comparación con los preparados con 5 mg/ml bajo las mismas condiciones. En este caso, la adición de NaCl no evidenció un efecto consistente sobre la T_{max} ; de hecho, en el hidrogel con 0,5 M NaCl y 10 mg/ml de concentración de polímeros, se registró un valor de T_{max} superior al de aquellos con 0 o 0,15 M NaCl. Esto podría atribuirse a la formación de una red tridimensional más densa debido a la mayor proporción de polímeros, lo que confiere una mayor estabilidad térmica y, en consecuencia, un aumento en la T_{max} (Chipara et al., 2008), reduciendo el impacto del NaCl. Otra forma de evaluar la degradación de los hidrogeles es considerando la temperatura de degradación inicial (T_i), definida como la temperatura a la que se registra una pérdida del 5% de la masa (Rusu et al., 2015), se observó que esta temperatura disminuyó con el incremento de la concentración de polímeros o de sal, lo cual podría relacionarse con la pérdida inicial de agua, cuya cinética depende de las interacciones entre el agua y la red polimérica (Reguieg et al., 2020). En todos los casos analizados, se constató que el aumento de la concentración de NaCl redujo la T_i , en concordancia con lo observado para la T_{max} en hidrogeles con 5 mg/ml de concentración de polímeros. Asimismo, se detectó que la T_i fue menor en hidrogeles formulados con 10 mg/ml en comparación con sus equivalentes preparados con 5 mg/ml.

En síntesis, una mayor concentración de polímeros formadores de PECs atenúa el efecto dopante de la sal sobre la T_{max} . Además, los valores de T_{max} de los hidrogeles fueron inferiores a los

de los polímeros individuales, lo que puede explicarse por la degradación inicial de las redes tridimensionales, seguida de la separación de las cadenas y la posterior degradación de los polímeros constituyentes.

Por último, se analizó el porcentaje remanente de las muestras sin degradar (M_f) a una temperatura específica. A 800 °C, cerca del final del ensayo, se evidenció que, en los hidrogeles con 5 mg/ml de concentración de polímeros, el porcentaje remanente aumentó con la concentración de NaCl. Este hallazgo, junto con los resultados previos, confirma que la adición de NaCl provoca modificaciones significativas en la estructura de los hidrogeles. De todas formas, el mayor porcentaje remanente se registró en la muestra QP-0,5-10, con un valor cercano al 50% del material inicial.

Haciendo referencia a la aplicación prevista para los hidrogeles, resulta relevante destacar que los valores de T_i fueron superiores a 90 °C en todos los casos. Este resultado es positivo, ya que sugiere que, incluso en presencia de un aumento de temperatura debido a factores externos, como la temperatura ambiente elevada o la proximidad a la piel lesionada, los hidrogeles podrían experimentar una pérdida de agua sin que su degradación estructural sea significativa, al mantenerse por debajo del 5%. El análisis de la influencia del NaCl y de la concentración polimérica sobre la estabilidad térmica de los hidrogeles proporciona información valiosa para orientar su caracterización. A partir de estos resultados, es posible continuar evaluando las propiedades de los materiales con el objetivo de identificar cuáles son los más adecuados para aplicaciones específicas, como apósitos para heridas.

3.3.5 Evaluación de la carga superficial en las soluciones precursoras de hidrogeles.

El análisis del potencial zeta es fundamental para entender las interacciones internas de los polielectrolitos en los hidrogeles. Esta técnica permite evaluar cómo las composiciones y concentraciones de polímeros afectan tanto las características microscópicas como macroscópicas de los hidrogeles. En este caso, el potencial zeta mide la carga superficial de los polielectrolitos disueltos, proporcionando información sobre la densidad de carga de las soluciones precursoras empleadas en la preparación de los hidrogeles (Ravishankar et al., 2019).

Como se esperaba, los resultados confirmaron que el polianión (Q) presenta carga positiva y el polianión (P) carga negativa. Los resultados se observan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Resultados de Potencial Zeta y de conductividad para soluciones con P o Q y con o sin NaCl formuladas a pH 4, 4,5 y 5.

	QP-0-5	QP-0,15-5	QP-0,15-10	QP-0,5-5
Potencial en solución de P (mV)	-12,8	-6	-7,6	-3,3
Potencial en solución de Q (mV)	16,6	15,3	19,5	13,2
Diferencia de potencial	3,8	9,3	11,9	9,9
Conductividad P (mS/cm)	9,9	20,5	19,8	40,6
Conductividad Q (mS/cm)	10,4	21,1	20,6	44,9

De las soluciones analizadas, cinco mostraron conductividades eléctricas muy altas, lo que posiblemente afectó la precisión de los valores medidos (Tabla 3.4, valores en rojo). La alta conductividad, atribuida a los cationes y aniones presentes a pH 4, provoca un flujo de corriente elevado que interfiere en la medición. En este pH, el polímero Q tiene numerosos grupos amino protonados, mientras que el polímero P contiene grupos carboxilo ionizados. Además, la presencia de NaCl y la concentración de polímeros contribuyen a la conductividad.

Cabe mencionar que la conductividad eléctrica de la piel varía ampliamente, desde 2,6 mS/cm hasta 1×10^{-4} mS/cm, y este rango es relevante para materiales como los apósitos para heridas, ya que podría influir positivamente en procesos biológicos como migración, diferenciación, proliferación y adhesión celular (Qu et al., 2019). Un estudio reciente destacó que los hidrogeles con polímeros cargados, como Q y P, favorecen la curación de heridas debido a su conductividad eléctrica (Liang et al., 2021). Aunque estos polímeros no son intrínsecamente conductores, adquieren carga bajo ciertas condiciones de pH debido a la ionización de sus grupos funcionales.

Es importante evitar mediciones en muestras con conductividad mayor a 200 mS/cm, ya que esto no solo afecta la precisión de los resultados, sino que también puede generar sobrecalentamiento que daña el electrodo del equipo o la muestra (Lunardi et al., 2021). En este estudio, se estableció un límite de 40 mS/cm para garantizar mediciones confiables.

Se observó que los hidrogeles con una concentración de 10 mg/ml de polímeros y 0,15 M de NaCl tuvieron una mayor diferencia de potencial (11,9 mV) en comparación con los hidrogeles de 5 mg/ml (9,3 mV). Asimismo, en los hidrogeles de 5 mg/ml, las soluciones sin NaCl mostraron una menor diferencia de potencial en comparación con las que contenían 0,15 M NaCl.

Una menor diferencia de potencial sugiere una interacción más equilibrada entre los grupos funcionales de las soluciones de P y Q, lo que puede contribuir a una mayor estabilidad térmica, mejor compactación estructural y otras propiedades deseables. Estos resultados refuerzan la conclusión de que la presencia de NaCl tiene un impacto significativo en las interacciones entre los grupos funcionales de los polielectrolitos, modificando los valores de potencial zeta y, por ende, las propiedades de los hidrogeles.

3.4 Selección preliminar de formulaciones óptimas de CoPECs QP.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos térmicos, SEM, potencial Zeta, y de hinchamiento y morfología, se seleccionaron los siguientes hidrogeles para continuar con la caracterización y los ensayos más específicos para aplicaciones biomédicas, como apósitos para heridas:

QP-0-5 → Hidrogel obtenido a pH 4 con 5 mg/ml de concentración de polímeros Q y P, sin NaCl.

QP-0,15-5 → Hidrogel obtenido a pH 4 con 5 mg/ml de concentración de polímeros Q y P, con 0,15 M de NaCl.

3.4.1 Justificación de la selección.

La selección de estos hidrogeles responde a la necesidad de comparar el efecto de la presencia o ausencia de sal en sus propiedades. El hidrogel QP-0,15-5 tiene una estructura más porosa con paredes de poros mayores, lo que podría influir en su capacidad de hinchamiento y liberación de compuestos terapéuticos. Por otro lado, el hidrogel QP-0-5 presenta una estructura más compacta y una diferencia de potencial zeta menor, lo que puede ofrecer ventajas en términos de estabilidad y comportamiento mecánico.

Ambos hidrogeles demostraron una capacidad de hinchamiento adecuada, crucial para aplicaciones en apósitos para heridas, ya que deben ser capaces de absorber exudados y liberar agentes terapéuticos. Además, los resultados de TGA evidenciaron que ambos tienen una estabilidad térmica adecuada, garantizando el mantenimiento de sus propiedades bajo condiciones fisiológicas.

3.4.2 Justificación de exclusión de otros hidrogeles.

Hidrogeles con alta concentración de NaCl (QP-0,5-5 y QP-0,5-10).

Estos hidrogeles fueron descartados debido a que la alta concentración de NaCl (0,5 M) en estos sistemas resultó en una elevada conductividad, lo cual puede afectar la estabilidad del hidrogel. Por otro lado, dicha concentración también puede influir negativamente en el comportamiento de hinchamiento, favoreciendo la formación de agregados. Además, la mayor cantidad de sal pudo haber inducido una porosidad excesiva que impacte negativamente en el entrecruzamiento del hidrogel y disminuya su capacidad de retención de agua.

Hidrogeles con 0,15 M de NaCl y 10 mg/ml de concentración de polímeros.

En el caso de los hidrogeles con NaCl pero con una concentración de 10 mg/ml de polímeros (QP-0,15-10), se obtuvo un peso final de 1,2 g, menor en comparación con el hidrogel QP-0,15-5, que alcanzó un peso final de 1,4 g. Este menor peso podría reflejar una menor capacidad de retención de agua, posiblemente debido a una estructura más compacta, o bien ser indicativo de una estructura menos estable con pérdida de componentes, lo cual no es adecuado para la aplicación, ya que se busca lograr una estructura estable e hidratada (Tavakoli and Klar, 2020). Además, aunque el hidrogel con 0,15 M NaCl presentó una estructura más porosa, la mayor concentración de polímeros (10 mg/ml) no ofreció una ventaja clara en términos de hinchamiento o estabilidad respecto al QP-0,15-5. De hecho, el espesor de las paredes de los poros es menor en los hidrogeles con 10 mg/ml.

Por estos motivos, se seleccionaron dos hidrogeles que permiten una comparación directa para analizar los efectos de la sal en otros ensayos.

3.5 Ensayos con los hidrogeles seleccionados.

A partir de esta sección, los hidrogeles seleccionados se denominan QP-0 y QP-0,15, ya que ambos tienen una concentración de 5 mg/ml de polímeros. La diferencia entre ellos radica en la concentración de NaCl: QP-0 no contiene NaCl, mientras que QP-0,15 contiene 0,15 M de NaCl.

3.5.1 Comportamiento en condiciones fisiológicas: Hinchamiento.

Se realizaron ensayos de hinchamiento en las siguientes condiciones:

- pH 4 con 0 o 0,15 M de NaCl: Este pH fue seleccionado porque es el utilizado en la formulación de los hidrogeles. Además, se agregó NaCl al medio para evaluar el efecto de las condiciones osmóticas.
- SF a temperatura ambiente o a 37 °C: Se utilizó esta solución y temperaturas debido a su similitud con las condiciones fisiológicas, ya que el pH de la SF es de aproximadamente 6,4 y la temperatura de las heridas ronda los 37 °C.
- pH 9,2: Este pH fue analizado para estudiar el comportamiento de los hidrogeles, considerando las cargas de los polímeros.

Tal como se observa en la Figura 3.7, los hidrogeles hinchados a pH 4, en promedio, mostraron capacidad de hinchamiento. En ausencia de NaCl en el medio de hinchamiento, el hidrogel QP-0 presentó un hinchamiento mayor en comparación con el hidrogel QP-0,15. Esto se atribuye a la repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas del QP-0, que favorece el hinchamiento. En el caso del hidrogel QP-0,15, dicha repulsión está disminuida debido a la interacción de los iones de NaCl con las cadenas durante la síntesis, lo que afecta la capacidad de hinchamiento.

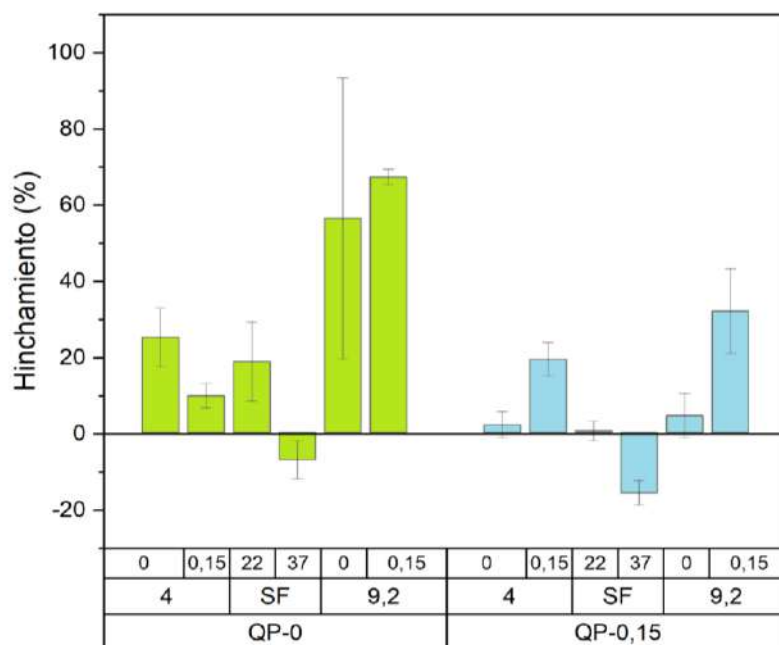


Figura 3.7. Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles QP en diferentes medios y condiciones, formulados sin NaCl (barras verdes) o con NaCl (barras celestes).

El valor de hinchamiento del hidrogel QP-0 disminuyó al colocarlo en un medio con NaCl, lo que se atribuye a la compensación osmótica. Aunque el agua ingresa al hidrogel, también tiende a salir debido a los cambios en el equilibrio de iones entre la solución y el material (Hariri and Schlenoff, 2010). En el caso del hidrogel QP-0,15, que contiene sal en su composición y presenta una estructura menos compacta debido a la interacción con esta, se observa la liberación de iones al medio y, consecuentemente, una pérdida de agua superior a la del hidrogel QP-0 hasta alcanzar el equilibrio (Schaaf and Schlenoff, 2015).

Estos resultados se reflejan en los datos obtenidos, donde a pH 4 sin NaCl, el hidrogel QP-0 mostró un mayor grado de hinchamiento en comparación con QP-0,15. Sin embargo, a pH 4 en presencia de 0,15 M NaCl, QP-0,15 presentó un mayor hinchamiento, lo cual podría explicarse por su estructura más porosa, determinada en la sección 3.3.3. Esta estructura permitiría el ingreso de los iones de NaCl y, por ende, la incorporación de buffer en la red tridimensional del hidrogel. Las imágenes obtenidas mediante SEM evidenciaron que QP-0,15 posee una mayor porosidad en comparación con QP-0, lo cual facilita la absorción de agua y, potencialmente, de iones. Este comportamiento concuerda con estudios previos que indican que estructuras porosas interconectadas mejoran las propiedades de hinchamiento y funcionalidad de los hidrogeles (Suneetha et al., 2020).

Las diferencias observadas en los resultados de hinchamiento de los hidrogeles dependen tanto del pH como de la presencia de NaCl en el medio. Como se vio en la sección 3.3.2, a pH 5 y sin NaCl, QP-0 presentó un hinchamiento de $23,47 \pm 1,45$ %, mientras que en presencia de 0,15 M de NaCl este valor disminuyó a $-8,66 \pm 2,05$ %. Por otro lado, QP-0,15 alcanzó un hinchamiento de $10 \pm 2,59$ % a pH 5 sin NaCl y de $-5,43 \pm 0,82$ % con 0,15 M de NaCl. La variación del pH generó respuestas diferenciales en los hidrogeles formulados, especialmente en presencia de 0,15 M NaCl, donde a pH 5 los materiales se deshincharon, mientras que a pH 4 se observó hinchamiento. Este comportamiento está relacionado con las cargas del material, ya que al ser formulados a pH 4, un cambio a pH 5 puede generar mayor desprotonación y, consecuentemente, una reducción del hinchamiento. Sin embargo, cuando el medio de hinchamiento no contenía NaCl, los resultados de hinchamiento a pH 5 y pH 4 fueron equivalentes. La presencia de NaCl, tanto en la formulación del hidrogel como en el medio de hinchamiento, influyó significativamente en el porcentaje de hinchamiento alcanzado.

En los ensayos con SF, a temperatura ambiente, los hidrogeles QP-0 se hincharon, mientras que los QP-0,15 permanecieron relativamente en equilibrio. No obstante, a 37 °C, ambos hidrogeles se deshincharon. Este comportamiento resulta relevante para aplicaciones como apósitos, ya que permite hidratar la zona de la herida y, en caso de incorporar un principio activo o nanopartículas, favorecería su liberación mediante el efecto osmótico (Sui, 2022). Además, esta respuesta deja en evidencia la dependencia del comportamiento del material con la temperatura, lo cual podría estar relacionado con el incremento del movimiento molecular o cambios en las interacciones del agua con la red del hidrogel a temperaturas más elevadas, generando una mayor difusión (Erceg et al., 2021).

No se observaron signos de degradación en los hidrogeles durante los ensayos previamente mencionados, a pesar de encontrarse a un pH cercano al punto isoeléctrico del quitosano ($pI \approx 6,3$). Sin embargo, cuando se expusieron a un medio con pH 9,2, se observó que a las 48 horas de inmersión ya habían comenzado a degradarse. Desde el momento en que se colocaron en solución se evidenció un cambio estructural, tornándose pegajosos y desarmándose al contacto. Este comportamiento se atribuye a que, a pH 9,2, la carga neta del quitosano es negativa, lo que disminuye las interacciones electrostáticas entre los polímeros, llevando a la separación de las cadenas y a la desintegración del hidrogel (Rydzek et al., 2018).

El análisis de hinchamiento en distintas condiciones permitió evaluar la versatilidad de los hidrogeles y su respuesta frente a variaciones en pH, contenido de NaCl y temperatura. Los resultados

obtenidos destacan la importancia de las interacciones electrostáticas en la estabilidad estructural del material, por lo que se procedió a realizar estudios complementarios mediante FTIR. Asimismo, el hecho de que los hidrogeles se hayan deshinchado a 37 °C en SF abre la posibilidad de explorar la liberación de principios activos, como lidocaína, y evaluar su comportamiento en futuros ensayos.

3.5.2 Caracterización físico-química de los materiales.

La técnica de FTIR-ATR permitió identificar los grupos funcionales presentes en los polímeros y en los hidrogeles, proporcionando información detallada sobre su composición química y las interacciones químicas involucradas. Los espectros correspondientes a los polímeros y los hidrogeles se presentan en la Figura 3.8.

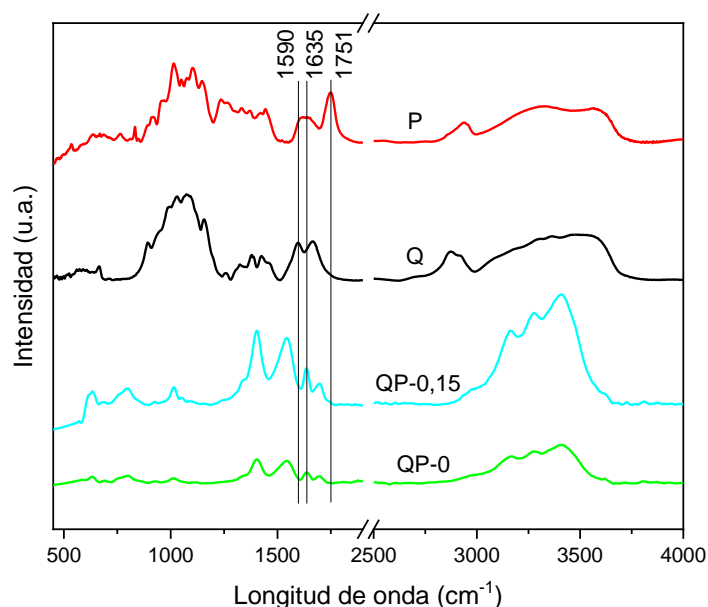


Figura 3.8. Espectros de FTIR para los hidrogeles QP y los polímeros solos.

En los espectros de ambos hidrogeles se identificaron picos en la región comprendida entre 3000 y 3700 cm⁻¹, correspondientes al estiramiento de los grupos hidroxilo (-OH). Estos grupos funcionales son conocidos por participar en interacciones mediante puentes de hidrógeno (Ehman, 2019). La presencia de -OH también se observó en los espectros de los polímeros individuales, lo cual concuerda con su composición química. En los hidrogeles, se detectaron tres picos predominantes en

esta región, atribuibles tanto a los grupos -OH estructurales como a las interacciones con el agua durante la síntesis. En el caso del Q, esta región también muestra señales de grupos amino libres (-NH₂), con un estiramiento característico alrededor de los 3486 cm⁻¹ (Sharma et al., 2019). Sin embargo, en los hidrogeles, estos grupos se encuentran en menor proporción debido a su protonación (-NH₃⁺) y posterior interacción con los grupos funcionales del polímero P para la formación de PECs.

Por otro lado, el espectro de P mostró un corrimiento del pico correspondiente a los grupos éster, ubicado a 1751 cm⁻¹ (Zhang et al., 2018). Este desplazamiento puede atribuirse a la formación de puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas dentro de los PECs. Asimismo, en la P, entre 1610 y 1660 cm⁻¹, se detectó un pico ancho característico de los grupos ácidos carboxilo (-COOH) (Neufeld and Bianco-Peled, 2017). En los hidrogeles, los grupos carboxilo cargados negativamente, al interactuar con los grupos amino del Q, generaron un cambio en esta región, apareciendo un pico más estrecho a 1635 cm⁻¹.

En el espectro del Q, se observó un pico a 1590 cm⁻¹ asociado a las vibraciones de los grupos amino libres (Osman and Arof, 2003). Este pico no se encuentra en los hidrogeles, ya que los grupos amino, al estar en solución acuosa al pH seleccionado, fueron protonados y formaron complejos con los grupos carboxilato de la P. Como resultado de esta interacción, los picos típicos de los grupos amino protonados (-NH₃⁺), generalmente visibles en las regiones de 1646 cm⁻¹ y 1555 cm⁻¹ (Branca et al., 2016) no se detectaron o presentaron alteraciones, confirmando así la formación de los PECs en los hidrogeles.

De esta manera, las interacciones entre los polímeros en el hidrogel resultan ser de tipo electrostático, caracterizando el entrecruzamiento como un proceso físico. Este fenómeno es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de hinchamiento a pH 9,2, donde se observó la desintegración de los geles debido a la desprotonación del Q. Estas interacciones confieren a los hidrogeles propiedades multi-responsivas (Gucht et al., 2011).

En cuanto a las diferencias entre los espectros con y sin la presencia de NaCl en la composición, no se observaron cambios en los picos detectados. Por lo tanto, las interacciones entre los polímeros predominaron por sobre las interacciones Q-Cl y P-Na.

Finalmente, se evaluó la cristalinidad de los hidrogeles mediante la técnica de DRX. Como se muestra en la Figura 3.9, la muestra que contenía NaCl en su composición (QP-0,15) presentó picos asociados a una mayor cristalinidad en comparación con QP-0. Estos picos se atribuyen a los planos cristalinos del NaCl.

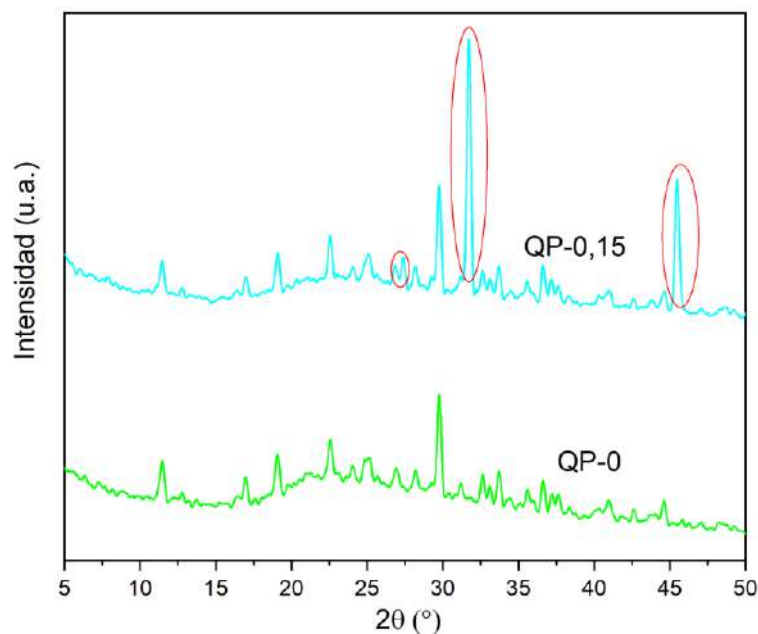


Figura 3.9. Comparación entre espectros de DRX de los hidrogeles con o sin NaCl.

Este resultado concuerda con las observaciones realizadas mediante SEM, donde los hidrogeles obtenidos presentan estructuras heterogéneas. En los difractogramas de rayos X, los picos presentes en los hidrogeles con NaCl y ausentes en el hidrogel sin sal se localizan en los ángulos de 27,4°, 31,8° y 45,5°. Según la bibliografía consultada, estos picos corresponden a la forma cristalina de NaCl (Bao et al., 2017), en particular, se refieren a los planos (111), (200) y (220) (Kiran Kumar et al., 2012). La identificación de cristales de NaCl sugiere que no todo el NaCl añadido interactuó con las cadenas poliméricas, por lo que los cristales también forman parte de la estructura del hidrogel. Este fenómeno podría atribuirse al proceso de secado de las muestras previo al ensayo.

En solución acuosa, el NaCl se disocia en iones Na^+ y Cl^- , lo que permite interpretar los resultados obtenidos en las pruebas de hinchamiento de los hidrogeles. Sin embargo, en los patrones de DRX no se observaron cambios significativos, con excepción de los picos característicos del NaCl, lo que indica que las interacciones entre los iones y las cadenas poliméricas no generan alteraciones

estructurales significativas en el hidrogel. Además, ambos hidrogeles presentaron picos de menor intensidad junto con una zona amorfa, lo que evidencia una estructura semicristalina.

Los resultados obtenidos en este análisis, junto con los del FTIR, permiten inferir que las interacciones predominantes se establecen entre los polímeros Q y P, mientras que la incorporación de NaCl no genera ni modifica las interacciones químicas entre ellos. No obstante, dado que se observó que tanto la estabilidad térmica como la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles se vieron modificadas, resulta pertinente realizar ensayos mecánicos para completar la caracterización.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de la red polimérica y el grado de entrecruzamiento, se llevó a cabo el ensayo de GF. Este parámetro, cuya magnitud es directamente proporcional al grado de entrecruzamiento (Enawgaw et al., 2021), arrojó valores de $74,4\% \pm 0,3\%$ para QP-0 y de $58,2\% \pm 1,6\%$ para QP-0,15. Si bien los hidrogeles QP-0,15 presentan un peso mayor que los QP-0, como se observa en la Tabla 3.1, la GF resultó ser menor. Esto podría atribuirse a una red polimérica más flexible o con mayor capacidad de retención de agua debido a la presencia de sal en su composición.

Este comportamiento concuerda con los valores de potencial zeta, que sugieren una mayor interacción entre las soluciones poliméricas de Q y P en QP-0 respecto a QP-0,15. Este fenómeno puede explicarse a partir del efecto conocido como dopaje de sal, descrito en la literatura (Bediako et al., 2023), donde los iones presentes en la solución interactúan con los grupos funcionales de las cadenas poliméricas, reduciendo las interacciones electrostáticas directas entre los polímeros. Como consecuencia, la red tridimensional resultante es menos compacta o más laxa, debido a que los iones actúan como agentes disruptores de la densidad de interacciones entre las cadenas. De manera análoga, en los hidrogeles QP-0,15, la presencia de sal genera una red polimérica más flexible, lo que explica los valores inferiores de GF obtenidos.

3.5.3 Respuesta mecánica en ensayos de compresión.

En la Figura 3.10 se observa el comportamiento general de las curvas obtenidas, donde los hidrogeles presentan características viscoelásticas y no alcanzan el punto de rotura. Esto puede atribuirse a los parámetros estructurales evaluados o a la elevada capacidad de deformación que caracteriza a estos materiales. Esto se debe a su estructura interna, compuesta por una red polimérica flexible y un alto contenido de agua, lo que les permite absorber y distribuir las tensiones aplicadas (Gonzalez and Alvarez, 2014).

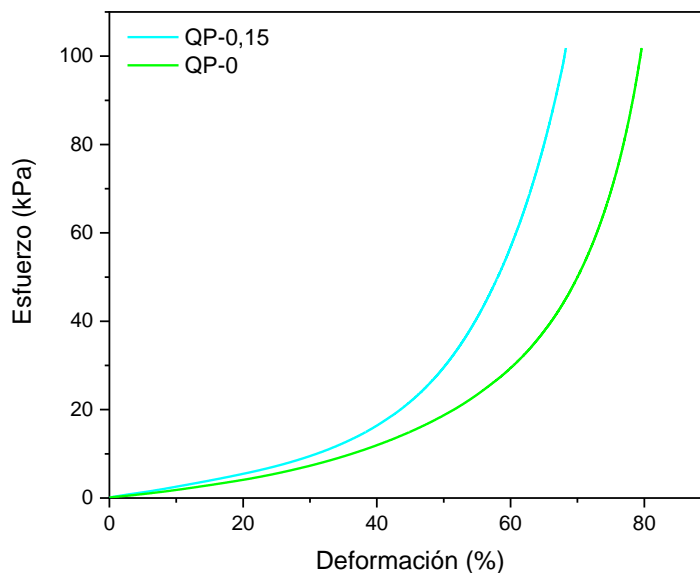


Figura 3.10. Ejemplo de curvas esfuerzo-deformación obtenidas en el ensayo de compresión de hidrogeles QP con o sin NaCl.

En los hidrogeles, al igual que en otros materiales, no resulta apropiado comparar el módulo elástico obtenido en compresión con el obtenido en tracción, dado que pueden registrarse variaciones de hasta dos órdenes de magnitud; este fenómeno es conocido como asimetría tracción-compresión (Drozdov and Christiansen, 2020). En este estudio, los ensayos se realizaron bajo compresión, y los resultados indican que la deformación máxima alcanzada al finalizar el ensayo fue similar para los hidrogeles con y sin NaCl en su composición, hinchados tanto en pH 4 como en SF. Los resultados se presentan en la Figura 3.11.

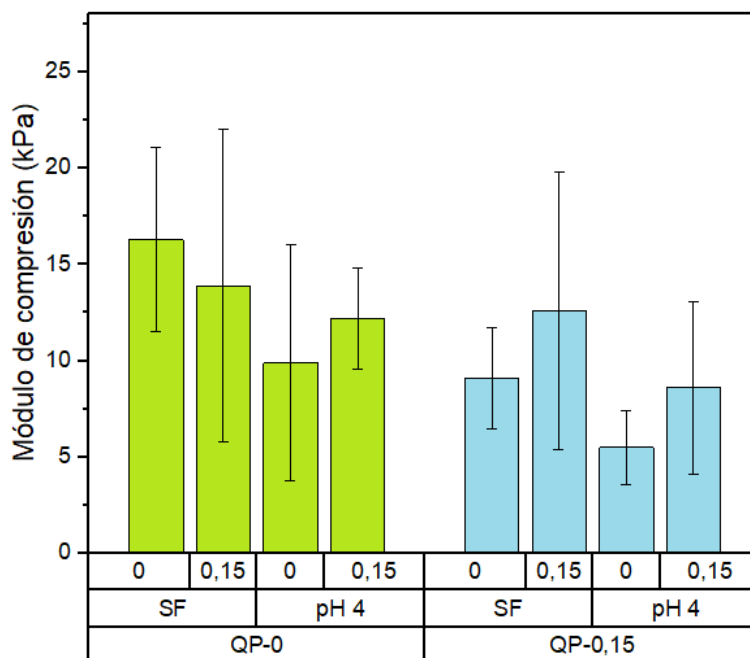


Figura 3.11. Resultados del ensayo de compresión para los hidrogeles QP-0 y QP-0,15 hinchados en distintas condiciones.

Se determinó que la deformación máxima de los hidrogeles fue mayor cuando se encontraban hinchados a pH 4 en comparación con los hinchados en SF, bajo el mismo nivel de esfuerzo aplicado. Además, el módulo de compresión promedio resultó mayor en los hidrogeles QP-0 y, en todos los casos, los valores promedio del módulo fueron inferiores cuando los hidrogeles fueron hinchados a pH 4 en comparación con los hinchados en SF. Esto sugiere que sumergir los hidrogeles en SF aumenta su rigidez, lo cual resulta favorable considerando que la SF simula el ambiente biológico en el cual los hidrogeles serían empleados. Aunque se reportan valores promedio de los módulos de compresión, es importante destacar que los errores entre réplicas son elevados debido a las características viscoelásticas inherentes de los materiales y a la posible pérdida de agua bajo compresión (Calvert, 2009; Oyen, 2014).

Por otro lado, el módulo de compresión de la piel humana varía según diversos factores. Estudios previos en los que se desarrollaron plataformas multicapa de epidermis y dermis *in vitro* han reportado valores promedio de módulo de compresión de alrededor de $20,0 \pm 0,9$ kPa, dentro del rango más amplio reportado en la literatura, que puede variar de 7 a 344 kPa dependiendo de la edad, la región anatómica y el grado de hidratación de la piel (Brocklehurst et al., 2023). En este trabajo, los módulos obtenidos para los hidrogeles resultaron comparables con los reportados para la piel, lo cual constituye un resultado promisorio.

Los resultados obtenidos indican que la incorporación de NaCl no produjo variaciones significativas en los módulos bajo distintas condiciones de hinchamiento, ya que los valores registrados se encuentran dentro del rango de error experimental. Por último, los módulos determinados para los hidrogeles están en el orden de los valores reportados para la piel humana, pero pueden mejorarse mediante la incorporación de refuerzos. Entre estos, los nanohilos de celulosa representan una alternativa prometedora, y su efecto sobre las propiedades mecánicas y reológicas se analiza en detalle en el Capítulo 4.

3.5.4 Evaluación de funcionalidad: Tasa de transmisión de vapor de agua.

Se reconoce que mantener un ambiente húmedo en la herida favorece el proceso de cicatrización, ya que permite preservar las células funcionales en el área afectada (Madden and Stark, 2019). Valores elevados de la WVTR pueden ocasionar deshidratación, mientras que valores bajos pueden llevar a la acumulación de exudado (Xu et al., 2016). Por lo tanto, un valor intermedio resulta óptimo para los apósitos destinados al tratamiento de heridas.

En el caso de la piel normal, el WVTR se encuentra alrededor de 204 g/(m²·día). Para piel lesionada, los valores varían dependiendo del tipo de herida, desde 279,1 g/(m²·día) en quemaduras de primer grado hasta 5137,9 g/(m²·día) en heridas granulares (Ujang et al., 2014). Además, existe una correlación entre la profundidad de las heridas y el WVTR, siendo mayor en heridas más profundas en comparación con aquellas más superficiales (Nuutila and Eriksson, 2021). Estos valores también están influenciados por las condiciones en las que se realiza el ensayo, como la temperatura y la humedad relativa del medio (Lin et al., 2009).

Existen diversos métodos para medir esta propiedad, los cuales pueden incluir el uso de un agente deshidratante con humedades relativas bajas o con agua y humedades relativas altas (Nuutila and Eriksson, 2021). Dichos métodos están descritos en la norma ASTM E96-00e1 (ASTM International, 2017).

En este trabajo, el objetivo fue simular un entorno húmedo para evaluar el comportamiento de los hidrogeles. Los valores de WVTR obtenidos fueron de 561,6 ± 21,6 g/(m²·día) para el hidrogel QP-0 y 415,2 ± 81,6 g/(m²·día) para el hidrogel QP-0,15. Estos resultados sugieren que los hidrogeles, debido a sus valores relativamente bajos de WVTR, permiten mantener la humedad en la zona de la

herida. Por lo tanto, podrían ser adecuados para el tratamiento de quemaduras de primer grado o quemaduras superficiales de segundo grado.

Cabe señalar que, dado que no todos los estudios reportan el método empleado para medir el WVTR, resulta complejo establecer comparaciones directas entre diferentes reportes. Las heridas de primer grado, en las que los hidrogeles podrían ser útiles, afectan únicamente la epidermis, la capa más superficial de la piel. Entre los síntomas más comunes de estas heridas se encuentran el eritema y la sequedad (Hussain et al., 2022), problemas frente a los cuales los hidrogeles ofrecen beneficios gracias a su capacidad hidratante y, en este caso, a las propiedades antiinflamatorias conferidas por la P. En el caso de heridas de segundo grado, el riesgo de infección constituye un desafío. Por ello, es fundamental que los hidrogeles destinados a este tipo de heridas cuenten, además, con propiedades antimicrobianas que ayuden a prevenir infecciones.

3.5.5 Actividad antibacteriana.

3.5.5.1 Medición del halo de inhibición.

La relevancia de esta prueba radica en la aplicación de los hidrogeles como apósitos para heridas, dado que las infecciones bacterianas son una causa común de complicaciones en el proceso de cicatrización (Francesko et al., 2019). Inicialmente, se evaluó la carga microbiana presente en los hidrogeles, sin observar crecimiento de microorganismos. Este resultado es favorable, ya que, aunque los materiales no fueron sintetizados en condiciones de esterilidad, no presentaron una carga microbiana observable.

Es sabido que microorganismos como *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes* (Gram-positivas) están asociados con las etapas iniciales de la infección, mientras que *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativas) son frecuentes en heridas crónicas (Simões et al., 2018). En este ensayo, se evaluó la actividad antimicrobiana de los hidrogeles mediante la medición del halo de inhibición frente a *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados, representados en la Figura 3.12, evidenciaron sensibilidad de ambos microorganismos a los hidrogeles.

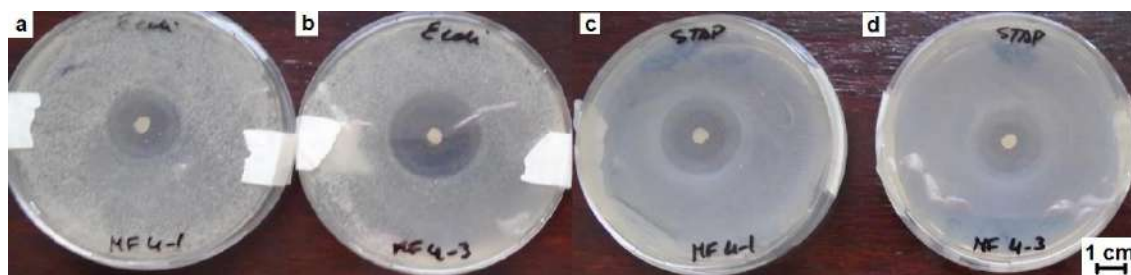


Figura 3.12. Actividad antibacteriana de los hidrogeles. Halo y pseudohalo de hidrogeles QP-0 en respuesta a *E. coli* (a) y *S. aureus* (c) e hidrogel QP-0,15 en respuesta a *E. coli* (b) o *S. aureus* (d).

Se observaron dos halos de inhibición: Uno completo, por ausencia total de crecimiento bacteriano, y uno parcial (pseudohalo). El diámetro de los halos varió según la muestra y el microorganismo analizado. Contra *E. coli*, se evidenció un aumento en la inhibición al incorporar NaCl, un efecto que no se replicó en *S. aureus*. Esto sugiere que el NaCl podría poseer actividad antimicrobiana, especialmente sobre *E. coli* (Sofos, 1984).

Un estudio previo realizado por Nakayama et al. (Nakayama et al., 2012) analizó el efecto del NaCl al 4% sobre la viabilidad celular de *S. aureus* NBRC 13276 y *E. coli* O157:H7. No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad de *S. aureus* entre medios con y sin NaCl. Sin embargo, en el caso de *E. coli*, se evidenció una reducción significativa en el recuento de UFC en medios selectivos con NaCl, lo que confirma su efecto antimicrobiano. Esta diferencia puede atribuirse a las características de tolerancia a la salinidad, mientras que *E. coli* es no-halófilo, *S. aureus* es halófilo moderado, lo que le permite sobrevivir en condiciones de mayor salinidad, aunque con un crecimiento potencialmente más lento (OmotoyinboO, 2017).

De todas formas, la actividad antimicrobiana se atribuye también a los polímeros P y Q. El Q ha demostrado capacidad para reducir el crecimiento y la multiplicación en *E. coli* y *S. aureus*; su actividad depende del grado de acetilación, el peso molecular (Goy et al., 2009) y el pH del medio (Qin et al., 2006). Además, la P tiene un efecto bactericida sobre los microorganismos patógenos y oportunistas más ampliamente distribuidos (Men'shikov et al., 1997).

3.5.6 Ensayo preliminar *In vivo*.

De las ratas utilizadas, solo una logró mantener el apósito en su lugar durante 4 días consecutivos desde el inicio del experimento. Las demás ratas, de alguna manera, desprendieron los apósitos. Aunque se intentaron mejorar las estrategias de sujeción y se volvieron a colocar los

hidrogeles, los resultados obtenidos de esas ratas podrían no ser completamente fiables. Por este motivo, se decidió analizar únicamente los datos de la rata que mantuvo los hidrogeles correctamente durante los 4 días del ensayo.

Como resultado, el cierre del lecho de la herida fue del 11,7% en el grupo control (con gasa de furacinada), del 22,3% para QP-0 y del 25,4% para el hidrogel QP-0,15. Estos valores fueron medidos al día 4 después de la lesión. La Figura 3.13 presenta imágenes representativas del cierre del lecho de la herida para cada tratamiento.



Figura 3.13. Prueba *in vivo* de cicatrización de heridas del tratamiento con hidrogel en el día cuatro después de la lesión. a y b son grupos de control en el día 0 y el día 4, respectivamente. Tratamiento con hidrogel QP-0 (c y d) e hidrogel QP-0,15 (e y f).

El día 19 del análisis, las heridas de todos los grupos estaban completamente cerradas. Aunque estos resultados son preliminares, sugieren que los hidrogeles QP-0 y QP-0,15 favorecen la contracción y proliferación tisular en las heridas en comparación con el grupo control. Igualmente, es importante señalar que estos resultados deben ser analizados con mayor profundidad en futuros ensayos que incluyan un mayor número de ratas para garantizar una mayor validez estadística y reproducibilidad.

3.6 Incorporación de un compuesto activo: Lidocaína.

La lidocaína (LD) es una droga conocida por su acción calmante y anestésica, utilizada comúnmente para aliviar el dolor en heridas. Se sabe que puede aumentar la vasodilatación y la perfusión sanguínea durante el proceso de curación (Eroglu et al., 2001; Weinschenk et al., 2017).

Hasta la fecha, no se han encontrado estudios en los que se haya evaluado la liberación de lidocaína en CoPECs QP, por lo que se considera novedoso investigar su incorporación a estos hidrogeles y determinar si son capaces de liberar este compuesto activo a lo largo del tiempo. La liberación de LD por parte de los hidrogeles es de gran importancia, ya que podría otorgarles propiedades calmantes frente al dolor. Para determinar el patrón de liberación de este agente, en primer lugar, se analizó cómo se incorpora la LD en los geles, la efectividad del procedimiento de síntesis y el porcentaje de LD retenido en el hidrogel. Posteriormente, la liberación se evaluó bajo condiciones que simulan el ambiente fisiológico.

3.6.1 Síntesis de los hidrogeles QP con lidocaína.

Se utilizó LD viscosa al 2% p/p de Denver Farma. Para preparar los hidrogeles, se mezclaron 6 ml de solución de LD con 54 ml de buffer, lo que resultó en una concentración de 2 mg/ml (0,2% p/p) de lidocaína en los hidrogeles. La mezcla se agitó durante unos minutos para homogeneizar la solución, y luego se incorporaron los polímeros y la sal. Se eligió una concentración de 2 mg/ml de LD, considerando que es un valor relativamente bajo, lo que se espera que no afecte la citotoxicidad celular, pero sí permita evaluar la cinética de liberación del compuesto.

3.6.2 Evaluación de la encapsulación del compuesto activo.

La capacidad de encapsulamiento de LD en el hidrogel fue del 75%, con 45 mg de LD retenidos en el material. Posteriormente, se realizaron réplicas de los hidrogeles obtenidos para evaluar la liberación de LD.

3.6.3 Liberación de lidocaína.

La Figura 3.14 muestra el porcentaje de liberación de LD en diferentes tiempos.

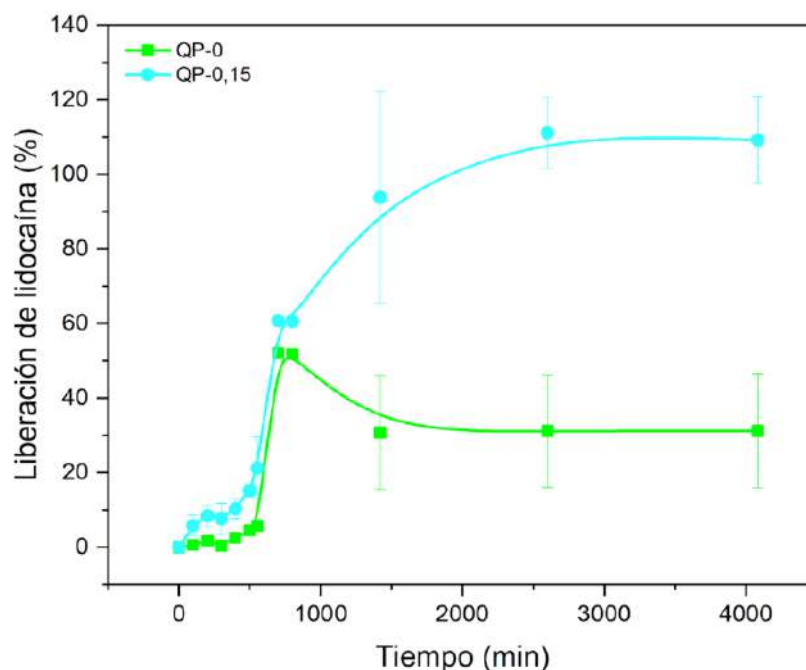


Figura 3.14. Curva de liberación de LD de los hidrogeles a 37 °C en SF.

Los resultados indican que la incorporación de NaCl en el hidrogel (QP-0,15) parece influir en su capacidad de liberación de LD. La liberación máxima de LD se observó en QP-0,15 después de 25 horas (1500 minutos), mientras que en QP-0 ocurrió alrededor de las 8 horas (480 minutos). Además, el porcentaje de liberación alcanzado por QP-0,15 fue significativamente mayor que el de QP-0 (100% frente a 30%, respectivamente). Estos resultados podrían estar relacionados con el tamaño y la distribución de la porosidad de los hidrogeles, así como con la retención de LD dentro de sus poros.

La adición de NaCl ha sido reportada como un factor que aumenta la tasa de liberación de LD (Jimenez-Kairuz et al., 2002). Esto puede explicarse por el intercambio iónico entre los iones Na^+ y la LD con los polianiones presentes en el hidrogel. Además, la presión osmótica cambia a lo largo del experimento debido a la difusión de NaCl fuera del hidrogel, lo que podría favorecer una liberación más completa de LD.

Este comportamiento también puede estar relacionado con los resultados de hinchamiento a 37 °C en SF (sección 3.5.1), donde se observó que QP-0,15 desorbía más que QP-0. La presencia de NaCl modifica la permeabilidad del material, favoreciendo la liberación del fármaco (Buriuli and Verma, 2017).

La importancia de este experimento radica en demostrar que es posible incorporar LD en los hidrogeles, liberar el fármaco y mantener su liberación durante un periodo prolongado. Esto permitiría

que los hidrogeles actúen como apósitos calmantes para heridas, gracias al efecto anestésico local de la LD. Además, los resultados evidencian que la adición de NaCl juega un papel clave en lograr una liberación sostenida de LD a lo largo del tiempo. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar el efecto calmante y determinar la concentración óptima de LD.

3.6.4 Evaluación de la biocompatibilidad celular.

Este ensayo permitió evaluar el efecto de la liberación de sustancias provenientes de los hidrogeles en el medio donde se encuentran las células, determinando si la liberación de LD o de NaCl afecta la viabilidad celular. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.15.

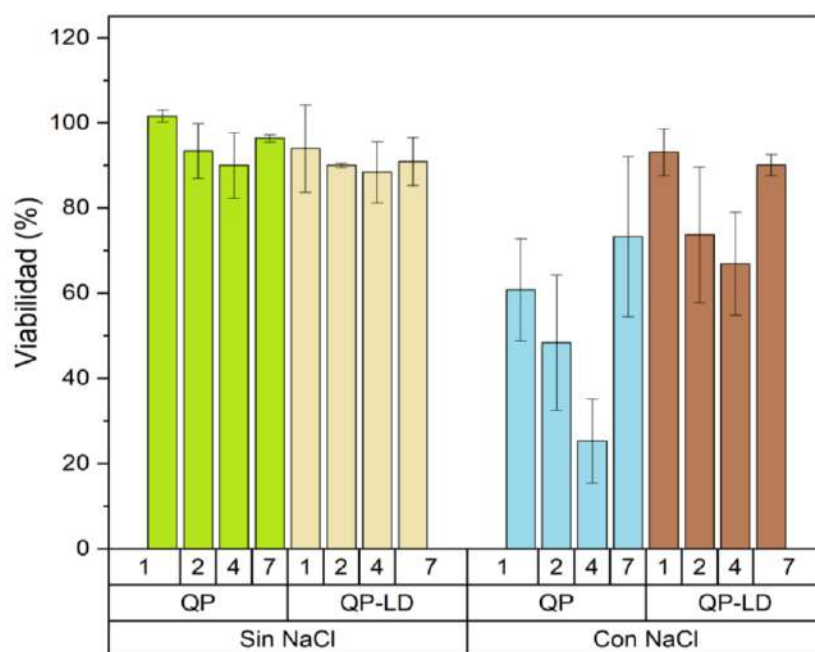


Figura 3.15. Resultados de viabilidad celular (%) para los hidrogeles QP-0 y QP-0,15 con o sin LD con sus respectivos errores.

Se observó que la viabilidad celular disminuyó a los días 2 y 4 en todos los casos analizados. No obstante, a los 7 días de incubación, la viabilidad celular aumentó nuevamente, lo cual podría atribuirse a la recuperación de las células que continuaron su replicación y/o a que la liberación de sustancias del hidrogel al medio finalizó.

La presencia de NaCl en los hidrogeles mostró un impacto mayor en la viabilidad celular en comparación con aquellos sin NaCl, evidenciándose valores significativamente menores, especialmente en el día 4. Por otro lado, la incorporación de LD en los hidrogeles QP-0,15 pareció

mejorar la citocompatibilidad, ya que se obtuvieron valores correspondientes a un comportamiento no citotóxico en los días 1 y 7. Asimismo, se registró un incremento en el porcentaje de viabilidad celular en los días 2 y 4.

3.7 Aplicación de los hidrogeles.

Se llevó a cabo un análisis para evaluar posibles métodos de aplicación de los hidrogeles, en colaboración con estudiantes del Proyecto Final de Diseño Industrial de la Facultad de Arquitectura, Diseño y Urbanismo (FADU) de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

Tal como se muestra en la Figura 3.16, se determinó que el método más adecuado para la venta y aplicación de los hidrogeles QP con principios activos, como la lidocaína, consiste en su empaquetamiento en fresco, utilizando hidrogeles prensados junto con una SF adicional para evitar su desecación. Además, se diseñó un material adhesivo integrado que permite fijar el hidrogel a la piel, asegurando una correcta aplicación y funcionalidad.



Figura 3.16. Presentación de la versión comercial del hidrogel a modo de parche para su uso en apósitos, junto con un adhesivo para que quede sujeto en la piel a la hora de su aplicación. Idea desarrollada por las alumnas Estevez y Thames de la UBA.

Por otro lado, las fases de producción y distribución están detalladas en la Figura 3.17.



Figura 3.17. Modelo de producción y logística para los hidrogeles como apósitos. Idea desarrollada por las alumnas Estevez y Thames de la UBA.

La estrategia de venta se enfoca en la característica de biodegradabilidad del material, junto con su alta duración y los beneficios de aplicar un material como este en apósitos.

3.8 Conclusiones del capítulo.

Se lograron formular con éxito todos los hidrogeles a pH 4, 4,5 y 5, variando la concentración polimérica y de NaCl. Los hidrogeles presentaron diferencias en peso y textura, siendo los formulados a pH 4 los que mostraron un mayor hinchamiento y capacidad de deshincharse dependiente del medio. Considerando estas propiedades y sus características macroscópicas, se seleccionaron seis hidrogeles formulados a pH 4 para continuar con los análisis.

La adición de NaCl produjo variaciones en la descomposición térmica y en la morfología observada SEM. En esta etapa, se seleccionaron los hidrogeles formulados a pH 4 con una concentración polimérica de 5 mg/ml y con 0 o 0,15 M de NaCl (QP-0 y QP-0,15, respectivamente) para profundizar en su caracterización.

Los ensayos de hinchamiento demostraron que los hidrogeles se expandieron en solución a pH 4, independientemente de la presencia de NaCl, y se deshincharon en SF a 37 °C. En cambio, a pH 9,2 los hidrogeles se desintegraron. El análisis por FTIR confirmó la presencia de interacciones electrostáticas características de los PECs, mientras que los espectros obtenidos por DRX

evidenciaron la presencia de NaCl a través de picos adicionales específicos, sin alterar la organización cristalina de los polímeros principales.

Desde el punto de vista mecánico, los hidrogeles evaluados presentaron un comportamiento viscoelástico en los ensayos de compresión, sin alcanzar el punto de ruptura, lo que refleja su elevada capacidad de deformación y las características estructurales inherentes al material. Los valores de módulo de compresión obtenidos se encuentran dentro del orden de magnitud reportado para la piel humana (≈ 20 kPa). Cabe destacar que no se detectaron diferencias significativas en los valores de módulo entre los hidrogeles con y sin NaCl, lo que indica que la adición de sal no afecta sustancialmente las propiedades mecánicas en compresión. Sin embargo, los módulos de compresión obtenidos presentan una variabilidad considerable entre réplicas, atribuible a la naturaleza viscoelástica de los hidrogeles y la posible pérdida de agua durante los ensayos.

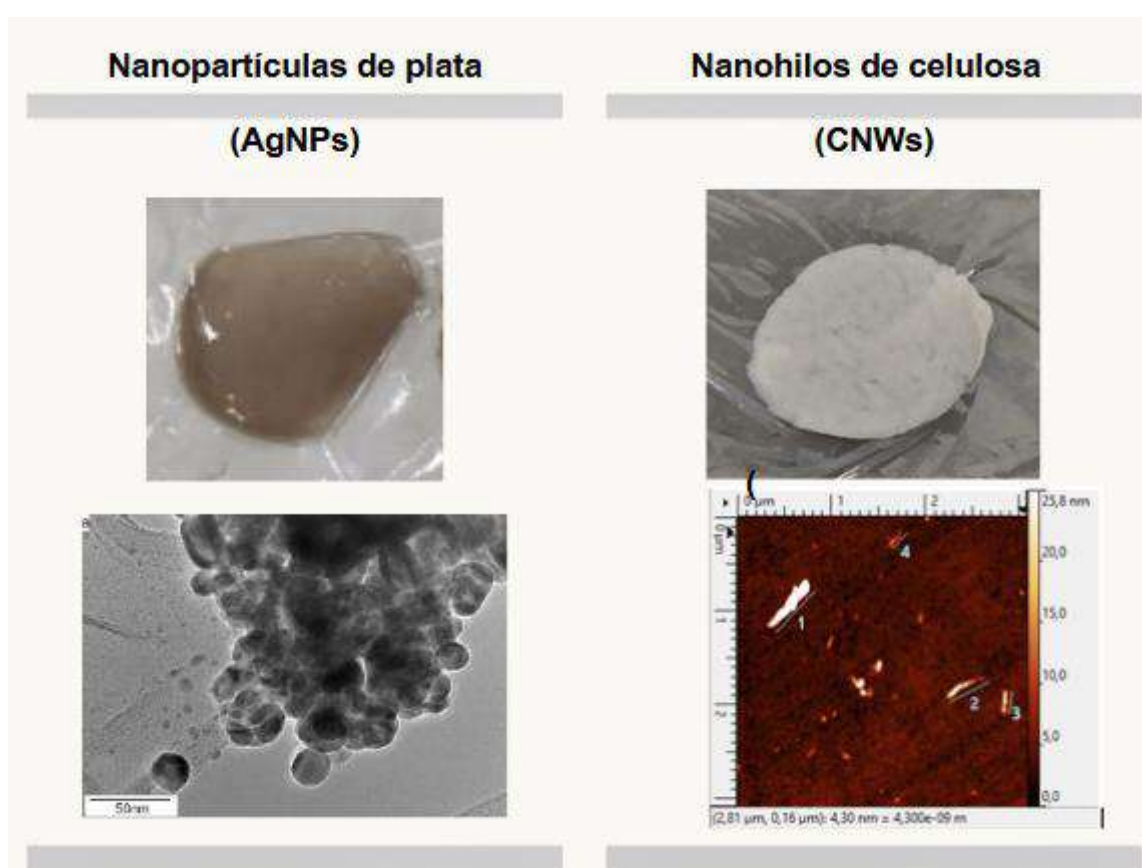
En los ensayos específicos de aplicación, el análisis de GF indicó una mayor interacción entre las soluciones de Q y P en los hidrogeles sin NaCl en comparación con los de QP-0,15. El ensayo de WVTR sugirió que los hidrogeles podrían ser útiles como apósitos para quemaduras de primer grado. Además, se confirmó que los hidrogeles presentaron actividad antibacteriana atribuida al Q.

En cuanto a la viabilidad celular, los hidrogeles con NaCl mostraron una menor viabilidad en comparación con aquellos sin NaCl. Por otro lado, se logró incorporar exitosamente LD en los hidrogeles y obtener una curva de liberación del fármaco. Esto sugiere que estos hidrogeles podrían considerarse como plataformas potenciales para la liberación de fármacos en heridas. Asimismo, la incorporación de LD parece mejorar la citocompatibilidad de los hidrogeles.

Finalmente, en cuanto a su aplicación, se concluyó que la forma más adecuada de empleo consiste en conservar los hidrogeles en fresco, modificando previamente el pH y almacenándolos en agua destilada a temperatura ambiente.

Capítulo 4.

Nanocompuestos de quitosano y pectina.



4.1 Introducción al Capítulo 4.

En el capítulo previo se describieron las estrategias de formulación y caracterización de hidrogeles compuestos por quitosano y pectina (QP). En este capítulo, se emplearon las formulaciones óptimas obtenidas para evaluar la capacidad de incorporación de nanopartículas en los hidrogeles, explorando distintos métodos y proporciones de adición. El objetivo principal consistió en desarrollar materiales compuestos con propiedades específicas mejoradas para su potencial aplicación como apósitos. En este contexto, se decidió funcionalizar los hidrogeles de QP mediante la incorporación de refuerzos, específicamente nanopartículas de plata (AgNPs) y nanohilos de celulosa (CNWs).

Asimismo, se llevaron a cabo ensayos específicos para profundizar en el conocimiento de las propiedades de estos materiales y determinar si la incorporación de nanopartículas genera beneficios significativos que potencien su uso en futuras aplicaciones biomédicas.

4.2 Utilización de nanopartículas de plata.

Las AgNPs se incorporaron en los hidrogeles debido a su reconocida capacidad antimicrobiana, ya que son eficaces frente a bacterias resistentes a múltiples antibióticos e inhiben la formación de biofilms (Pangli et al., 2021). Además, cuando son empleadas en concentraciones adecuadas, presentan buena biocompatibilidad (Murali Mohan et al., 2010).

Se ha reportado que el tamaño de las AgNPs influye significativamente en su actividad antimicrobiana y en su interacción con la matriz polimérica. Un menor tamaño de partícula incrementa el área de contacto y, con ello, la actividad antimicrobiana. Sin embargo, partículas extremadamente pequeñas pueden difundir fuera de la matriz, mientras que un mayor tamaño reduce esta difusión, facilitando su retención (Murali Mohan et al., 2007). Por lo tanto, el tamaño óptimo de las AgNPs dependerá del objetivo específico de la aplicación.

En cuanto a la citotoxicidad, se ha documentado que nanopartículas con tamaños inferiores a 100 nm pueden generar una mayor toxicidad celular (Kim et al., 2012; Miethling-Graff et al., 2014). Sin embargo, también se ha observado que las nanopartículas de menor tamaño tienden a formar agregados, lo que podría afectar sus propiedades funcionales. Por este motivo, resulta esencial caracterizar el tamaño de las nanopartículas incorporadas. Idealmente, su tamaño debería ser inferior a 100 nm para maximizar la actividad antimicrobiana, pero se debe considerar su tendencia a formar

agregados y la necesidad de determinar concentraciones adecuadas que no afecten significativamente la viabilidad celular en el tejido de la herida (Ambrožová et al., 2017; Pang et al., 2020).

La incorporación de AgNPs en los hidrogeles de QP se justificó principalmente por el efecto sinérgico conocido entre el Q y las nanopartículas, lo que refuerza la actividad antibacteriana (Nešović and Mišković-Stanković, 2020). Aunque en el Capítulo 3, sección 3.5.5, ya se abordó la actividad antibacteriana de los hidrogeles QP, se espera que la adición de AgNPs incremente significativamente este efecto, optimizando el desempeño del material como apósito.

4.2.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas.

Tal como se indicó en el apartado de Materiales y Métodos (Capítulo 2, sección 2.4.1), las AgNPs utilizadas fueron proporcionadas por el grupo del INBIOTEC. Estas partículas fueron sintetizadas a partir del hongo *Trichoderma harzianum* y presentaron un radio hidrodinámico promedio de $266,3 \pm 91,3$ nm, determinado mediante dispersión de luz dinámica, mostrando un perfil monodisperso. La cristalinidad de las nanopartículas fue confirmada mediante DRX. Asimismo, las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) revelaron partículas esféricas con un diámetro promedio de 19 ± 6 nm (Figura 4.1a).

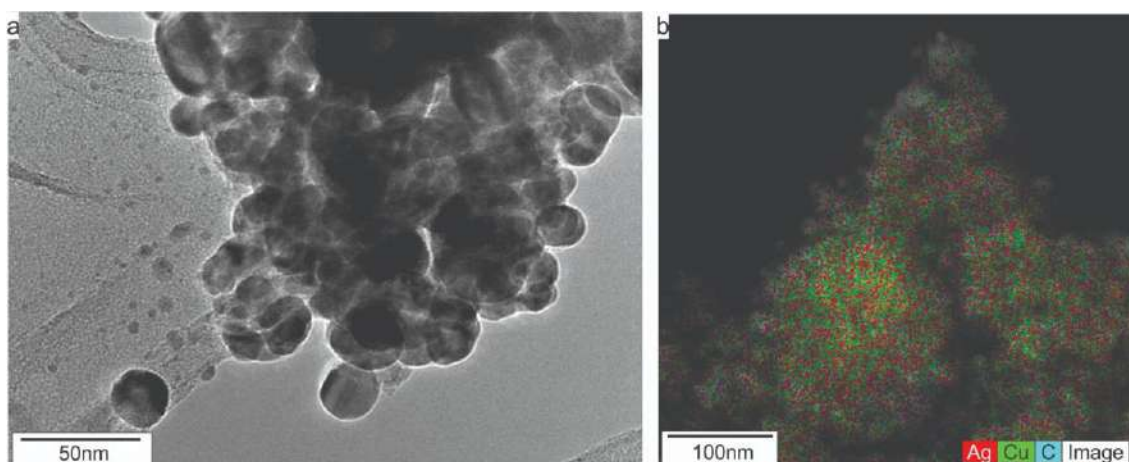


Figura 4.1. Caracterización de las AgNPs mediante TEM (a) y análisis de espectroscopía dispersiva de rayos X (EDS) (b).

El análisis de composición atómica, llevado a cabo por espectroscopía dispersiva de rayos X (EDS), indicó que más del 11% de la composición corresponde a plata (Ag), mientras que más del 75% se atribuye al cobre (Cu), debido al material de la grilla utilizada en las mediciones (Figura 4.1b). En

cuanto a las propiedades térmicas, se observó una degradación del 8% entre 300 y 400 °C, asociada a la descomposición de compuestos bioorgánicos presentes en la matriz de las nanopartículas (Ferrante et al., 2025; Consolo et al., 2020).

4.2.2 Incorporación de las nanopartículas de plata en los hidrogeles QP.

Los hidrogeles compuestos, obtenidos tras la incorporación de AgNPs en la matriz polimérica de QP, presentaron una coloración homogénea que variaba entre gris y negro, dependiendo del tipo de hidrogel (Figura 4.2).

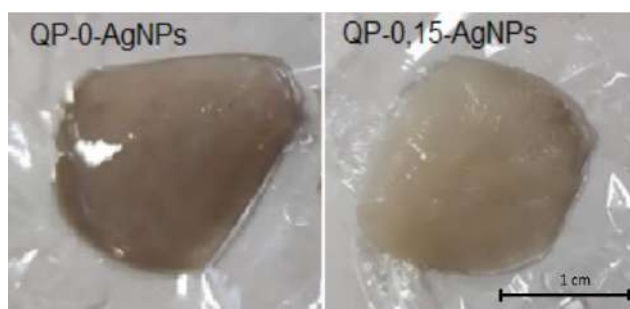


Figura 4.2. Ejemplo de hidrogeles de QP con 1% AgNPs, con o sin 0,15 M NaCl.

La uniformidad en la coloración sugiere una adecuada compatibilidad entre los materiales. Las AgNPs fueron incorporadas de manera homogénea en ambas soluciones precursoras con los polímeros, garantizando una distribución uniforme dentro de la matriz hidrogel gracias a la agitación constante durante el proceso de mezclado y la formación de los PECs. No se detectaron cambios significativos en la textura ni en el tamaño de los hidrogeles compuestos respecto a los hidrogeles sin nanopartículas.

La presencia de NaCl en las formulaciones tuvo un impacto visual en la coloración de los hidrogeles, ya que aquellos que contenían 0,15 M de NaCl y AgNPs exhibieron un tono más claro en comparación con los hidrogeles que únicamente incorporaban AgNPs.

La capacidad de los hidrogeles QP para retener las AgNPs fue evaluada mediante ensayos de hinchamiento y análisis espectroscópico. Los hidrogeles compuestos con 1% p/p de AgNPs fueron prensados, cortados en discos de 4 mm de diámetro y sumergidos en agua grado HPLC. Tras una hora de inmersión, se registró un porcentaje de hinchamiento de $52,4 \pm 6,6\%$. Posteriormente, el agua

remanente fue analizada mediante espectroscopía UV-Visible en el rango de 200 a 600 nm, utilizando como referencia la solución de hinchamiento de un hidrogel sin nanopartículas.

No se detectaron picos característicos de las AgNPs en el espectro UV-Vis, particularmente en la región de 418 nm, donde las nanopartículas generan un plasmón de resonancia. El mismo resultado se obtuvo tras extender el tiempo de hinchamiento a 24 horas, tanto a temperatura ambiente como a 37 °C. Estos resultados indican que las nanopartículas de plata permanecen retenidas en la matriz polimérica y no se liberan al medio líquido en las condiciones evaluadas.

Se realizó TGA con el objetivo de determinar si las propiedades térmicas del hidrogel se modificaron debido a la adición de AgNPs. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.3.

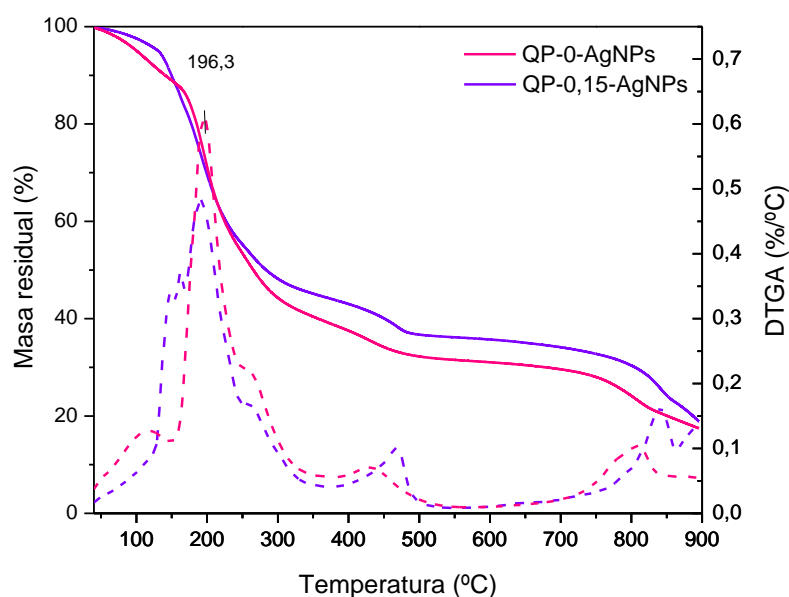


Figura 4.3. Resultado de TGA de los hidrogeles compuestos con AgNPs, con las curvas de masa residual (líneas sólidas) y de la DTGA (líneas discontinuas) en función de la temperatura.

Las temperaturas de degradación de los hidrogeles disminuyeron con la incorporación de las nanopartículas. En el caso de QP-0-AgNPs, la temperatura de degradación fue de 196,3 °C, en comparación con 205,5 °C en ausencia de nanopartículas. Por su parte, para QP-0,15-AgNPs, se registró una temperatura de degradación de 191,9 °C, frente a 193,6 °C en los hidrogeles sin partículas. Estos resultados evidenciaron una reducción de 9,2 °C en QP-0 y de 1,7 °C en QP-0,15. La disminución de la T_{max} obtenida en los hidrogeles con incorporación de AgNPs demuestra la existencia de

interacciones entre las nanopartículas y la red polimérica. Estas interacciones afectan la estabilidad térmica de la matriz, lo que sugiere modificaciones en la organización estructural del hidrogel.

En relación con el patrón de pérdida de masa en función de la temperatura, se observó que la T_{max} permaneció dentro del rango registrado para los hidrogeles sin nanopartículas. Sin embargo, se identificó un pico adicional entre los 400 y 500 °C, similar a lo descrito en el Capítulo 3 (sección 3.3.4). Posteriormente, se realizaron ensayos adicionales orientados a evaluar la futura aplicación del material.

4.2.3 Evaluación antibacteriana de los nanocompuestos.

El ensayo antibacteriano se llevó a cabo utilizando hidrogeles con una concentración de AgNPs del 1 % p/p. No se evidenciaron diferencias significativas en los resultados iniciales, por lo que se evaluaron hidrogeles con una concentración mayor, del 3 % p/p de partículas respecto a la masa de polímeros. Los resultados obtenidos para los halos de inhibición con esta concentración se presentan en la Figura 4.4.

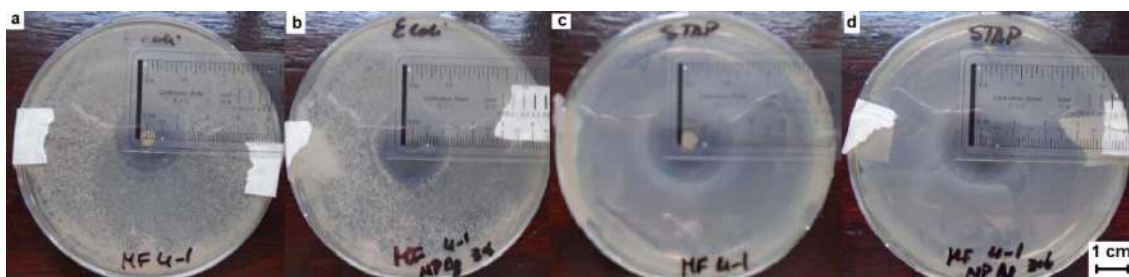


Figura 4.4. Comparación entre los halos de inhibición obtenidos contra *E. coli* (a y b) y *S. aureus* (c y d) para los hidrogeles QP sin NPs (a y c) o con AgNPs (b y d).

De acuerdo con la bibliografía, las concentraciones de AgNPs utilizadas para evitar citotoxicidad celular varían entre 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este rango es dependiente no solo de la concentración, sino también del tamaño de las nanopartículas (Pangli et al., 2021). En el caso de los hidrogeles evaluados, una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivale aproximadamente al 1 % p/p de AgNPs. Cabe destacar que los efectos antimicrobianos de las nanopartículas, al igual que sucede con los antibióticos u otros compuestos, dependen de las condiciones de síntesis del hidrogel y de las características de la matriz polimérica. Las nanopartículas pueden quedar atrapadas en los poros del hidrogel o

reaccionar químicamente con los grupos funcionales de los polímeros, lo que afecta su actividad antimicrobiana (Murali Mohan et al., 2010).

En función de estos antecedentes, se procedió a evaluar la actividad antibacteriana de los hidrogeles formulados con un 3 % p/p de AgNPs. Los resultados de los diámetros de los halos de inhibición se consignan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Medida de los halos y pseudohalos de inhibición (mm) en hidrogeles QP-0 con y sin AgNPs.

	Sin nanopartículas	AgNPs 3%
<i>E. coli</i>	8 y 10 mm	10 y 12 mm
<i>S. aureus</i>	7 y 15 mm	10 y 15 mm

Sorprendentemente, no se observó una diferencia significativa entre los geles sin AgNPs y aquellos que incorporaron estas nanopartículas. En este caso, se atribuye la mayor actividad antimicrobiana a los polímeros Q y P, en lugar de a las nanopartículas de plata. Considerando que las demás propiedades analizadas de los hidrogeles con AgNPs no mostraron mejoras sustanciales, se concluyó que su adición no resulta beneficiosa para este tipo de materiales. Por este motivo, se descartó continuar con el desarrollo de hidrogeles compuestos con AgNPs.

4.3 Refuerzos de nanohilos de celulosa.

El principal objetivo de la incorporación de CNWs fue mejorar propiedades específicas de los hidrogeles relacionadas con su potencial aplicación como apósitos para heridas, particularmente las propiedades mecánicas (Gonzalez et al., 2014). Las mejoras en este aspecto son relevantes debido a que una de las principales limitaciones de los hidrogeles radica en su baja resistencia mecánica (Haq et al., 2017). En la literatura, existe una cantidad limitada de estudios que analicen las propiedades mecánicas de materiales blandos como los hidrogeles, especialmente en aquellos basados PECs. Por ejemplo, da Costa et al. (da Costa et al., 2016) evaluaron propiedades de compresión en hidrogeles reforzados con arcilla, mientras que otros autores realizaron ensayos de tracción en sistemas que combinan Q y P (Martins et al., 2018b; Quadrado and Fajardo, 2022). Sin embargo, hasta la fecha no se encontraron estudios que analicen las propiedades mecánicas de CoPECs con incorporación de

CNWs y/o NaCl. Asimismo, los ensayos de nanoindentación y las evaluaciones reológicas de sistemas basados en Q y P son escasos.

En este contexto, se optó por sintetizar CNWs mediante un método ecoamigable, incorporarlos a los hidrogeles utilizando diferentes rutas de síntesis, identificar el método más eficiente, determinar el porcentaje óptimo de CNWs a adicionar y caracterizar los materiales obtenidos.

En primera instancia, se sintetizaron los CNWs siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 2, sección 2.4.2, y se llevaron a cabo ensayos de caracterización de los nanohilos obtenidos. Posteriormente, se prepararon los hidrogeles compuestos, se optimizó la ruta de incorporación y el porcentaje de CNWs, y se realizaron ensayos mecánicos y de caracterización para evaluar si cumplían con los objetivos propuestos.

4.3.1 Ensayos de caracterización de los nanohilos.

4.3.1.1 Determinación del tamaño de los nanohilos de celulosa.

Las propiedades mecánicas que los CNWs pueden aportar a los hidrogeles están directamente relacionadas con sus dimensiones. Estas dimensiones dependen tanto de la fuente inicial de celulosa como de las condiciones de procesamiento, como tiempo, temperatura y tratamiento ultrasónico (Eichhorn, 2011). Para determinar el tamaño de los CNWs, se realizaron ensayos de SEM.

En las imágenes obtenidas mediante SEM (Figura 4.5a), se observaron agregados de nanocelulosa, los cuales presentaron un tamaño aproximado de $7,2 \pm 2,2 \mu\text{m}$ de largo por $1,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$ de ancho. Estas medidas se obtuvieron a partir del análisis de 16 imágenes cuyas dimensiones fueron procesadas utilizando el software ImageJ.

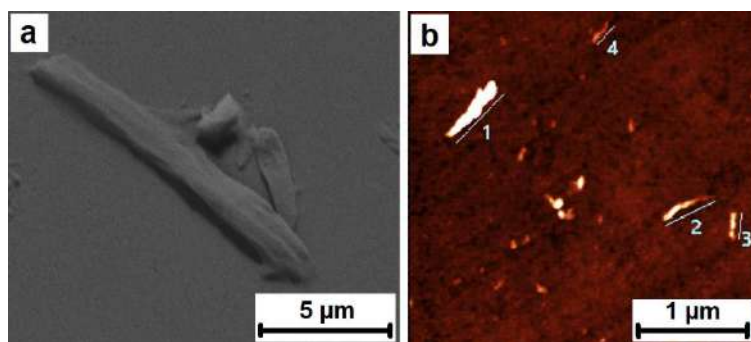


Figura 4.5. Micrografía de SEM de un agregado de CNWs (a) y resultado de AFM mostrando la longitud de los CNWs (b).

La formación de estos aglomerados puede estar asociada al procedimiento de preparación de la muestra para la visualización en SEM, en el cual, durante el proceso de secado, los nanohilos pueden haber experimentado una aglomeración (Borsoi et al., 2016). Dado que este método no permitió una observación precisa de los tamaños individuales de los nanohilos, se recurrió a la técnica de AFM.

El ensayo realizado mediante AFM, cuyos resultados se presentan en la Figura 4.5b, permitió observar tanto hilos individuales como algunos aglomerados. Las dimensiones promedio de los CNWs, obtenidas a partir de cuatro nanohilos representativos mostrados en la Figura 4.5b, fueron de $367,5 \pm 182,8$ nm de largo y $20,3 \pm 7,3$ nm de ancho. En la literatura, se reporta que las dimensiones típicas de los CNWs varían entre 5-10 nm de ancho y 100-300 nm de largo (Dash et al., 2013). Además, se confirmó que la morfología de los CNWs corresponde a la de nanohilos.

4.3.1.2 Evaluación físico-química de los nanohilos.

La Figura 4.6 muestra el espectro de FTIR de los CNWs.

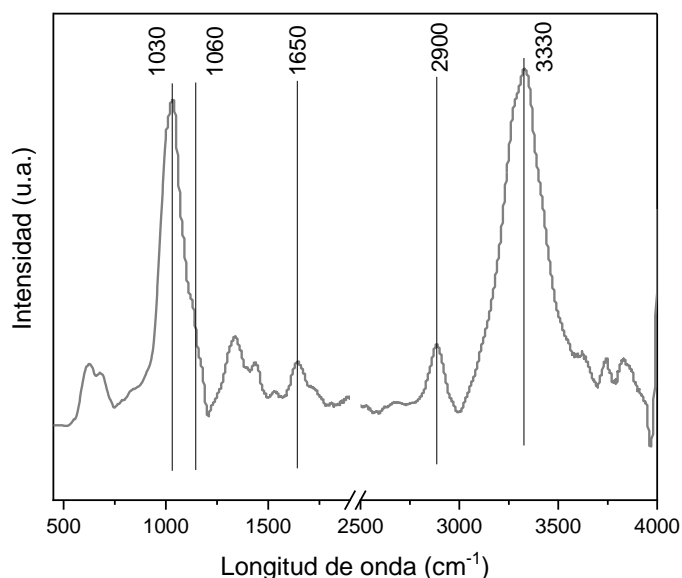


Figura 4.6. Espectro de FTIR para los CNWs, con la longitud de onda de los grupos funcionales destacada.

En la Figura 4.6 se observan los picos característicos de los CNWs. La señal a 3330 cm^{-1} indica la presencia de grupos -OH , lo que sugiere interacciones por puente de hidrógeno en la estructura de los nanohilos (Ehman, 2019). Los picos a 1650 cm^{-1} corresponden a grupos -OH provenientes de moléculas de agua atrapadas en la estructura, las cuales no pudieron ser eliminadas completamente durante la preparación de la muestra (Zain, 2014). En la región de $1030\text{-}1050$ y 1160 cm^{-1} se encuentran los picos asociados con enlaces $\beta\text{-}1,4\text{-glucosídicos}$ (C-O) y grupos C-O-C, respectivamente, lo cual confirma la estructura y conectividad de la celulosa (Huang et al., 2017; Mat Zain, 2014). Además, la señal a 2900 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-H proveniente de los anillos de glucosa (Dai et al., 2018).

En el espectro de DRX de los CNWs y MCC, obtenido en la Figura 4.7, se observan picos similares, aunque con intensidades diferentes. Los picos aparecen a los ángulos $2\theta = 16^\circ, 22,6^\circ$ y $34,5^\circ$, correspondientes a los planos (110), (200) y (004) de la celulosa-I (Bajpai et al., 2013; Rashid and Dutta, 2020).

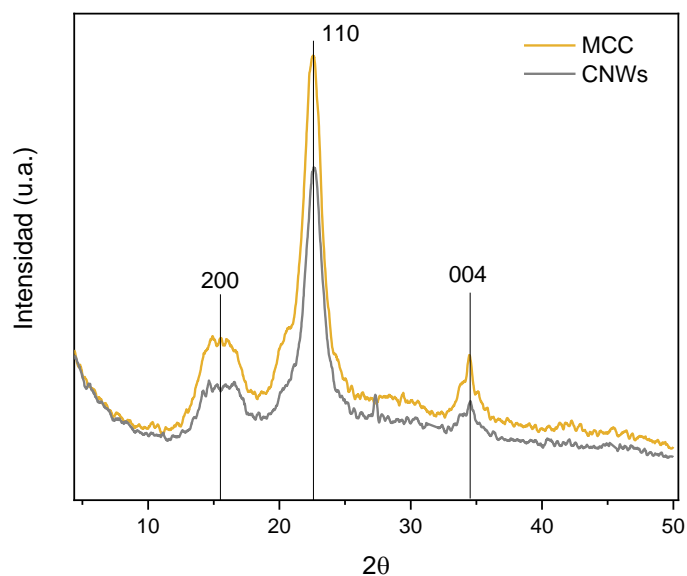


Figura 4.7. Espectro obtenido del ensayo de DRX realizado en muestras de CNWs y MCC.

4.3.2 Métodos de incorporación de los nanohilos a los hidrogeles.

Una vez caracterizados los CNWs, se procedió a su incorporación a los hidrogeles mediante dos métodos diferentes, descritos en la sección 2.4.2 del Capítulo 2. Los métodos considerados fueron: la incorporación de los CNWs antes de la formación de la red polimérica, y la incorporación posterior mediante el hinchamiento del hidrogel ya formado en una solución que contenía CNWs.

Para determinar la opción más conveniente de incorporación, se realizó un ensayo de potencial zeta. Los resultados, presentados en la Figura 4.8, muestran que la adición de CNWs a las soluciones de polímeros incrementa el valor absoluto del potencial zeta, haciéndolo más negativo para la solución de P y más positivo para la de Q, independientemente de la presencia de NaCl. Este comportamiento respalda la estrategia de incorporar los nanohilos tanto en la solución de P como en la de Q al momento de formar los hidrogeles compuestos.

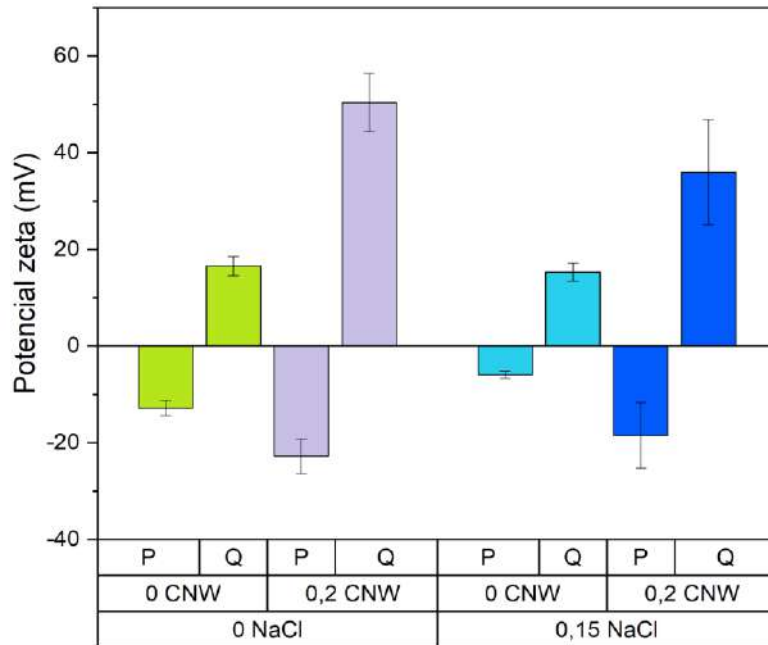


Figura 4.8. Valores de potencial Zeta de soluciones de Q o P con o sin NaCl 0,15 M y CNWs. Las soluciones son las mismas que se usaron para fabricar hidrogeles con CNWs al 4 %.

El potencial zeta de los CNWs, medido a pH 4, fue de $-28,08 \pm 4,06$ mV, lo que representa una medida indirecta de la carga superficial de las partículas en la dispersión. Los valores negativos de potencial zeta de las estructuras de nanocelulosa observados en este estudio son consistentes con los reportados en la literatura (Araki and Urata, 2020; Chowdhury et al., 2019; Nascimento et al., 2014). Esta carga negativa se atribuye principalmente a la mayor repulsión electrostática generada por los grupos -OH presentes en la estructura de los CNWs (Chowdhury et al., 2019).

Además, un aumento en la concentración de iones en la solución disminuye la repulsión electrostática entre las partículas, favoreciendo su agrupación o aproximación, lo que reduce su tamaño efectivo. En la solución de Q con CNWs, el potencial zeta positivo observado es superior al de la solución de Q sola. Este fenómeno puede explicarse por el efecto de una "corona hidrofílica" o por una redistribución de las cargas en la superficie, en la cual el polímero Q forma una "capa" o corona hidrofílica alrededor de los CNWs. Este fenómeno enmascara las cargas negativas de los CNWs y provoca que la corona de Q sobresalga hacia la interfaz, resultando en una mayor carga positiva en la región externa del sistema (Schatz et al., 2004; Volod'ko et al., 2018).

Por otro lado, en la solución de P con CNWs, el aumento del valor negativo del potencial zeta puede atribuirse a una mayor repulsión electrostática entre las partículas de CNWs y la P, ambas

cargadas negativamente. Este aumento favorece la estabilidad de la dispersión y mantiene la homogeneidad de las soluciones. Un mayor número de partículas o una mayor concentración de partículas cargadas en la solución incrementa la repulsión electrostática entre ellas, lo que a su vez eleva el valor absoluto del potencial zeta. Este efecto favorece la dispersión de las partículas, previniendo su agregación (Kulkarni et al., 2016).

Finalmente, para confirmar que los CNWs fueron efectivamente incorporados a los hidrogeles mediante ambos métodos, se realizaron una serie de ensayos adicionales.

4.3.2.1 Estabilidad térmica con la adición de los nanohilos.

Como se observa en la Tabla 4.2, la T_{max} fue mayor para los hidrogeles con CNWs en comparación con aquellos sin los nanohilos, independientemente del método de incorporación de los CNWs. Este fenómeno puede atribuirse a un incremento en la estabilidad térmica, causado por la estructura cristalina de los CNWs (Hebeish et al., 2014). En todos los sistemas evaluados, se registraron diferencias de al menos 10 °C en la temperatura de degradación, tanto en el método de incorporación a) como en el b). Además, se observó que los CNWs parecen favorecer el entrecruzamiento, ya que los hidrogeles compuestos presentan valores de T_{max} similares o mayores cuando se incorpora NaCl, en comparación con los sistemas sin NaCl. En contraste, en ausencia de CNWs, la adición de NaCl disminuye el valor de T_{max} , debido a su efecto dopante y/o interdifusión, como se había analizado en el Capítulo 3.

Tabla 4.2. Temperatura de degradación de hidrogeles sintetizados a pH 4 sin NaCl (QP-0) o con NaCl 0,15 M (QP-0,15) con CNWs añadido mediante hinchamiento (a) o adición a soluciones de polímero (b) al 4, 10, 20 o 30 % CNWs.

	T_{max} método a (°C)	T_{max} método b (°C)				T_{max} Sin CNWs (°C)
		4% CNWs	10% CNWs	20% CNWs	30% CNWs	
QP-0-5	220,5	221,0	217,0	214,0	224,0	205,5
QP-0,15-5	216,4	228,9	219,7	217,1	219,0	193,6

Al comparar los diferentes porcentajes de CNWs en los hidrogeles compuestos, se observó que las mayores T_{max} se registraron en los sistemas QP-0-30%CNWs y QP-0-4%CNWs. En los geles que contienen sal, la T_{max} más alta se observó con un 4% de CNWs.

4.3.2.2 Análisis morfológico: Espesor de pared y distribución de poros en hidrogeles nanocompuestos.

Las imágenes obtenidas por SEM revelaron estructuras porosas de forma irregular en todos los geles, aunque los nanohilos no fueron distinguibles con esta técnica. A partir de 30 imágenes SEM, se determinaron los tamaños de las paredes de los poros y los resultados se resumen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Resultados de espesor de la pared de los poros en los hidrogeles con o sin nanocelulosa incorporada por distintos métodos.

	Espesor de la pared de poro (μm)	
	QP-0	QP-0,15
Sin CNWs	$2,2 \pm 1,1$	$4,7 \pm 1,2$
Método a	$0,8 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,9$
Método b (4% CNWs)	$10,0 \pm 2,2$	$7,4 \pm 0,8$

El espesor de la pared en los hidrogeles aumentó con la incorporación de CNWs a la solución de polímeros, siendo este valor más alto en QP-0. Además, en los hidrogeles hinchados con CNWs, el espesor de la pared fue mayor en QP-0,15. Este aumento podría explicarse por la disminución de la masa del hidrogel durante la prueba de hinchamiento, tanto en los sistemas con NaCl como en los sin NaCl ($-3,6\% \pm 0,12\%$ en QP-0 y $-9,3\% \pm 1,01\%$ en QP-0,15), lo que sugiere una pérdida de polímeros que resultó en paredes más delgadas.

Para investigar si la adición de mayores porcentajes de CNWs tenía un impacto visual en los hidrogeles sin NaCl, se realizó un ensayo adicional. Se optó por utilizar los hidrogeles sin NaCl, ya que la sal modifica la porosidad (como se discutió en el Capítulo 3, sección 3.3.3) y, en este caso, se deseaba evaluar exclusivamente el efecto de los diferentes porcentajes de CNWs. Las micrografías correspondientes a este ensayo se muestran en la Figura 4.9.

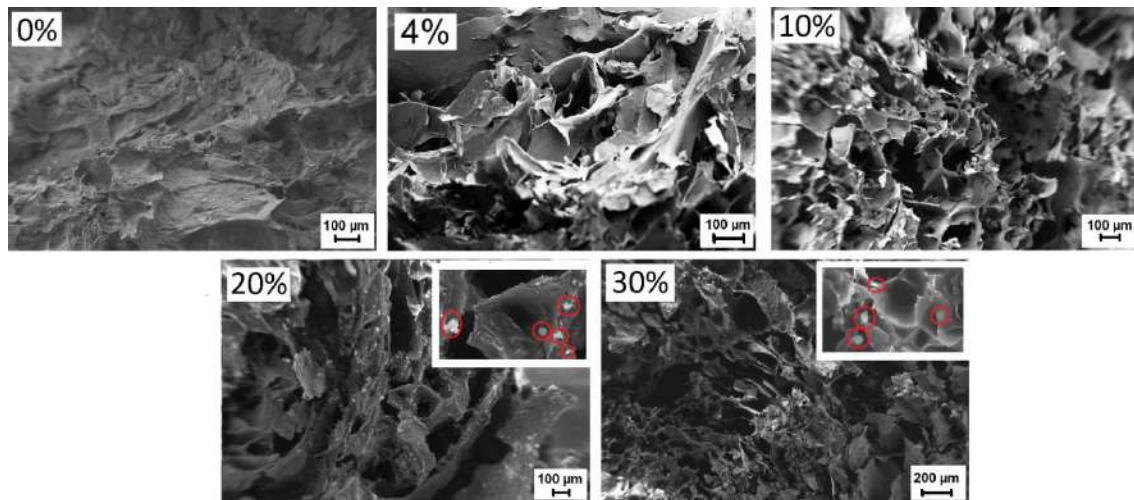


Figura 4.9. Micrografías de SEM de hidrogeles sin NaCl con 0%, 4%, 10%, 20% y 30% CNWs. Los agregados de CNWs están marcados con círculos rojos.

Se observó un aumento en la cantidad de poros a medida que se incrementaba el contenido de CNWs, especialmente a un 30% de CNWs, donde se evidenció una mayor cantidad de poros pequeños. La porosidad en los hidrogeles está influenciada por varios factores, como un aumento en la presión osmótica local, la densidad del entrecruzamiento, el pH y las cargas de las cadenas de polímeros. Además, en los geles con un 20% y 30% de CNWs se observaron agregados de CNWs, los cuales no fueron visibles en los sistemas con 4% y 10% de CNWs. Este resultado sugiere que las dispersiones de CNWs al 4% y 10% (p/p) eran más homogéneas.

4.3.2.3 Evidencia espectroscópica de la incorporación de CNWs en hidrogeles.

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Figura 4.10, con los espectros correspondientes a los hidrogeles con y sin CNWs, comparados con el espectro de los CNWs aislados.

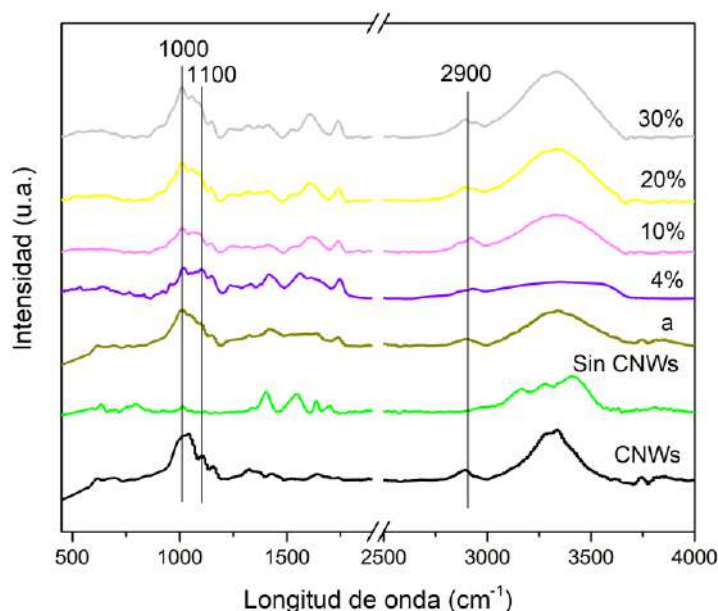


Figura 4.10. Espectros de FTIR de los CNWs, el hidrogel QP-0 sin CNWs y los hidrogeles con CNWs adicionados por hinchamiento (a) o por incorporación a la solución madre (b) en distintos porcentajes (4, 10, 20 y 30%).

Como se mencionó previamente en la sección 4.3.1.2 para el espectro de los CNWs, los hidrogeles con CNWs incorporados por ambos métodos presentaron un pico característico de los enlaces -CH a 2900 cm^{-1} . Además, se observa una banda ancha en el rango de $3000\text{ a }3700\text{ cm}^{-1}$, atribuida a los grupos -OH, presente en todos los hidrogeles. Sin embargo, en los hidrogeles sin CNWs, se aprecian tres picos diferenciados dentro de esta región, lo que sugiere una variación en los patrones de enlace de hidrógeno, tal como se discutió en la sección 3.5.2.

Asimismo, se observó un pico ancho en el rango de $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a -CO y -COC (Spagnol et al., 2012), que está presente en los hidrogeles con CNWs, pero ausente en los hidrogeles sin CNWs. Este pico es un indicativo claro de la presencia de CNWs en la estructura del hidrogel. Con base en estos resultados, se concluye que la incorporación de CNWs fue exitosa utilizando ambos métodos a) y b). Resultados similares fueron obtenidos para los hidrogeles que contenían NaCl en su composición.

4.3.3 Conclusiones preliminares sobre la integración de CNWs.

4.3.3.1 Método a o b.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que la incorporación de CNWs en los hidrogeles es factible mediante ambos métodos evaluados. No obstante, los efectos de su integración fueron más evidentes cuando los CNWs se incorporaron directamente a las soluciones de polímeros. Además, este método redujo el tiempo de procesamiento, minimizó la cantidad de pasos requeridos y permitió un control preciso sobre la concentración de CNWs en la formulación. Por lo tanto, se decidió continuar el estudio con los hidrogeles obtenidos mediante la adición de CNWs a las soluciones madre (método b).

4.3.4 Optimización del contenido de CNWs en hidrogeles para apósitos.

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de CNWs para la aplicación de los hidrogeles como apósitos para heridas, se llevaron a cabo ensayos comparativos adicionales.

4.2.4.1 Evaluación del comportamiento de hinchamiento en condiciones simuladas.

El comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles se analizó mediante su exposición a una SF a 37 °C, con el fin de simular las condiciones biológicas en las que se emplearían. Los resultados de este ensayo se presentan en la Figura 4.11.

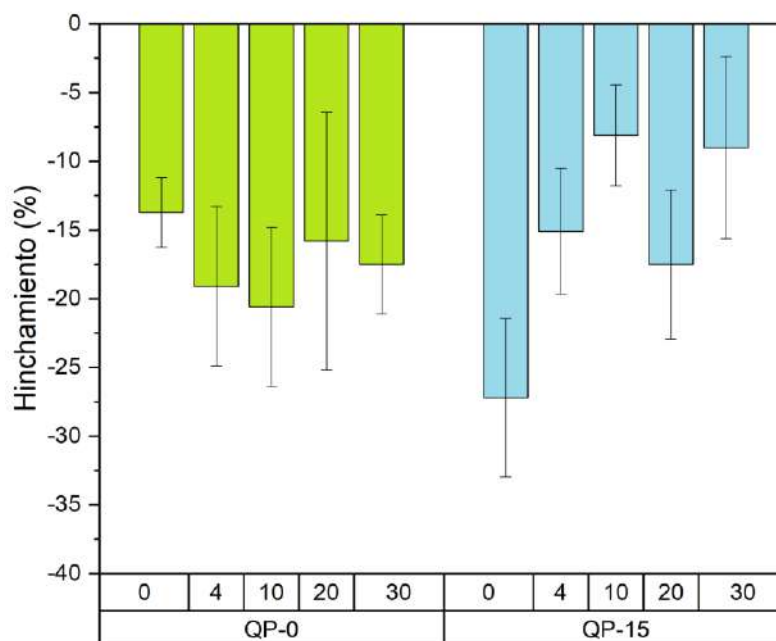


Figura 4.11. Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles QP con CNWs 0, 4, 10, 20 y 30%, formulados sin NaCl (barras verdes) o con NaCl (barras celestes).

Los hidrogeles con mayores grados de entrecruzamiento presentan un menor hinchamiento, ya que su red tridimensional restringe la entrada de agua (Xue et al., 2001). En el presente estudio, se observó que, una vez alcanzado el equilibrio, todos los hidrogeles se habían deshinchado, cuya magnitud varió en función del porcentaje de CNWs y la presencia de NaCl en la composición.

Los hidrogeles que mostraron un mayor grado de deshinchamiento probablemente poseen redes poliméricas más débiles en comparación con aquellos que mantuvieron valores más cercanos al 0%. Este comportamiento es consistente con el efecto de los iones Na^+ y Cl^- en las cadenas poliméricas, los cuales inducen una estructura menos estable (Rodrigues et al., 2016). Asimismo, dicho fenómeno se asocia con la concentración de sal en el medio de ensayo (idéntica para todas las muestras) y con la presión osmótica generada, que favorece la salida de agua, reduciendo así el peso de los hidrogeles (Hariri and Schlenoff, 2010).

En particular, los hidrogeles con NaCl en su formulación y con 0% o 10% de CNWs exhibieron un deshinchamiento significativamente mayor en comparación con aquellos que no contenían NaCl. Específicamente, los hidrogeles sin NaCl ni CNWs presentaron un deshinchamiento del -14%, mientras que en presencia de NaCl, este valor alcanzó el -27%.

Los hidrogeles con NaCl en su composición y 0% CNWs se deshincharon significativamente más en comparación con los hidrogeles sin NaCl. Los hidrogeles sin NaCl ni CNWs mostraron una

contracción del $13,7 \pm 2,5$ %, mientras que con NaCl este valor aumentó a $27,2 \pm 5,7$ %. También se observó una diferencia significativa en los hidrogeles con 10% CNWs, donde aquellos sin NaCl se deshincharon un $20,6 \pm 5,7$ %, mientras que los hidrogeles con NaCl solo lo hicieron en un $8,1 \pm 3,7$ %. Estos resultados sugieren que la adición de 10% CNWs podría mejorar la estabilidad de la red polimérica, posiblemente al reducir la disrupción estructural causada por la presencia de NaCl.

Por otro lado, en los hidrogeles sin NaCl, no se registraron variaciones significativas en función del contenido de CNWs. Si bien los valores promedio obtenidos difieren, la magnitud de los errores experimentales impide afirmar que la concentración de CNWs modifique el hinchamiento en estas condiciones. No obstante, en los hidrogeles con NaCl, el efecto de los CNWs fue más evidente, ya que el hidrogel sin CNWs se deshinchó en mayor medida que aquellos con 4%, 10% y 30% de CNWs. Además, los hidrogeles con 10% y 30% de CNWs fueron los que mantuvieron valores de deshinchamiento más cercanos a 0%.

Una posible explicación de estos resultados es que los CNWs podrían alterar la red polimérica del hidrogel mediante interacciones con los polímeros, de manera similar a como lo hace el NaCl, reduciendo el entrecruzamiento estructural. Sin embargo, en los hidrogeles con NaCl, los resultados sugieren que los CNWs pueden mejorar la estabilidad de la red polimérica al mitigar las interacciones entre los iones Na^+/Cl^- y los polímeros. Esta estabilización podría estar asociada con la capacidad de la nanocelulosa para establecer interacciones electrostáticas con polímeros de carga positiva, como el Q (Li et al., 2015), así como con la formación de enlaces de hidrógeno, los cuales son más fuertes y específicos que las interacciones entre los iones del NaCl y las cadenas poliméricas (Bertrand, 1997; De Mesquita et al., 2010).

En síntesis, todos los hidrogeles analizados experimentaron deshinchamiento al alcanzar el equilibrio. No obstante, los hidrogeles con NaCl presentaron una red polimérica menos entrecruzada y, en consecuencia, un mayor grado de deshinchamiento. La incorporación de CNWs mostró un efecto más significativo en estos sistemas, probablemente debido a su capacidad de potenciar el entrecruzamiento estructural.

Desde el punto de vista de la aplicabilidad de estos materiales como apósitos para heridas, la evaluación del hinchamiento proporciona una aproximación sobre su comportamiento frente a heridas con exudado abundante, permitiendo determinar si el material absorberá líquidos o, por el contrario, liberará su contenido acuoso en el sitio de aplicación. En aquellos casos en los que el hidrogel no

experimente cambios significativos en su hinchamiento, se podría considerar su uso para mantener la zona afectada hidratada, lo que sería más beneficioso en heridas con baja exudación. Por otro lado, en materiales diseñados para la liberación de principios activos o fármacos, el deshinchamiento del hidrogel podría facilitar el proceso de difusión del agente terapéutico. En función de estos resultados, se propone evaluar la aplicación de los hidrogeles estudiados en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, tanto en presencia como en ausencia de CNWs.

4.3.4.1 Formación y evaluación de films a partir de hidrogeles secos.

Los hidrogeles con 10, 20 y 30% de CNWs, con y sin NaCl, fueron sometidos a secado bajo campana durante 48 h. Como resultado, se observó una coloración y textura homogénea en los films con 10% de CNWs (Figura 4.12), mientras que en aquellos con 20 y 30% de CNWs se evidenció la presencia de un exudado en la superficie. Este fenómeno resulta consistente con los análisis previos de SEM, en los cuales se identificaron agregados de CNWs en los hidrogeles con 20% y 30% de carga (sección 4.3.2.2.).

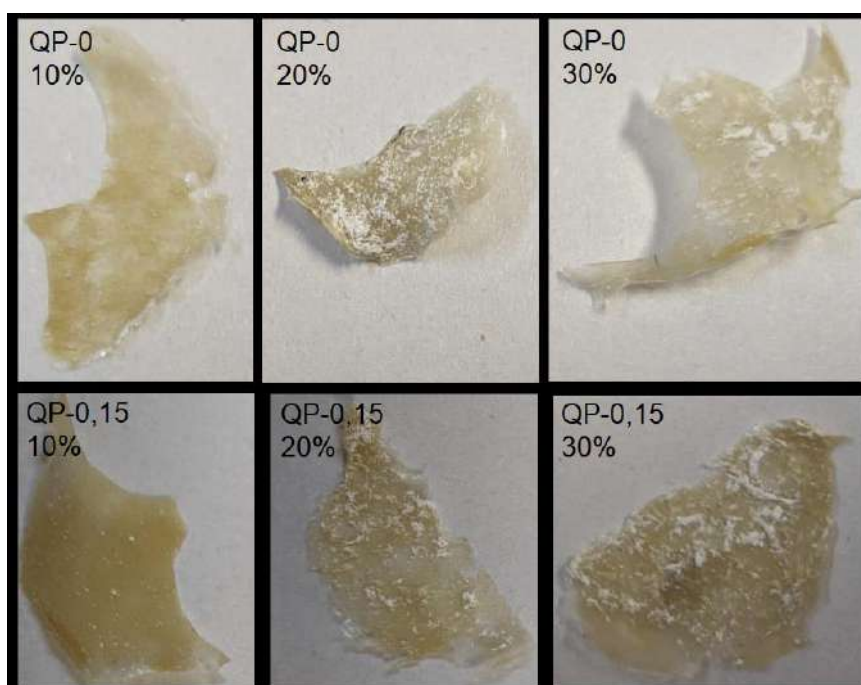


Figura 4.12. Fotografías de los hidrogeles secos con o sin NaCl y con distintos porcentajes de CNWs.

Este ensayo, junto con los anteriores, permitió determinar que los sistemas con 10% de CNWs presentan mejores características para la aplicación propuesta. No obstante, es importante señalar

que, en su uso como apósitos para heridas, los hidrogeles permanecerán hidratados. Hasta el momento, los hidrogeles con 10% de CNWs, tanto en presencia como en ausencia de NaCl, han demostrado ser los más adecuados. Con el fin de evaluar su desempeño estructural, se realizaron ensayos mecánicos para determinar posibles diferencias en las propiedades mecánicas en comparación con la matriz sin CNWs. Los resultados de dichos ensayos se presentan en la siguiente sección.

4.3.4.2 Influencia de CNWs y NaCl en las propiedades estructurales de los hidrogeles.

La GF está directamente relacionada con el grado de entrecruzamiento de la red polimérica y, en general, tiende a incrementarse con el aumento en el contenido de CNWs (Dash et al., 2014). En los hidrogeles sin NaCl, los valores obtenidos para QP-0 con 0, 4, 10, 20 y 30% de CNWs se mantuvieron dentro de un rango relativamente similar, variando entre 74,3% y 80,5% en promedio. Esto sugiere que la presencia de CNWs no modifica significativamente el grado de entrecruzamiento de la matriz polimérica. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Resultados de GF de los hidrogeles con o sin CNWs y con y sin NaCl.

		0% CNWs	4% CNWs	10% CNWs	20% CNWs	30%CNWs
GF (%)	QP-0	74,4± 0,3	74,3± 1,0	76,6± 1,4	80,5± 2,6	75,5±3,0
	QP-0,15	58,2 ± 1,6	53,6 ± 1,0	65,7 ± 1,6	67,8 ± 0,7	72,7 ± 3,6

En los hidrogeles con NaCl, se observó un incremento más pronunciado en la GF con la incorporación de CNWs, alcanzando valores entre 53,6% y 72,7%. Estos resultados indican que la presencia de NaCl modifica las interacciones entre los CNWs y la matriz polimérica, favoreciendo un mayor grado de entrecruzamiento a medida que aumenta la concentración de CNWs. Con una carga del 30%, los valores de GF en hidrogeles con y sin NaCl resultaron comparables.

Como se ha reportado previamente, el efecto dopante del NaCl reduce las interacciones polímero-polímero, lo que permite una mayor movilidad de los componentes dentro de la red polimérica. En este contexto, los CNWs interactúan de manera más eficiente con las cadenas del polímero debido a la mayor movilidad generada por la presencia de NaCl. Adicionalmente, a medida que se incrementa la concentración de CNWs, se eleva la probabilidad de que estas se incorporen en

la matriz y establezcan interacciones con las cadenas poliméricas, promoviendo el entrecruzamiento. En contraste, en ausencia de NaCl, las interacciones polímero-polímero pueden ser lo suficientemente intensas como para restringir la movilidad de los CNWs, lo que limita su capacidad de interacción con la red polimérica (Bediako et al., 2023; Otoni et al., 2020).

4.3.4.3 Evaluación mecánica de los hidrogeles: ensayos de compresión.

La evaluación mecánica de los hidrogeles mediante ensayos de compresión debe estar en concordancia con los resultados de GF. La Figura 4.13 muestra que los hidrogeles exhibieron un comportamiento mecánico elástico en ensayos de compresión, alcanzando una deformación de aproximadamente el 80% al final del ensayo.

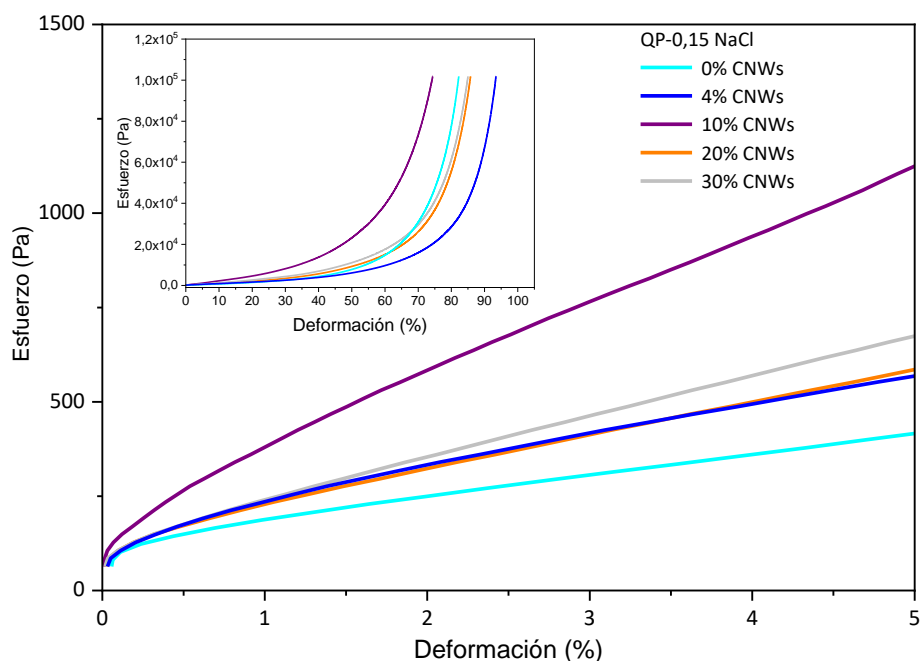


Figura 4.13. Curvas de esfuerzo vs deformación para los hidrogeles QP-0.15 con distintos porcentajes de CNWs.

El módulo de compresión, como medida de la rigidez de los hidrogeles, se espera que aumente con el contenido de CNWs (Dash et al., 2013). Se ha reportado que el módulo de compresión para la celulosa-I es de aproximadamente 130 a 150 GPa (Araki and Miyayama, 2020). La Figura 4.14 muestra el módulo obtenido para cada hidrogel.

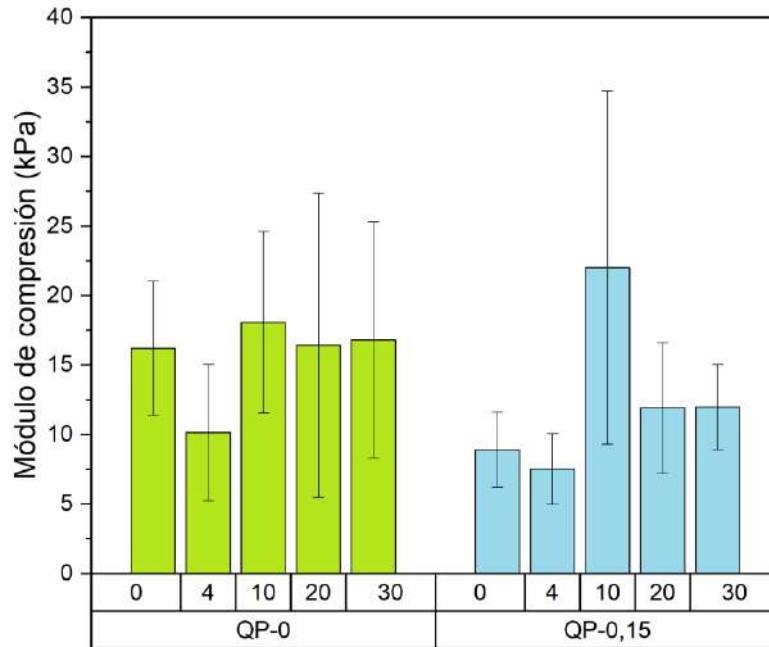


Figura 4.14. Módulo de compresión de hidrogeles QP-0-5 y QP-0,15-5 con CNWs a diferentes porcentajes, hinchados en SF previamente.

Los resultados indican que, en promedio, los CNWs son capaces de mejorar las propiedades mecánicas cuando se incorporan en concentraciones del 10% o superiores, pero no al 4%. Esto se observa en los hidrogeles con NaCl. Un contenido de CNWs superior al 10% no afecta significativamente la respuesta mecánica del material. Sin embargo, es importante considerar los márgenes de error debido a las características viscoelásticas inherentes a los materiales y a la posible pérdida de agua durante los ensayos (Calvert, 2009; Oyen, 2014).

La adición de CNWs al 4% p/p, en promedio, pareció reducir el módulo de compresión de los hidrogeles. Este efecto puede atribuirse a la concentración crítica de CNWs necesaria para formar una red tridimensional. Asimismo, al incrementar la concentración de CNWs a un 20% o 30%, el aumento en el módulo de compresión no es significativo en comparación con la incorporación de un 10%. Este comportamiento podría explicarse por la aglomeración de los CNWs debido a las interacciones por enlaces de hidrógeno, lo que genera un efecto negativo a partir de cierta concentración (Pooyan et al., 2012). Este hallazgo es consistente con los ensayos previos, en los que los hidrogeles con 20% y 30% de CNWs exhibieron exudados tras el secado y en los que las micrografías SEM mostraron la formación de aglomerados.

Por otro lado, la incorporación de NaCl no parece ejercer una influencia positiva sobre la capacidad elástica del material. Además, el NaCl parece interferir en las interacciones entre la matriz polimérica y los CNWs, especialmente cuando el contenido de CNWs es superior al 10%, lo que provoca una disminución significativa en el módulo de compresión.

Con el fin de comprender mejor los mecanismos involucrados y su relación con la aplicación final del material, se realizaron estudios reológicos, los cuales se describen más adelante.

4.3.4.4 Permeabilidad al vapor de agua: Aplicación en heridas con distintos niveles de exudado.

La incorporación de CNWs aumentó la permeabilidad al vapor de agua, siendo este incremento mayor con un 20% de CNWs en comparación con concentraciones menores o con un 30%. Los valores de la tasa de transmisión de vapor de agua normalizada (NWVTR) se muestran en la Figura 4.15, ya que permiten realizar una comparación más precisa entre las muestras analizadas, considerando que el espesor de los films generados no es uniforme en todos los casos, lo que podría afectar la interpretación de los resultados.

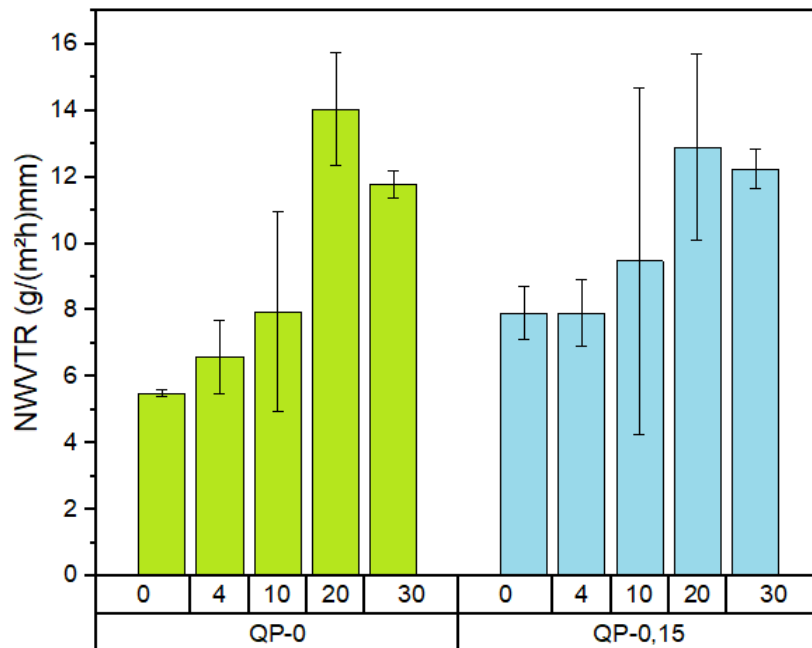


Figura 4.15. Resultados de NWVTR según el contenido de CNWs de los hidrogeles.

El incremento de la permeabilidad al vapor de agua con la incorporación de CNWs es particularmente notorio con concentraciones de 20% o 30%. Estos resultados se pueden correlacionar con la porosidad de los hidrogeles, evaluada mediante SEM en la sección 4.3.2.2. Según estudios previos, la porosidad aumenta con el contenido de CNWs, lo cual está en concordancia con los valores obtenidos de WVTR. Además, los valores de WVTR se encuentran dentro del rango esperado para quemaduras de primer o segundo grado, tanto en los hidrogeles con NaCl como en los sin él. Los valores oscilaron entre $23,4 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para los hidrogeles sin CNWs y $43,5 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ con 20% de CNWs. Como se mencionó en el Capítulo 3, sección 3.5.4, estos valores podrían ser adecuados para heridas por quemaduras.

4.3.5 Determinación de la formulación óptima para hidrogeles con CNWs.

Considerando los resultados obtenidos en los ensayos de compresión y los hallazgos previos que muestran que los hidrogeles con un 10% de CNWs no generan exudado, se concluye que la formulación óptima de los hidrogeles podría ser con un 10% de CNWs, con o sin NaCl. No obstante, se realizaron ensayos adicionales más específicos en la aplicación para confirmar que esta es la mejor opción.

4.3.6 Análisis mecánico avanzado de hidrogeles seleccionados.

4.3.6.1 Evaluación reológica: estabilidad ante diferentes frecuencias.

La Figura 4.16 muestra los módulos en configuración de compresión en un barrido de frecuencias de 0,1 a 10 Hz. Se utilizó este rango para analizar la estabilidad de los hidrogeles ante bajas y moderadas frecuencias, considerando que la zona de aplicación en la herida puede influir en la frecuencia a la que estarán sometidos, ya que el objetivo de este estudio es predecir el comportamiento mecánico de los hidrogeles en distintas condiciones (Cuomo et al., 2019; Stojkov et al., 2021).

Se observó que tanto el módulo de almacenamiento (E') como el módulo de pérdida (E'') aumentan o se mantienen relativamente estables con el incremento de la frecuencia en todas las muestras. Sin embargo, el hidrogel QP-0-0%CNWs es el menos dependiente de la frecuencia, lo que

indica una menor variación de sus propiedades mecánicas ante estos cambios. A pesar de esto, la adición de CNWs refuerza la red tridimensional, proporcionando mayor estabilidad estructural en otros aspectos, como su resistencia mecánica y elasticidad. Esto indica una transición de un comportamiento más fluido a uno predominantemente elástico (Lau et al., 2020; Ten et al., 2012).

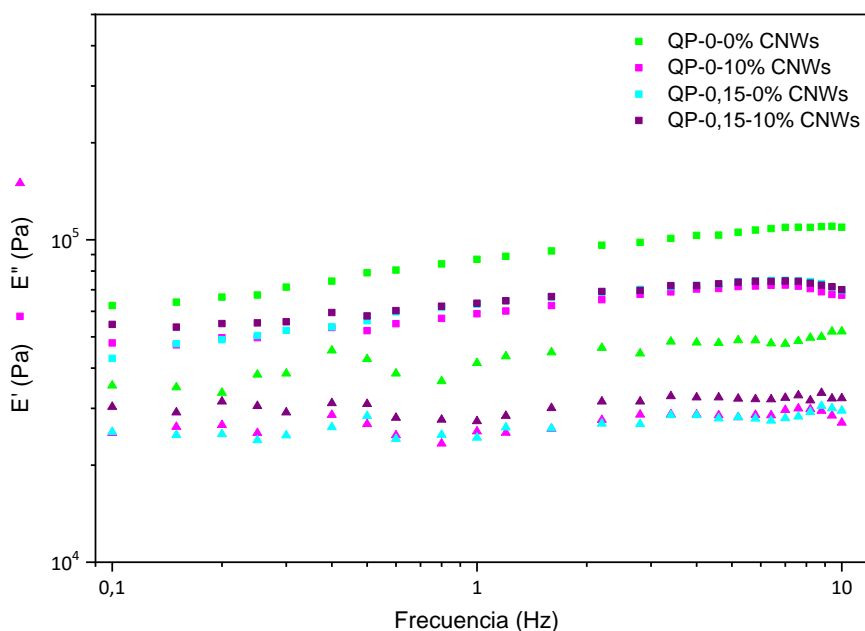


Figura 4.16. Resultados de las pruebas de frecuencia que muestran las curvas para hidrogeles con o sin NaCl y 10% p/p de CNWs. El módulo de almacenamiento se representa con cuadrados rellenos, mientras que los triángulos rellenos representan el módulo de pérdida.

Los valores de E' , que representan la respuesta elástica del material, fueron mayores en todas las muestras en comparación con E'' , que representan la respuesta viscosa de los geles. Además, las curvas no se intersectan son paralelas a lo largo del rango estudiado, dando cuenta de un comportamiento que es típico de los geles en este tipo de ensayos (Ramli et al., 2022).

El hecho de que, dentro del rango de frecuencias evaluado y a la temperatura de ensayo, no se observe una transición de comportamiento elástico a viscoso es un aspecto positivo para su aplicación como apósitos. Esto sugiere una respuesta mecánica estable y predecible ante cambios en las condiciones de uso. Además, se observó que tanto el NaCl como los CNWs interactúan con la red polimérica del hidrogel. Mientras que el NaCl interactúa electrostáticamente con las cadenas de Q y P, los CNWs lo hacen a través de sus grupos OH^- , modificando la estructura tridimensional del hidrogel. Sin embargo, estas interacciones pueden ser más débiles en comparación con las interacciones

electrostáticas entre Q y P, responsables de la formación de la red polimérica, lo que explica la disminución del módulo en hidrogeles con CNWs en comparación con el hidrogel QP-0-0%CNWs.

El hecho de que, dentro del rango de frecuencias evaluado y a la temperatura de ensayo, no se observe una transición de comportamiento elástico a viscoso es un aspecto positivo para su aplicación como apósitos. Esto sugiere una respuesta mecánica estable y predecible ante cambios en las condiciones de uso. Además, se observó en resultados previos de otros ensayos que tanto el NaCl como los CNWs interactúan con la red polimérica del hidrogel. Mientras que el NaCl interactúa electrostáticamente con las cadenas de Q y P, los CNWs lo hacen a través de sus grupos OH⁻, modificando la estructura tridimensional del hidrogel. Sin embargo, estas interacciones pueden ser más débiles en comparación con las interacciones electrostáticas entre Q y P, responsables de la formación de la red polimérica, lo que explica la disminución del módulo en hidrogeles con CNWs en comparación con el hidrogel QP-0-0%CNWs.

En relación con estudios previos sobre las propiedades mecánicas de la piel humana (Holt et al., 2008), los valores de módulo obtenidos en estos hidrogeles superan los de la piel, tanto en la dermis sola como en la piel completa, considerando el mismo rango de frecuencias y parámetros comparables. En dicho estudio, los valores de módulo de la piel varían entre 100 y 1000 Pa en el rango de 1-10 Hz, mientras que en el presente ensayo los hidrogeles alcanzaron valores superiores a 10 000 Pa. No obstante, es importante señalar que este ensayo se realizó en compresión en lugar de corte, y que los módulos complejos obtenidos (Figura 4.17) son comparables a los reportados por Geerligts et al. (Geerligts et al., 2011a) para el estrato córneo, que puede alcanzar hasta 12 kPa.

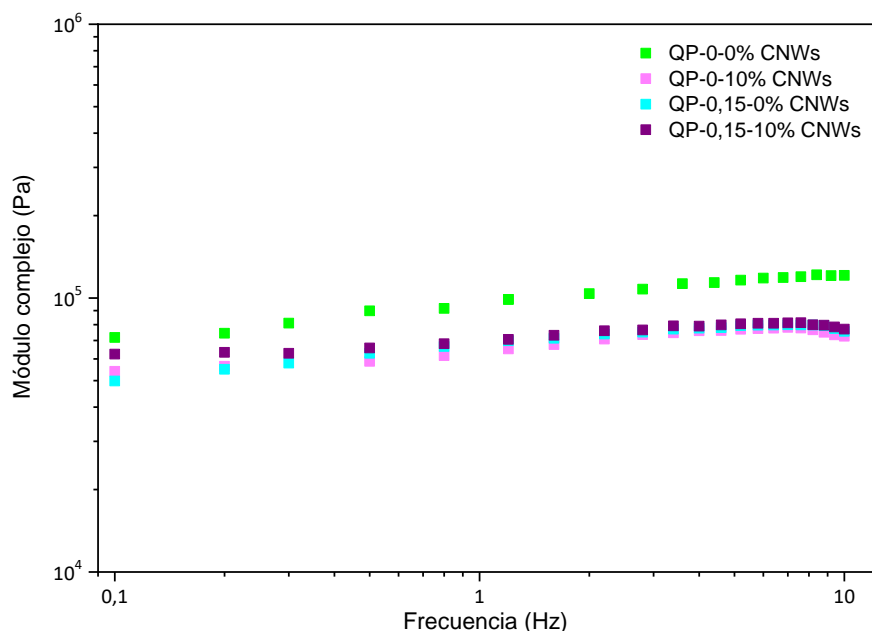


Figura 4.17. Variación de módulo complejo entre 0,1 a 10 Hz de frecuencia.

En nuestro caso, el módulo complejo fue evaluado mediante un ensayo de compresión, siguiendo la regla de Trouton: $E \approx 2G(1+\nu)$, donde ν es la relación de Poisson, E es el módulo de elasticidad en compresión y G es el módulo en corte. Para sistemas similares, se ha considerado que $\nu = 0,5$ (Liao et al., 2010). Por lo tanto, el módulo de elasticidad en compresión se aproxima a tres veces el valor del módulo de corte ($E \approx 3G$). Este aspecto debe ser tenido en cuenta al interpretar los resultados, ya que las diferencias en el tipo de deformación (compresión versus corte) pueden influir en las magnitudes obtenidas. Además, se debe considerar que los materiales evaluados son distintos, siendo hidrogeles en el presente estudio y piel en los estudios de referencia.

4.3.6.2 Análisis de superficie mediante nanoindentación.

La nanoindentación permite evaluar la rigidez superficial y las interacciones adhesivas entre el hidrogel y el indentador. En la Figura 4.18 se presentan algunas de las curvas de nanoindentación obtenidas para los hidrogeles.

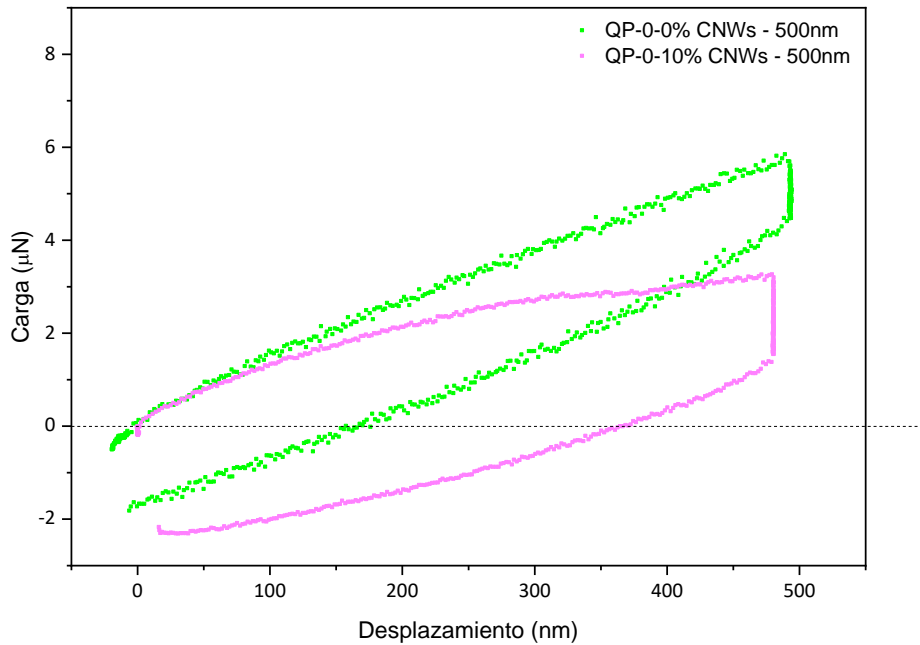


Figura 4.18. Curvas de fuerza-desplazamiento en el formato de desplazamiento máximo de 500 nm.

En todas las muestras se pudo observar que fuerzas negativas tanto durante la carga inicial como durante la descarga cerca de la posición de desplazamiento cero. Esto indica la existencia de una fuerza adhesiva entre el indentador y la muestra en la zona de contacto, lo cual suele ocurrir con este tipo de materiales hidratados (Kohn and Ebenstein, 2013). Este fenómeno ocurre porque los sistemas son blandos y se adhieren al indentador y, por lo tanto, existe una fuerza adhesiva no despreciable entre el material y la punta de indentación (Gonzalez and Alvarez, 2014). Para determinar el módulo de elasticidad en este contexto, los datos obtenidos deben ser analizados mediante un modelo que considere esta interacción.

El modelo de Hertz es comúnmente utilizado para caracterizar la capacidad elástica de un material mediante indentación (Hertz, 1882). Este modelo relaciona la rigidez del material, o su recíproco, la flexibilidad (\check{S}), con la profundidad de indentación mediante un parámetro conocido como módulo elástico de Hertz (E_{Hertz}). Sin embargo, dicho modelo no tiene en cuenta las fuerzas adhesivas, lo que puede dar lugar a un valor del módulo elástico que depende de la fuerza aplicada cuando dichas fuerzas son no despreciables. El efecto de las fuerzas adhesivas puede reflejarse en la dependencia del E_{Hertz} con la fuerza máxima aplicada (P_{max}), hasta la máxima penetración, como se ilustra en la Figura 4.19.

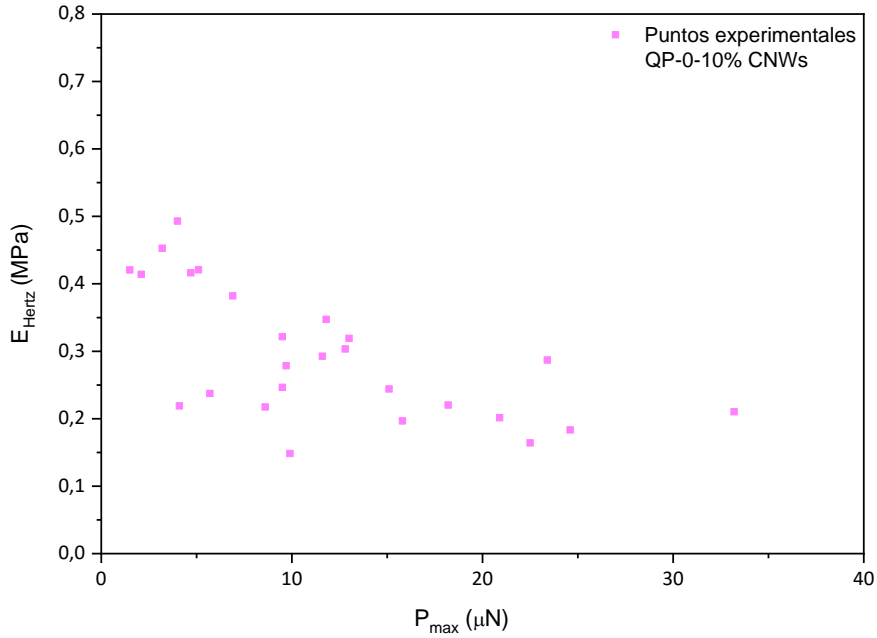


Figura 4.19. Puntos de datos obtenidos en la curva E_{Hertz} vs P_{max} para hidrogeles con 10% CNWs.

Se propuso utilizar un modelo híbrido desarrollado por Liao et al. (Liao et al., 2010) que combina el modelo de Hertz y el modelo Johnson-Kendall-Roberts (JKR) (Johnson et al., 1997). Este modelo híbrido permite la evaluación de un módulo elástico (E_{JKR}) independiente de la fuerza, ajustando los datos experimentales sin necesidad de conocer previamente la fuerza de adhesión:

$$E_{Hertz}(P_{max}, \nu, R, E_{JKR}, P_{adh}) = (1 - \nu^2) \sqrt{\frac{1}{6RP_{max}S(P_{max}, R, E_{JKR}, P_{adh})^3}} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

$$S(P_{max}, R, E_{JKR}, P_{adh}) = \sqrt[3]{\frac{9}{RP_{max}E_{JKR}^2}} \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{P_{max}}{P_{adh}}}} \left(\frac{1}{18} \left(\frac{1 + \sqrt{1 - \frac{P_{max}}{P_{adh}}}}{2} \right)^{-\frac{2}{3}} - \frac{1}{3} \left(\frac{1 + \sqrt{1 - \frac{P_{max}}{P_{adh}}}}{2} \right)^{\frac{1}{3}} \right) \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Donde P_{adh} corresponde a la fuerza de adhesión (μN) y R al radio nominal de curvatura de la punta del indentador (nm).

Entonces, el trabajo de adhesión se define como la energía interfacial por unidad de área (mJ/m^2):

$$\Delta\gamma = \frac{2P_{adh}}{3\pi R} \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

Luego, a partir de los datos obtenidos en las indentaciones y utilizando la ecuación 4.3, se calcularon los valores promedio de P_{max} - E_{Hertz} para cada máxima penetración (h_{max}) de cada muestra.

Las curvas correspondientes se representan en las Figuras 4.20 y 4.21.

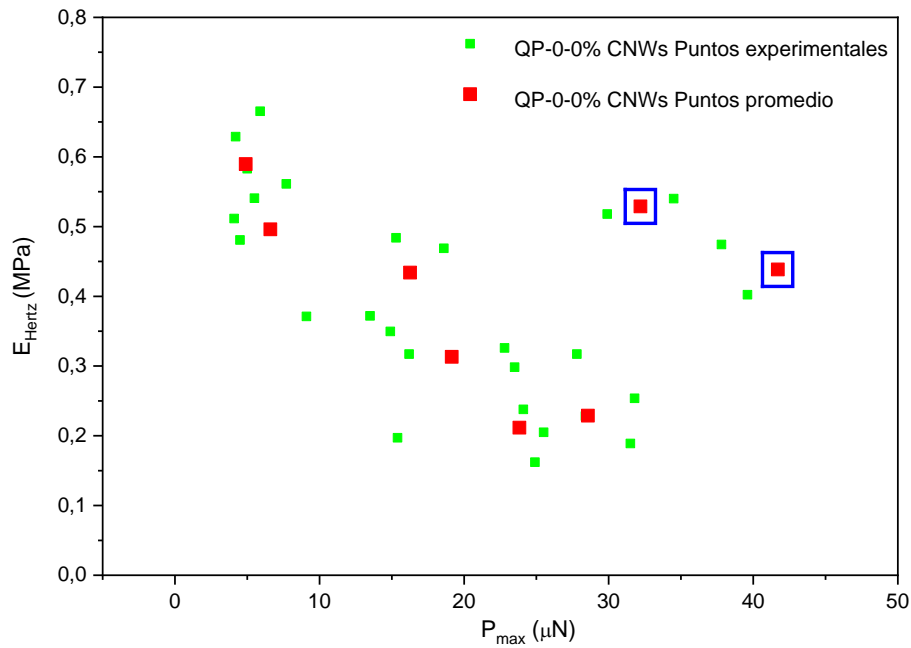


Figura 4.20. Representación de puntos experimentales y promedios de E_{Hertz} en función de la P_{max} para el hidrogel QP-0 sin CNWs. Los puntos resaltados en azul son los correspondientes a los h_{max} 2000 y 3500 nm.

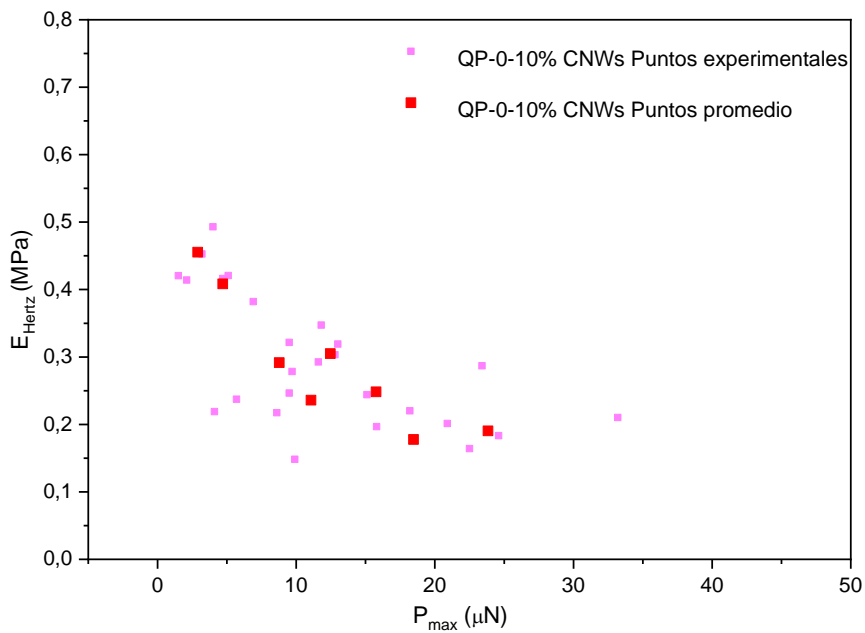


Figura 4.21. Representación de puntos experimentales y promedios de E_{Hertz} en función de la P_{max} para el hidrogel QP-0-10% CNWs.

Dado que la relación $E_{\text{Hertz}} - P_{\text{max}}$ es decreciente, se descartaron algunos puntos que no cumplían con ello. A partir de los puntos promedio obtenidos se realizaron ajustes con el modelo propuesto para obtener E_{JKR} , P_{adh} , y $\Delta\gamma$ para cada muestra, estos resultados se observan en la Figura 4.22.

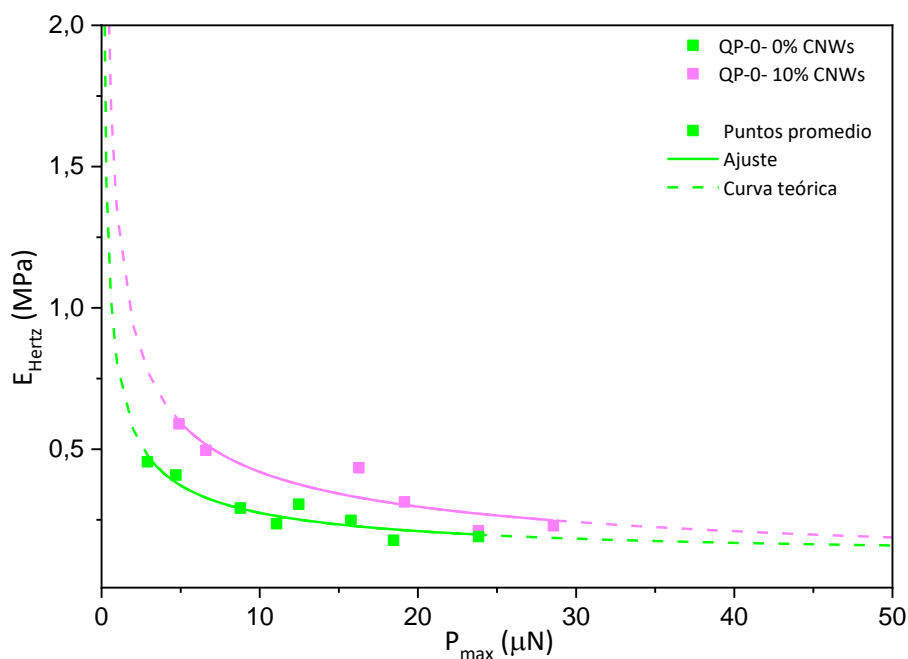


Figura 4.22. Curvas teóricas y de ajuste de E_{Hertz} vs P_{max} en hidrogel con o sin 10% CNW.

El radio nominal del indentador utilizado fue de 500 nm y en el caso del índice de Poisson se utilizó un valor de 0,5, típico de estos materiales blandos (Liao et al., 2010).

Los resultados de los ajustes utilizando el modelo JKR se observan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Parámetros obtenidos del modelo híbrido, parámetro de ajuste de R_{Pearson} y valores de trabajo de adhesión para las muestras analizadas.

	E_{JKR} (MPa)	P_{adh} (μN)	R_{Pearson}	$\Delta\gamma$ (mJ/m ²)
QP-0-0%CNWs	0,006	-97210	0,91	153700
QP-0-10%CNWs	0,154	-54	0,95	23

Se confirmó que la adición de un 10% de CNWs aumenta la respuesta elástica del material, lo cual es evidenciado por las pruebas de compresión mecánica. Este efecto es particularmente notable

en la superficie del hidrogel QP, ya que muestra un módulo (E_{JKR} , Tabla 4.5) que es bastante similar al módulo medido en compresión. En contraste, el hidrogel nanocompuesto presenta un módulo superficial aproximadamente 10 veces mayor que el módulo de compresión. Esta diferencia también impacta en el trabajo de adhesión, el cual disminuye considerablemente con la presencia de CNWs en el material.

Cabe destacar que, aunque existen estudios de indentación realizados en piel humana en la literatura, varios factores pueden influir en la comparación directa de los resultados, tales como la temperatura y la humedad relativa del ambiente, la zona de la piel evaluada, la edad del donante, la velocidad de indentación y las características del indentador, entre otros (Bhushan, 2012; Geerligts et al., 2011b; Pailler-Mattéi and Zahouani, 2006). Estos factores pueden alterar las propiedades mecánicas de la piel y, en consecuencia, modificar las mediciones obtenidas en diferentes estudios, lo que dificulta una comparación exacta con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

4.3.7 Evaluación de modificaciones de la actividad antimicrobiana en hidrogeles reforzados.

La apariencia del halo de inhibición proporciona información sobre el tipo de efecto antimicrobiano observado. Generalmente, un halo de inhibición indica una inhibición directa del crecimiento bacteriano cerca del punto de aplicación, lo que sugiere un efecto bactericida. Sin embargo, también puede observarse un halo en el que el crecimiento bacteriano se inhibe a una distancia mayor del punto de aplicación, lo que sugiere un efecto bacteriostático. Tanto los halos bactericidas como los bacteriostáticos contribuyen a la zona de inhibición (Mollea et al., 2022; Moneris et al., 2019).

El objetivo de este ensayo fue determinar si la incorporación de CNWs modifica la actividad antimicrobiana de los hidrogeles. La mayoría de los hidrogeles presentó halos, como se observa en la Figura 4.23, aunque estos variaron en cuanto a su opacidad, lo que sugiere que podrían estar asociados tanto a un efecto bacteriostático (Moneris et al., 2019) como bactericida en algunos casos. En términos generales, el halo no se presenta de forma pronunciada, por lo que la interpretación es cualitativa. Aunque las observaciones sugieren que la presencia de CNWs pudo haber influido en los efectos antimicrobianos, no se vieron cambios significativos, además es importante destacar que, para mejorar el efecto bactericida, sería necesario incorporar agentes adicionales a los hidrogeles.

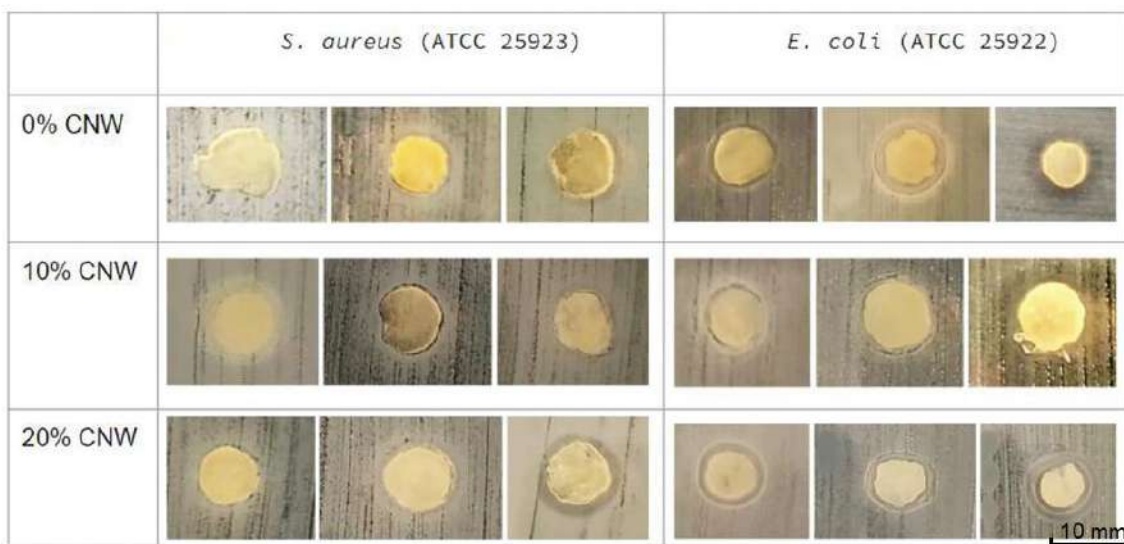


Figura 4.23. Halo de inhibición generado alrededor de los hidrogeles incubados con *S. aureus* (izquierda) o *E. coli* (derecha) sin NaCl. Filas de arriba a abajo: con 0, 10 y 20% CNWs.

Es fundamental tener en cuenta que este ensayo se realizó con cepas distintas a las utilizadas en los ensayos mencionados en las secciones 3.4.7 y 4.1.3. Es común que los resultados varíen al cambiar la cepa, motivo por el cual, en diversos estudios, se analiza la actividad antibacteriana de un agente contra varias cepas de una misma bacteria (Mogna et al., 2012; Nemezc and Golińska, 2022; Szpak et al., 2014). En este sentido, el ensayo fue realizado de forma comparativa para analizar el efecto de la incorporación de CNWs.

4.3.8 Efecto de la incorporación de refuerzos sobre la viabilidad celular.

El ensayo de citotoxicidad celular se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el Capítulo 2, sección 2.5.10. En el Capítulo 3, sección 3.6.4, se presentaron resultados de estudios de citotoxicidad celular, donde se observó que los hidrogeles con NaCl en su composición generalmente mostraban menor viabilidad. Además, se halló que la encapsulación de un activo como la lidocaína mejoraba la viabilidad. En el presente caso, al incorporar CNWs, se observa una respuesta similar (Figura 4.24).

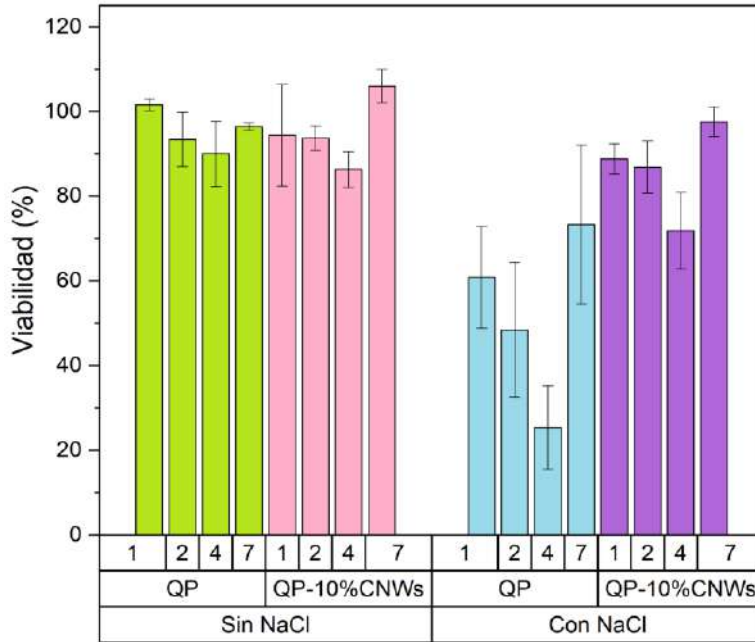


Figura 4.24. Resultados de viabilidad con diferentes muestras después de 1, 2, 4 y 7 días de incubación.

Aparentemente, la adición de CNWs no genera efectos citotóxicos en ninguno de los hidrogeles, tanto con como sin NaCl. Este resultado era esperable, considerando la literatura disponible sobre los efectos de la nanocelulosa en distintos tipos celulares (Leong et al., 2023; Mishra et al., 2018; Nicu et al., 2021; Vieyra et al., 2018). Además, en los hidrogeles que contenían NaCl, la adición de CNWs mejoró significativamente la viabilidad celular. Este resultado podría estar relacionado con la variación en la rigidez de los hidrogeles; aquellos con NaCl son menos rígidos, pero cuando se incorpora un 10% de CNWs, la rigidez aumenta, como se observó en las secciones 4.2.4.2 y 4.2.6.2 con los ensayos mecánicos, lo que contribuye a la proliferación celular (Costa et al., 2015). Sin embargo, para confirmar que la diferencia en viabilidad celular se debe principalmente al cambio en la rigidez, sería necesario realizar ensayos adicionales que permitan explorar otros factores.

4.4 Evaluación de la vida útil de los hidrogeles.

4.4.1 Ensayo de degradabilidad.

El ensayo de degradabilidad se llevó a cabo durante un período de 21 días, de acuerdo con la duración típica de aplicación de los hidrogeles y el tiempo aproximado de curación de las heridas por quemaduras de segundo grado tipo A (Markiewicz-Gospodarek et al., 2022). Sin embargo, se

reconoció que el tiempo de recambio de los hidrogeles depende de múltiples factores, como el tipo de herida, el exudado presente y las necesidades específicas del proceso de curación. Por ejemplo, para heridas con bajo exudado, los hidrogeles pueden permanecer in situ por un período de dos a tres días, mientras que en heridas con un alto nivel de exudado puede ser necesario un cambio diario (Brumberg et al., 2021; Burd, 2007). Se observó que, tras solo un día de exposición en SF a 37 °C, los hidrogeles mostraron una pérdida de peso superior al 10%. Los resultados se encuentran en la Figura 4.25.

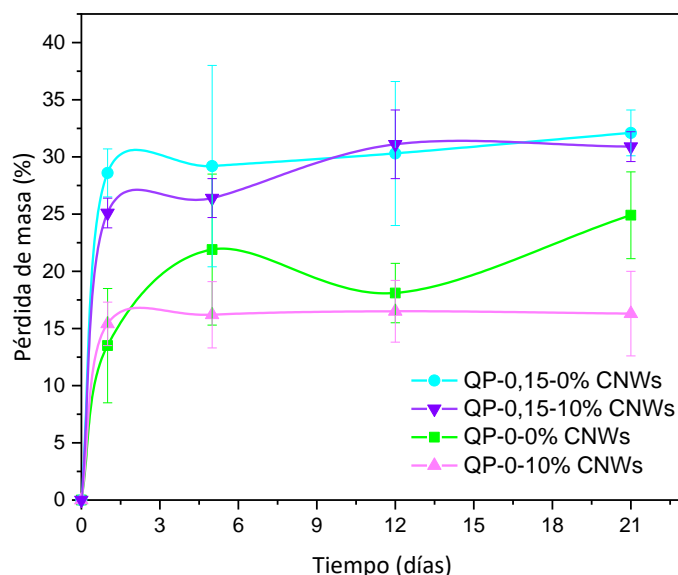


Figura 4.25. Resultados de la prueba de degradación de hidrogeles con o sin CNWs y NaCl, mostrando su pérdida de peso (%) a través del tiempo.

Además, los resultados revelaron que los hidrogeles que no contenían NaCl presentaron una menor degradabilidad, en comparación con aquellos que sí lo contenían, los cuales alcanzaron un promedio de degradación de un $32 \pm 2\%$ en el caso de la formulación QP-0,15. Esta diferencia sugiere que la presencia de NaCl favorece la degradabilidad del material, lo que representa una ventaja para los hidrogeles diseñados para aplicaciones biomédicas, ya que permiten una degradación a lo largo del tiempo, lo que a su vez favorece el proceso de curación de la piel (Zhou et al., 2022). En este sentido, los hidrogeles desarrollados en esta investigación, compuestos únicamente por polímeros naturales, presentan una ventaja significativa, ya que su biodegradabilidad inherente puede facilitar el proceso de descomposición sin necesidad de la incorporación de componentes sintéticos (Aswathy et al., 2020; Francesko et al., 2019).

4.4.2 Estabilidad mecánica y estructural durante el almacenamiento.

En cuanto a la evaluación de la vida útil de los hidrogeles, se realizó un ensayo para analizar la estabilidad mecánica y estructural durante el almacenamiento. La vida útil de un material se define como el tiempo durante el cual este mantiene sus propiedades bajo condiciones específicas de almacenamiento (Roy et al., 2013). El objetivo de este ensayo fue almacenar los hidrogeles a temperatura ambiente (21 °C) y observar la variación de propiedades como el módulo de compresión, el peso, el aspecto microscópico y los resultados de FTIR, a lo largo de diferentes periodos de tiempo (60, 120, 180 y 240 días). El almacenamiento a temperatura ambiente se eligió para evitar el gasto energético innecesario que implicaría el almacenamiento en heladera, ya que se asumió que las propiedades del hidrogel se mantendrían estables a esta temperatura durante el tiempo requerido. Los hidrogeles fueron guardados en frascos plásticos con tapa y en condiciones de oscuridad para protegerlos de factores externos que pudieran afectar su calidad (Soler et al., 2012).

4.3.2.1 Cambios en las propiedades mecánicas.

Como referencia de las propiedades mecánicas se determinó si hubo cambios en los módulos de compresión con el paso del tiempo, los resultados se observan en la Figura 4.26.

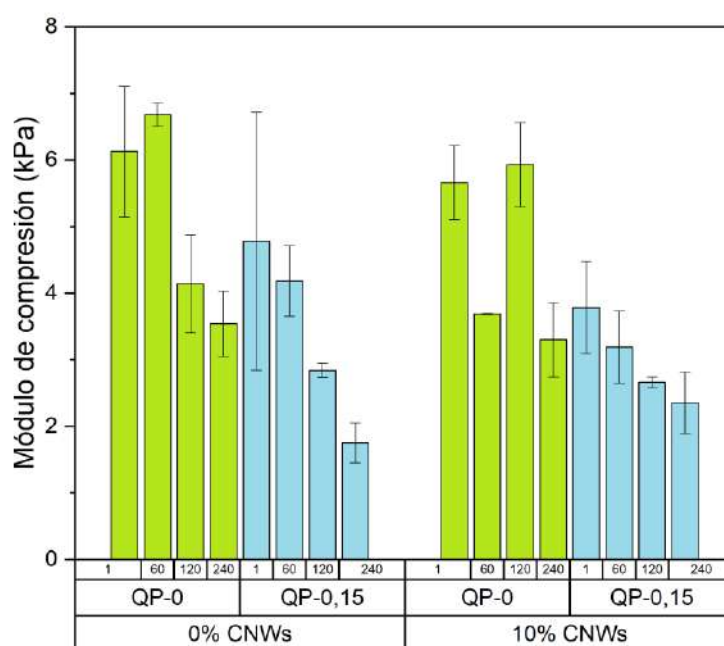


Figura 4.26. Resultados de módulo de compresión para los hidrogeles con o sin NaCl y/o CNWs conservados durante distintos tiempos.

Se observó una tendencia general a la disminución del módulo de compresión en los hidrogeles con el paso del tiempo, lo cual era esperable y consistente con la literatura, indicando un deterioro gradual de las propiedades mecánicas debido al almacenamiento prolongado (Lee et al., 2004). Los resultados mostraron que, en términos de propiedades mecánicas, los hidrogeles mantuvieron su módulo de compresión sin cambios significativos durante los primeros 60 días de almacenamiento. Sin embargo, a partir de los 120 días comenzaron a observarse diferencias significativas, dependiendo de la composición del hidrogel. En el caso del hidrogel QP-0 sin CNWs, se observó una disminución significativa en el módulo de compresión a los 120 días en comparación con el día 1, aunque entre los 120 y 240 días no se registraron diferencias significativas, aunque sí se detectó una reducción promedio al final del periodo de estudio. Por otro lado, el hidrogel QP-0-10%CNWs presentó un comportamiento menos lineal, con un incremento temporal en el módulo de compresión a los 120 días, alcanzando valores similares a los del día 1, pero con una posterior disminución a los 240 días, lo que podría estar relacionado con interacciones entre las CNWs y la matriz del hidrogel, aunque este fenómeno requiere de un análisis más profundo para una explicación detallada.

En los hidrogeles con NaCl, la disminución del módulo de compresión fue más escalonada. En el caso del hidrogel QP-0,15 sin CNWs, se observó una disminución significativa al día 240 respecto al resto de las mediciones, y a los 120 días también se registró una diferencia significativa en comparación con los 60 días. Por su parte, los hidrogeles con CNWs y NaCl mostraron una disminución significativa del módulo de compresión a los 120 días respecto al día 1, aunque no se observaron diferencias significativas entre los 120 y los 240 días.

En resumen, los resultados confirman que los hidrogeles mantienen su módulo de compresión relativamente estable durante los primeros 60 días de conservación. A partir de los 120 días, se empiezan a notar diferencias significativas, con una tendencia general a la disminución del módulo de compresión. Sin embargo, el hidrogel QP-0-10%CNWs mostró un comportamiento particular, con un incremento temporal del módulo a los 120 días, que podría atribuirse a interacciones entre las CNWs y la matriz del hidrogel, aunque esto requeriría mayor análisis para ser explicado en profundidad.

4.3.2.2 Pérdida de peso y estabilidad estructural.

Como tendencia general, los hidrogeles sin NaCl exhibieron menores pérdidas de peso a lo largo del tiempo, destacándose QP-0 sin CNWs como el más estable durante todo el ensayo. En contraste, los hidrogeles con CNWs, particularmente QP-0,15-10%CNWs, registraron mayores pérdidas de peso, lo que indica una menor durabilidad en comparación con las demás formulaciones.

Si bien las desviaciones estándar en el ensayo fueron elevadas, en promedio, QP-0 sin CNWs mantuvo su peso prácticamente estable, con una pérdida del 1,0 % a los 60 días y valores cercanos a cero o incluso negativos hacia el final del ensayo (-10,0 % al día 240). Por otro lado, QP-0,15-10%CNWs presentó las mayores pérdidas de peso desde los primeros días, alcanzando un 22,7 % a los 60 días y aumentando progresivamente hasta un 28,2 % al día 240. Debido al margen de error observado, no se pueden establecer diferencias significativas entre las formulaciones. Estos resultados se detallan en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Resultados de pérdida de peso para los hidrogeles con o sin NaCl y CNWs conservados durante distintos tiempos.

		QP-0 0%CNWs	QP-0,15 0%CNWs	QP-0 10% CNWs	QP-0,15 10% CNWs
Pérdida de peso (%)	Día 60	1,0 ± 14,5	11,4 ± 9,8	10,5 ± 10,7	22,7 ± 14,6
	Día 120	3,8 ± 14,9	14,6 ± 12,0	25,4 ± 14,8	29,1 ± 15,8
	Día 180	-9,2 ± 19,7	1,3 ± 15,2	14,3 ± 22,7	28,9 ± 24,7
	Día 240	-10,0 ± 12,3	-7,1 ± 5,5	11,1 ± 9,4	28,2 ± 19,7

Los hidrogeles QP-0,15 sin CNWs y QP-0-10%CNWs mostraron comportamientos intermedios, aunque sin la consistencia observada en QP-0 sin CNWs y QP-0,15-10%CNWs. A pesar de estas diferencias, la formulación sin NaCl y sin CNWs se destacó como la más duradera, manteniendo su peso con mínimas variaciones a lo largo del ensayo. Dado que los hidrogeles fueron almacenados en agua destilada, la pérdida de masa no se atribuye a un proceso de deshidratación, sino más bien a la eliminación de componentes no retenidos completamente en la matriz polimérica o

al proceso de degradación con el tiempo. De hecho, en los hidrogeles sin CNWs se registró un aumento de masa promedio hacia el final del ensayo, lo que sugiere la posible incorporación de agua en la red polimérica o modificaciones estructurales asociadas a la degradación, tal como se ha reportado previamente (Cha et al., 2009). En este sentido, si bien los CNWs y los iones de NaCl pueden formar enlaces con los polímeros y entre sí, los cambios estructurales inducidos con el tiempo podrían favorecer la pérdida de masa del material.

Los valores promedio obtenidos sugieren que los hidrogeles con NaCl y CNWs presentan una menor estabilidad, aunque se registraron errores estándar elevados y fluctuaciones en el peso entre los distintos tiempos de medición. Estas variaciones indican que podrían intervenir factores adicionales en la estabilidad del material.

Por último, los resultados de pérdida de peso se correlacionan con los cambios en el módulo de compresión observados previamente. En general, los hidrogeles que experimentaron mayores pérdidas de peso, como QP-0,15-10%CNWs, también evidenciaron una disminución más pronunciada en el módulo de compresión con el tiempo. Esto sugiere que la degradación estructural del material afecta tanto su estabilidad mecánica como su retención de masa.

4.4.2.1 Evaluación de la morfología interna.

La coloración y morfología de los hidrogeles a nivel macroscópico no presentaron variaciones a lo largo del ensayo. No obstante, se llevaron a cabo análisis de SEM para comparar la estructura interna de los hidrogeles. Como se observa en las Figuras 4.27 y 4.28, los hidrogeles mantuvieron su naturaleza porosa, sin cambios notorios a lo largo del tiempo, tanto en los hidrogeles QP-0 con o sin CNWs, como en los QP-0,15 con o sin CNWs.

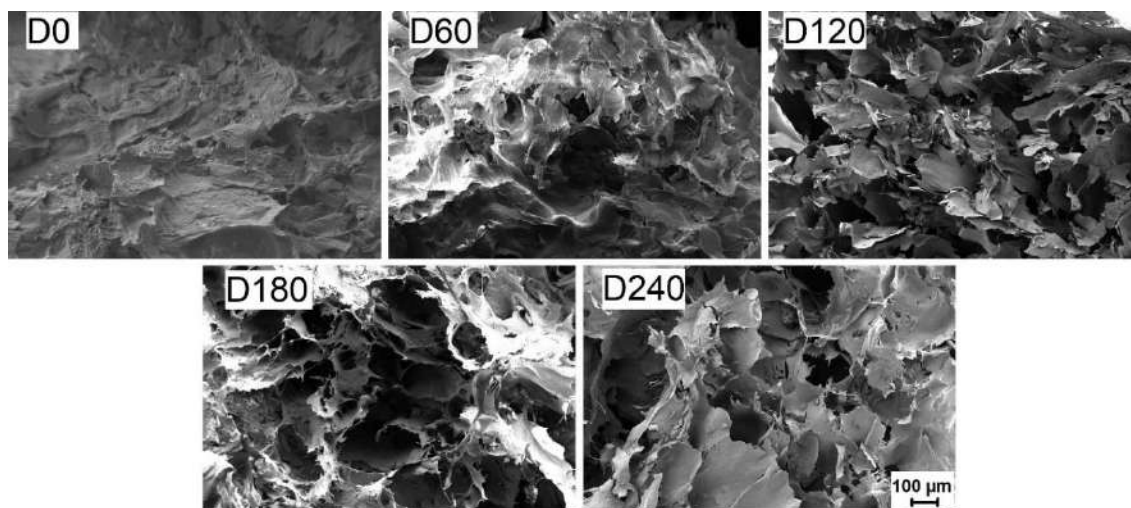


Figura 4.27. Micrografías de SEM de los hidrogeles QP-0-10%CNWs a los 0, 60, 120, 180 y 240 días de conservación.

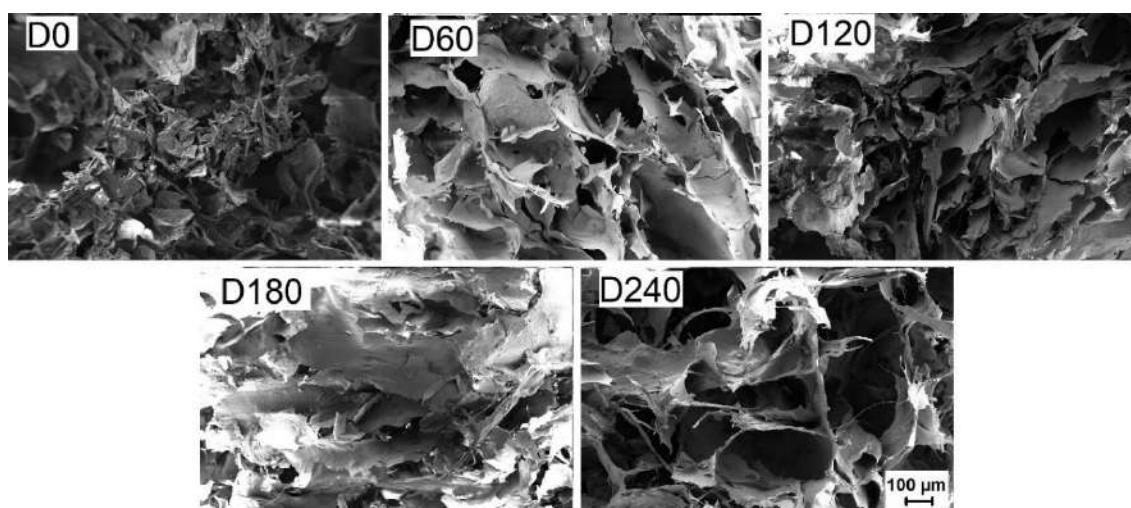


Figura 4.28. Micrografías de SEM de los hidrogeles QP-0,15-10%CNWs a los 0, 60, 120, 180 y 240 días de conservación.

4.4.2.2 Cambios en las interacciones moleculares: Espectros de FTIR.

En relación con la aparición, desaparición o desplazamiento de los picos observados en los espectros obtenidos durante los diferentes días de análisis, no se detectaron diferencias en ninguno de los casos que pudieran relacionarse con una disminución en la durabilidad de los hidrogeles. En comparación con el día 0 (espectros mostrados en la sección 3.5.2), la única diferencia significativa se observó en la región de 3000 a 3700 cm^{-1} , correspondiente a los grupos -OH . En el día 0, se apreciaron tres picos dentro del pico amplio generado, mientras que, al haber colocado los hidrogeles en agua destilada después de su formulación, esta región experimentó un cambio debido a la formación de nuevos enlaces de hidrógeno (Ehman, 2019), este resultado era esperable.

En definitiva, el ensayo de durabilidad demostró que los hidrogeles conservados en agua destilada a temperatura ambiente pueden mantener sus propiedades sin alteraciones significativas durante al menos 60 días.

4.5 Conclusiones del capítulo.

Se logró incorporar AgNPs, 1% p/p, y CNWs en los hidrogeles QP de manera satisfactoria, de forma separada. Los hidrogeles exhibieron actividad antibacteriana, pero la incorporación de AgNPs o CNWs no generó mejoras significativas. Por esta razón, se decidió no utilizar AgNPs en estas matrices, ya que su objetivo era optimizar la actividad antibacteriana. Los CNWs fueron integrados mediante dos métodos: hinchamiento de hidrogeles previamente formados o incorporación directa en la solución precursora antes de la gelificación. El segundo enfoque (utilizando 4%, 10%, 20% y 30% p/p de CNWs) fue preferido debido a su eficiencia en términos de tiempo y uso de material, eligiéndose los hidrogeles con 10% p/p como los más prometedores. Los hidrogeles presentaron un comportamiento viscoelástico, con módulos de compresión que oscilaron entre 5 y 35 kPa. En general, aquellos con NaCl en su composición mostraron módulos en promedio menores, salvo los que contenían 10% de CNWs. No se observó un incremento significativo en el módulo de compresión con concentraciones de CNWs superiores al 10%, y en los hidrogeles secos con 20% y 30% de CNWs se detectó la formación de exudados. Además, los mayores porcentajes de CNWs incrementaron la porosidad y los valores de NWVTR.

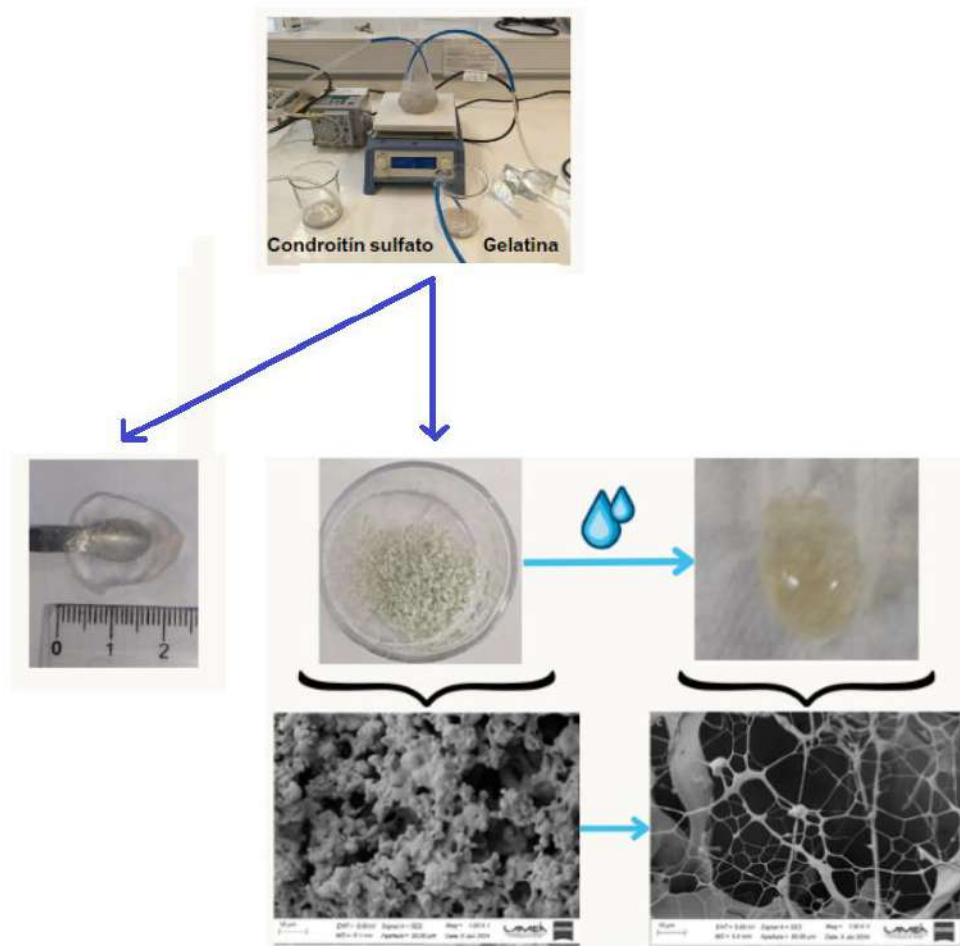
El análisis reológico mostró que los hidrogeles con CNWs tienen un módulo elástico menor en comparación con aquellos sin nanopartículas, lo cual puede atribuirse a interacciones más débiles entre las cadenas poliméricas y los CNWs, en comparación con las interacciones entre los polímeros. Sin embargo, este resultado no debe considerarse una desventaja, ya que los hidrogeles superan los valores típicos de elasticidad de la piel humana, favoreciendo su uso como apósitos. En las pruebas de nanoindentación, la incorporación de 10% de CNWs mejoró la elasticidad superficial del material y redujo la adhesión.

En los ensayos biológicos, se constató que la adición de CNWs no altera la actividad antibacteriana de los hidrogeles y que la viabilidad celular de los hidrogeles con NaCl se incrementó significativamente por la incorporación de CNWs al 10%. Además, los CNWs no redujeron la viabilidad celular en los hidrogeles sin NaCl.

En cuanto a los ensayos de durabilidad, se concluyó que estos hidrogeles podrían conservarse en agua destilada durante al menos 60 días sin presentar cambios significativos en cuanto a peso, módulo de compresión, microestructura y resultados de FTIR.

Capítulo 5.

Diseño y caracterización de hidrogeles de CoPECs y microgeles de gelatina y condroitín sulfato.



5.1 Introducción al Capítulo 5.

En el presente capítulo se describen el desarrollo y la caracterización de hidrogeles y microgeles compuestos por Ge y CS. La selección de estos polímeros se fundamenta en sus propiedades de interés en el campo biomédico, entre las que se destacan la elevada capacidad de absorción de exudados y fluidos de la Ge (Chaibi et al., 2015), su similitud con la matriz extracelular y su capacidad para liberar factores de crecimiento y citocinas (Anitua et al., 2022). En el caso del CS, su aplicación biomédica responde a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiapoptóticas, antitumorales y anticoagulantes (Bonkovoski et al., 2021).

La carga de ambos polímeros depende del pH del medio en el que se encuentran. La Ge es un polímero anfótero, por lo que a valores de pH bajos presenta una carga neta positiva, mientras que a valores elevados predomina la carga neta negativa. Como consecuencia, al mezclarse con un polielectrolito de carga opuesta, pueden formarse PECs (Voron'ko et al., 2016). El CS, por su parte, presenta una carga neta negativa cuando se encuentra en solución a un pH superior a su punto isoeléctrico (pI), debido a la presencia de grupos sulfato en su estructura (Gonzalez et al., 2020).

Para la síntesis de los hidrogeles, se empleó un protocolo basado en la formación de CoPECs a partir de Ge y CS, utilizando distintas combinaciones de pH, concentración polimérica y NaCl. Tras la mezcla de las soluciones poliméricas, los PECs obtenidos se sometieron a centrifugación para la obtención de CoPECs. Por otro lado, el proceso de síntesis se modificó con el objetivo de obtener microgeles en polvo. En este caso, en lugar de aplicar centrifugación, se implementó secado por aspersión, una técnica ampliamente utilizada en diversas industrias, que permite la conversión de sustancias líquidas en polvo mediante su atomización en forma de niebla y su exposición a una corriente de aire caliente. Este método presenta diversas ventajas, como la formación directa de microsferas con control sobre su tamaño, forma y estructura (Wei et al., 2020), la facilidad de escalado, la distribución homogénea del tamaño de partícula y la alta reproducibilidad del proceso (Lima et al., 2012). Adicionalmente, la aplicación de hidrogeles en forma de polvo, en comparación con films o scaffolds, puede acelerar los procesos de curación de heridas debido al mayor contacto entre las partículas y el tejido lesionado (Emami and Ebrahimi, 2023).

En los últimos años, diversos estudios han abordado el uso de hidrogeles en el tratamiento de heridas agudas, destacando su capacidad para detener el sangrado y favorecer la cicatrización hemostática (Chen et al., 2022; Li et al., 2023; Pourshahrestani et al., 2020). No obstante, hasta el

momento, no se han reportado en la literatura estudios sobre la obtención de microgeles en polvo de PECs de Ge y CS.

El objetivo del presente capítulo es la fabricación de hidrogeles CoPECs y microgeles en polvo de Ge y CS, con o sin la incorporación de AgNPs para conferirles propiedades antibacterianas, y la inclusión de NaCl con el fin de evaluar su influencia en las propiedades de los materiales obtenidos. Se detalló la caracterización estructural, morfológica y funcional de los geles sintetizados y, en función de su potencial aplicación, se analizó la interacción de los microgeles con glóbulos rojos.

5.2 Caracterización físico-química del condroitín sulfato.

5.2.1 Cálculo del peso molecular viscosimétrico.

Dado que el CS es un polímero natural cuyo peso molecular puede variar según su método de extracción y sus características estructurales, se llevó a cabo un ensayo de viscosimetría para su determinación. La medición se realizó mediante un viscosímetro Ubbelohde modelo 1c, siguiendo el procedimiento detallado en el Capítulo 2, sección 2.5.1.

Para el análisis de los resultados, se consideró que la diferencia entre los tiempos de flujo del agua destilada y de las soluciones con distintas concentraciones de CS fuera de al menos 30 segundos. Con este criterio, se seleccionaron tres diluciones para el cálculo del peso molecular viscosimétrico, cuyos valores se presentan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Valores obtenidos al medir el tiempo de flujo de distintas soluciones conteniendo CS a concentraciones diferentes, utilizando agua destilada como solvente. Valores de η_r y η_{sp} de las distintas soluciones.

Concentración (C=g/mL)	Tiempo de flujo (s)			Promedio	$\eta_r = t/t_0$	$\eta_{sp} = \eta_r - 1$
0	290	292	289	290,3 ± 1,5	1	0
0,0033	412	413	413	412,7 ± 0,6	1,42	0,42
0,0050	459	457	459	458,3 ± 1,2	1,58	0,58
0,0080	528	527	527	527,3 ± 0,6	1,82	0,82

Teniendo en cuenta los tiempos de dilución de cada solución, se calcularon la η_r y la η_{sp} . A partir de estos valores, se determinó la η siguiendo la metodología propuesta por Paz et al. (Paz et al., 2013), obteniéndose un valor de 164,3 ml/g. Posteriormente, considerando las constantes de Mark-

Houwink-Sakurada, con $k = 0,031 \text{ ml/g}$ y $a = 0,74$ (Mori and Barth, 1999) se calculó el peso molecular viscosimétrico del CS, resultando en 107,8 kDa.

5.2.2 Caracterización físico-química del condroitín sulfato.

Dado que el CS utilizado es un polímero natural no previamente caracterizado y que no corresponde a un material de grado comercial, se realizaron ensayos para su caracterización. Uno de los análisis llevados a cabo fue FTIR, mediante la cual se identificaron los picos característicos del CS, asociados a las vibraciones de enlace que permiten inferir su estructura química. La Figura 5.1 muestra el espectro FTIR obtenido.

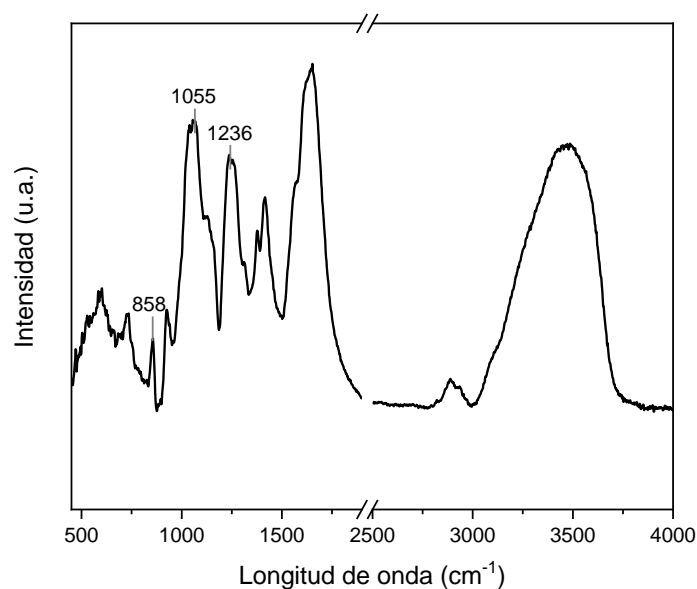


Figura 5.1. Espectro de FTIR del CS con la longitud de onda de sus grupos funcionales destacada.

En el caso del CS, la posición del grupo sulfato permite diferenciar entre los isómeros CS4 y CS6. Cuando el grupo sulfato se encuentra en posición 4, se denomina CS4, mientras que, si se localiza en posición 6, corresponde al isómero CS6. El análisis espectroscópico permitió identificar las bandas correspondientes al grupo amida I de ambos isómeros, ubicadas en 1630 para CS4 y 1640 cm^{-1} para CS6 (Myron et al., 2017). En cuanto a la distribución de estos isómeros en el organismo, se ha reportado que, en humanos adultos, el 90% del condroitín sulfato presente en el cartílago articular

corresponde a CS6, mientras que en tejidos fibrosos como meniscos, ligamentos y válvulas cardíacas predomina CS4 (Shinmei et al., 1992).

Entre los enlaces característicos identificados en el espectro, destacan aquellos asociados al grupo sulfato: la vibración del enlace S=O, observada a 1236 cm^{-1} , y la señal correspondiente a la vibración S-O-C, localizada en 858 cm^{-1} . Asimismo, se identificó la banda característica de los carbohidratos (C-O-C) en 1055 cm^{-1} (T. Wang et al., 2020). También se observaron los picos correspondientes a los grupos -CH en 2900 (Dai et al., 2018), y C=O y -OH en y $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (Ehman, 2019).

5.3 Formulación de hidrogeles CoPECs.

Se formularon un total de 19 hidrogeles CoPECs, de los cuales 9 pudieron ser pesados correctamente, mientras que los 10 restantes no presentaron una formación adecuada. En la Tabla 5.2, se resaltan en verde claro y verde oscuro los hidrogeles que lograron formarse con éxito. Aquellos indicados en verde oscuro fueron seleccionados para los ensayos posteriores, debido a su morfología, textura, apariencia, peso obtenido y la posibilidad de establecer comparaciones entre ellos.

Tabla 5.2. Combinaciones consideradas para la formulación de hidrogeles.

pH	Concentración polimérica (mg/ml)	Sal (M)	Masa (g)	Características
4	5	0	-	No se formó
4	5	0,15	-	No se formó
4	10	0	0,54	Poca cantidad obtenida
4	10	0,15	-	No se formó
(A) 4	15	0	1,08	Se formó correctamente
4	15	0,15	-	No se formó
4	20	0,1	-	No se formó
4	25	0,05	-	No se formó
4	10 Ge/20CS	0,15	0,18	Muy frágil
(B) 4	10Ge/20CS	0	0,98	Se formó correctamente
3,5	10	0	0,45	Menor masa que el resto
(C) 3,5	15	0	0,82	Se formó correctamente
(D) 3,5	15	0,15	1,60	Se formó correctamente
3,5	15	0,5	-	No se formó
3,5	15	0,3	-	No se formó
3,5	20	0,15	-	No se formó
3,5	10	0,15	-	No se formó
3,5	10 Ge/20CS	0,15	0,99	Rígido
(E) 3,5	10Ge/20CS	0	0,57	Se formó correctamente

5.4 Selección de hidrogeles y evaluación de su rendimiento.

5.4.1 Respuesta de los hidrogeles ante condiciones fisiológicas simuladas.

Se llevaron a cabo ensayos de hinchamiento en pH 5 con 0,15 M NaCl y sin NaCl a temperatura ambiente, así como en PBS a temperatura ambiente y a 37 °C. Estas condiciones experimentales fueron seleccionadas con el objetivo de replicar el entorno fisiológico en el que los apósitos serán

aplicados. En particular, se ha reportado que la acidificación del medio cutáneo constituye una estrategia terapéutica efectiva para la cicatrización de heridas. Además, la mayoría de las bacterias patógenas requieren un pH superior a 6 para su proliferación (Proksch, 2020). En este contexto, la selección de un pH 5 para los ensayos permite evaluar el desempeño de los hidrogeles en un ambiente fisiológico que favorece la cicatrización y que es relevante para el diseño de apósitos. La adición de NaCl simula la composición iónica de los fluidos corporales, dado que la presencia de sales puede influir en la capacidad de absorción y en el hinchamiento del material, como se vio en los capítulos previos. Por otro lado, la inmersión en PBS a 37 °C permite reproducir la temperatura corporal, variable que podría impactar en las propiedades del hidrogel. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

En la tabla 5.3 se observan los resultados obtenidos. A y B son los hidrogeles formulados a pH 4 y C, D y E los formulados a pH 3,5.

Tabla 5.3. Resultados de hinchamiento y de % de GF en hidrogeles a pH 3,5 (C, D, E) y a pH 4 (A y B).

	Hinchamiento pH 5 – 0 NaCl	Hinchamiento pH 5 – 0,15 M NaCl	Hinchamiento SF - T _{amb}	GF (%)
A	63,3 ± 1,4	70,9 ± 3,8	27,0 ± 2,3	75,1 ± 0,3
B	67,0 ± 8,3	68,8 ± 6,7	21,0 ± 1,8	75,3 ± 0,8
C	57,5 ± 3,3	55,8 ± 16,6	29,9 ± 2,1	84,8 ± 0,4
D	68,0 ± 2,2	71,6 ± 2,2	5,0 ± 2,6	80,8 ± 0,9
E	103,4 ± 2,1	106,3 ± 2,1	39,8 ± 10,0	82,1 ± 2,3

Al hinchar los hidrogeles a pH 5, no se encontraron diferencias significativas en el hinchamiento de las muestras B, C, D y E con o sin la presencia de NaCl. Sin embargo, el hidrogel A presentó un mayor hinchamiento a pH 5 en presencia de 0,15 M NaCl en comparación con 0 NaCl. Además, el hidrogel E fue el que alcanzó el mayor grado de hinchamiento, con diferencias significativas respecto al resto de las formulaciones.

En SF a temperatura ambiente, los porcentajes de hinchamiento fueron significativamente menores en comparación con los obtenidos a pH 5, destacándose las muestras C y E como las de mayor capacidad de hinchamiento. Al exponer los hidrogeles a PBS a 37 °C, se observó que las muestras formuladas a pH 4 (muestras A y B) se desintegraron por completo a las 2 horas, mientras que aquellas preparadas a pH 3,5 (muestras C, D y E) permanecieron intactas. No obstante, a las 25

horas, todas las muestras se encontraban degradadas. Este comportamiento se atribuye al efecto de la temperatura y no al medio de inmersión, dado que ninguna de las muestras presentó degradación al ser expuesta a PBS a temperatura ambiente durante 25 horas. En función de estos resultados, se concluye que los hidrogeles formulados a pH 3,5 exhiben una mayor resistencia a la degradación a temperatura corporal.

Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que demuestran la influencia de la temperatura en las interacciones entre polímeros, en particular en la formación de PECs mediante interacciones electrostáticas, lo que repercute en la estabilidad del material (Xiong et al., 2021). Asimismo, se ha reportado que el pH modula la carga de los polímeros, afectando tanto su interacción como su estabilidad estructural (Carvalho et al., 2021).

5.4.2 Interacción y entrecruzamiento en hidrogeles formulados en distintas condiciones: Evaluación de fracción de gel y potencial zeta.

Con el propósito de cuantificar la proporción de material que permanece en forma de gel, se aplicó el mismo protocolo descrito en el Capítulo 4 para la determinación de la GF. Los hidrogeles formulados a pH 3,5 presentaron valores superiores al 80 % (Tabla 5.3), mientras que aquellos preparados a pH 4 alcanzaron aproximadamente un 75 %. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los ensayos de hinchamiento, ya que los hidrogeles con un mayor grado de entrecruzamiento exhibieron una mayor resistencia a la degradación térmica en las condiciones evaluadas.

La correlación entre el grado de entrecruzamiento y la estabilidad térmica de los hidrogeles se encuentra en concordancia con estudios previos que indican que un mayor número de puntos de entrecruzamiento contribuye a la formación de una red macromolecular más densa y, por lo tanto, con una mayor estabilidad térmica (Fernández-Benito et al., 2023).

Posteriormente, se analizó el potencial zeta de las soluciones poliméricas formuladas a pH 4 y pH 3,5. El objetivo del ensayo fue dilucidar la interacción entre los polímeros en distintas condiciones de pH, concentración polimérica y presencia de NaCl. Se considera que una menor diferencia entre el potencial zeta del polianión y el polication indica una mayor neutralización de las cargas superficiales y, en consecuencia, una mayor eficiencia en la formación de interacciones electrostáticas entre las

cadena polimérica, lo que contribuye a una red más compacta y estable (Fonseca et al., 2023; Rodrigues et al., 2016).

Teniendo en cuenta los ensayos previos, se esperaba encontrar la menor diferencia de potencial en los hidrogeles formulados a pH 3,5, lo cual se confirmó en los resultados, como se ve en la Figura 5.2. En particular, las muestras C y E, correspondientes a pH 3,5, presentaron las menores diferencias de potencial, con valores de 10,9 mV y 9,1 mV, respectivamente. En contraste, los hidrogeles A, B y D mostraron valores de 19,1, 18,0 y 16,3 mV, respectivamente.

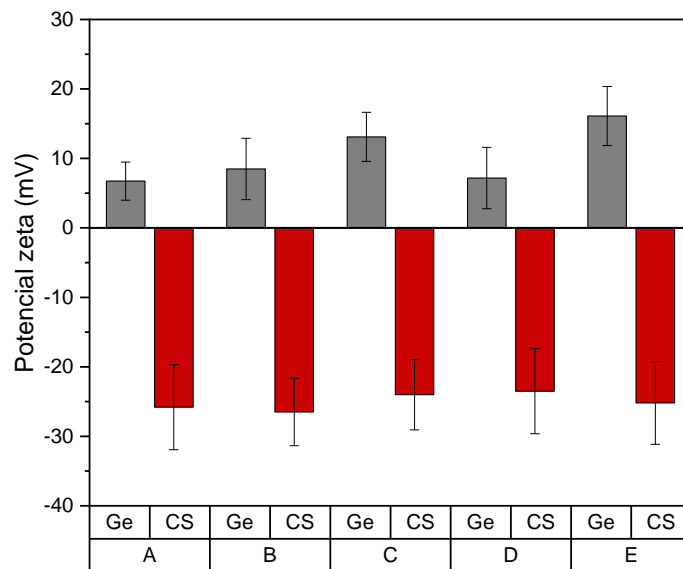


Figura 5.2. Resultados del análisis de potencial zeta en hidrogeles GCS.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de GF, lo que sugiere que el potencial zeta podría predecir indirectamente el comportamiento de los hidrogeles en términos de su entrecruzamiento. Con base en estos hallazgos y en los ensayos previos, se decidió continuar trabajando con los hidrogeles formulados a pH 3,5.

5.5 Incorporación de nanohilos de celulosa y nanopartículas de plata a los hidrogeles de gelatina y condroitín sulfato.

5.5.1 Formación y evaluación de hidrogeles de GCS compuestos con nanohilos de celulosa.

Se observó que los hidrogeles con 10% CNWs, 15 mg/ml de polímero y sin NaCl se formaron correctamente; sin embargo, presentaron exudado de CNWs. En cambio, aquellos que contenían sal en su composición no lograron formarse. Los hidrogeles formulados con 20 mg/ml de Ge y 10 mg/ml de CS sin NaCl lograron formarse, aunque resultaron frágiles y también evidenciaron exudado de CNWs. Estas concentraciones fueron seleccionadas tras evaluar diversas combinaciones y determinar las condiciones óptimas para la formulación de los apósitos.

Los ensayos de potencial zeta indicaron que la incorporación de un 10 % de CNWs en una solución con 15 mg/ml de Ge resultó en un potencial de $22,8 \pm 4,2$ mV, mientras que en presencia de CS el valor fue de $-39,4 \pm 4,7$ mV. A pesar de las variaciones en la concentración de CNWs y de su incorporación junto con ambos polímeros en solución, no fue posible obtener hidrogeles homogéneos. Este comportamiento podría atribuirse a que la composición de los hidrogeles de GCS no genera una matriz lo suficientemente densa para retener los CNWs. Además, una dispersión inadecuada de los nanohilos o interacciones débiles con los polímeros favorecerían la formación de agregados, reduciendo su incorporación efectiva en la red polimérica y evidenciando una menor compatibilidad con los polímeros (Cho et al., 2013).

Desde el punto de vista de la aplicación y evaluación de los hidrogeles mediante ensayos adicionales, se observó que, a diferencia de los geles de QP, los de GCS presentan dificultades en su manipulación y en el proceso de prensado, importante para poder adaptarlos a diferentes heridas.

5.5.2 Evaluación de la incorporación de nanopartículas de plata en los hidrogeles de GCS.

La incorporación de AgNPs en los hidrogeles de GCS tuvo como objetivo conferirles propiedades antimicrobianas. Se observó que las formulaciones con 1 % p/p de AgNPs y

concentraciones poliméricas de 15 mg/ml o 22,5 mg/ml de Ge con 7,5 mg/ml de CS lograron formarse correctamente, incluyendo aquellas que contenían 0,15 M NaCl (Figura 5.3).

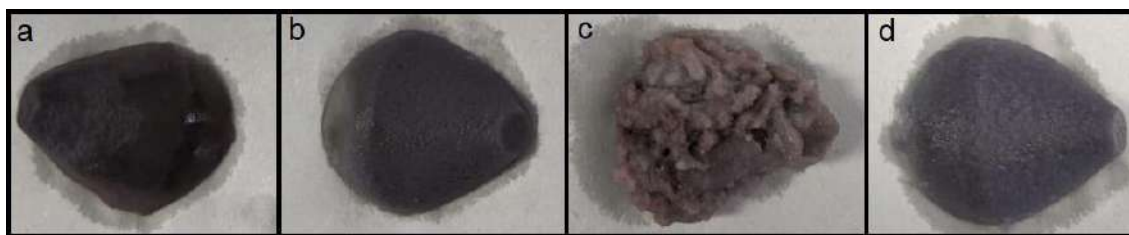


Figura 5.3. Hidrogeles compuestos con 1% p/p de AgNPs, con 15 mg/ml de concentración de Ge y CS sin NaCl (a) o con 0,15 M NaCl (b) y con el doble de Ge junto con la mitad del CS sin NaCl (c) o con 0,15 M NaCl (d).

Desde el punto de vista macroscópico, los hidrogeles que contenían sal presentaron una apariencia homogénea y una coloración más rojiza, mientras que aquellos sin NaCl mostraron un tono más grisáceo. Se ha reportado que la coloración de los hidrogeles compuestos puede variar en función de la concentración de nanopartículas, su tamaño, distribución y las interacciones con los grupos funcionales presentes en los polímeros (Verma et al., 2017; Zakia et al., 2020)

Del análisis visual posterior a la obtención de los hidrogeles, se observó que en la formulación que contenía cantidades iguales de polímeros y NaCl se produjo la separación de una fase transparente. En contraste, los demás sistemas mostraron una incorporación homogénea de las nanopartículas.

Los hidrogeles sintetizados con una concentración reducida de CS y una proporción duplicada de Ge presentaron una mayor masa final, a pesar de que la cantidad total de polímeros en la formulación se mantuvo constante. Este resultado sugiere una mayor capacidad de retención de agua en dichas muestras. Considerando esta observación y la evidencia de una adecuada incorporación de las AgNPs en todas las formulaciones, se seleccionaron para estudios posteriores los hidrogeles con una concentración de 7,5 mg/ml de CS y 22,5 mg/ml de Ge, con una incorporación de 1% p/p de AgNPs.

5.6 Microgeles de GCS.

Como se detalla en el Anexo 2, se implementó una modificación en el proceso de síntesis de los hidrogeles con el propósito de optimizar su aplicación como apósitos para heridas. Inicialmente, se

procuró obtener films, sin embargo, se determinó que la modificación del tamaño y formato del material resultaba más adecuada para esta aplicación. En consecuencia, se abandonó el proceso de compactación por centrifugación y se desarrolló un proceso para la obtención de partículas micrométricas de PECs, las cuales fueron recolectadas en forma de polvo, permitiendo su aplicación en heridas de distintas características y dimensiones.

La presentación de los hidrogeles en forma de microgeles confiere ciertas ventajas en términos de aplicación. Diversos estudios han demostrado que el empleo de microgeles acelera el proceso de cicatrización en comparación con films o andamios, debido al incremento en el área de contacto con la superficie de la herida (Emami and Ebrahimi, 2023). Además, en los últimos años se han desarrollado formulaciones de hidrogeles para el tratamiento de heridas agudas, evidenciando su capacidad para reducir el sangrado y favorecer la cicatrización (Chen et al., 2022; Li et al., 2023; Pourshahrestani et al., 2020). No obstante, hasta el momento no se han reportado antecedentes en la literatura sobre la síntesis de microgeles mediante este procedimiento y utilizando los polímeros naturales Ge y CS.

5.6.1 Modificación en la síntesis.

Con el objetivo de obtener microgeles adecuados para su aplicación en el tratamiento de heridas, se modificó el paso de centrifugación del protocolo original de síntesis, incorporando el uso de un spray dryer para realizar el proceso de secado por aspersion y obtener partículas de hidrogel. Esta modificación respondió a la necesidad de mejorar la facilidad de aplicación de los hidrogeles como apósitos, dado que los geles obtenidos mediante el protocolo previo presentaban fragilidad estructural y dificultades para su manipulación y moldeo.

Para la nueva síntesis, se emplearon los parámetros detallados en la sección 2.3.3 del Capítulo 2. Mediante este procedimiento, se obtuvo un total de 0,3 g de polvo de hidrogel, lo que representa un rendimiento parcial en comparación con la cantidad esperada de 1,5 g. A pesar de este resultado inferior a lo previsto, la viabilidad del proceso se mantiene, ya que el uso del spray dryer presenta ventajas significativas, tales como su escalabilidad, la reducción en los tiempos de síntesis y la posibilidad de trabajar con volúmenes reducidos de material.

En la Tabla 5.4 se presentan los valores de rendimiento obtenidos para las diferentes formulaciones sintetizadas mediante spray drying. En todas las muestras se empleó un pH de 3,5, con concentraciones de 22,5 mg/ml de Ge y 7,5 mg/ml de CS. Las formulaciones se identificaron con la siguiente nomenclatura:

Muestra 1: Microgel con 0 M NaCl y sin AgNPs.

Muestra 2: Microgel con 0,15 M NaCl y sin AgNPs.

Muestra 3: Microgel con 0 M NaCl y con 1% p/p de AgNPs.

Muestra 4: Microgel con 0,15 M NaCl y con 1% p/p de AgNPs.

Tabla 5.4. Comparación entre los valores de rendimiento obtenidos para las distintas muestras luego de sintetizadas por spray drying.

	1	2	3	4
Rendimiento (%)	11,3 ± 7,4	43,2 ± 8,4	11,0 ± 3,7	50,2 ± 7,1

El método de secado por aspersión depende de múltiples parámetros, entre ellos, las temperaturas de entrada y salida, la velocidad de secado y la concentración de polímeros utilizada (Dong et al., 2021). Como resultado, la eficiencia del proceso varió entre las diferentes soluciones ensayadas. Los hidrogeles que contenían NaCl en su composición presentaron porcentajes de rendimiento superiores en comparación con aquellos formulados sin NaCl. El rendimiento máximo obtenido fue del 50,2 ± 7,1 %, valor que se encuentra en el límite de los rangos esperados, dado que porcentajes superiores al 50 % indican un proceso eficiente de secado por aspersión (Tontul and Topuz, 2017).

Además de la composición de la solución, otro factor que afecta el rendimiento es la adhesión de partículas a las paredes del equipo (Lima et al., 2012). Este efecto resulta más pronunciado en sistemas con baja temperatura de transición vítrea (Tg), ya que favorece la adhesión de partículas a la cámara del equipo, reduciendo la cantidad de polvo recolectado. La utilización de equipos industriales minimiza este efecto y mejora el rendimiento. Alternativamente, el uso de ciclones con diseño

optimizado (LeClair et al., 2016) o la adición de portadores como manitol, trehalosa o sacarosa en las soluciones permite aumentar la Tg y mejorar la eficiencia del secado (Lee, 2002; Tontul & Topuz, 2017).

Otro factor crítico en el rendimiento es la concentración de soluto, la cual se ha reportado como un parámetro que incrementa la eficiencia del proceso, posiblemente debido a un aumento en la velocidad de alimentación de la solución (Prinn et al., 2002). Asimismo, las temperaturas de entrada y salida del secador influyen en el rendimiento, dependiendo de la naturaleza del material. Para materiales sensibles a la degradación, se prefieren temperaturas de salida más bajas, mientras que la temperatura de entrada está relacionada con la concentración de soluto y la velocidad de alimentación, con valores óptimos cercanos a 120 °C (LeClair et al., 2016).

El protocolo de síntesis desarrollado permitió la obtención de microgeles mediante un procedimiento sencillo, mientras que el secado por aspersión demostró ser una técnica adecuada para la producción a gran escala (Li et al., 2021). Con base en estos resultados, se llevó a cabo un estudio en el que se modificaron algunas de las variables del proceso con el objetivo de optimizar el rendimiento. Los resultados de este análisis se presentan en el Anexo 3.

En las Figuras 5.4 y 5.5 se observan los microgeles en estado seco e hidratado, respectivamente. Se evidencia una variación en el color de las muestras en función de su composición.



Figura 5.4. Microgeles de GCS.



Figura 5.5. Microgeles de GCS hidratados. De izquierda a derecha: muestra 1, 2, 3 y 4.

5.7 Análisis espectroscópico de los microgeles.

Se llevó a cabo el análisis espectroscópico para comparar los espectros obtenidos de los hidrogeles formulados en la sección 5.3 con los de los microgeles, así como para evaluar si la incorporación de AgNPs modifica las interacciones del hidrogel. Los resultados se presentan en la Figura 5.6.

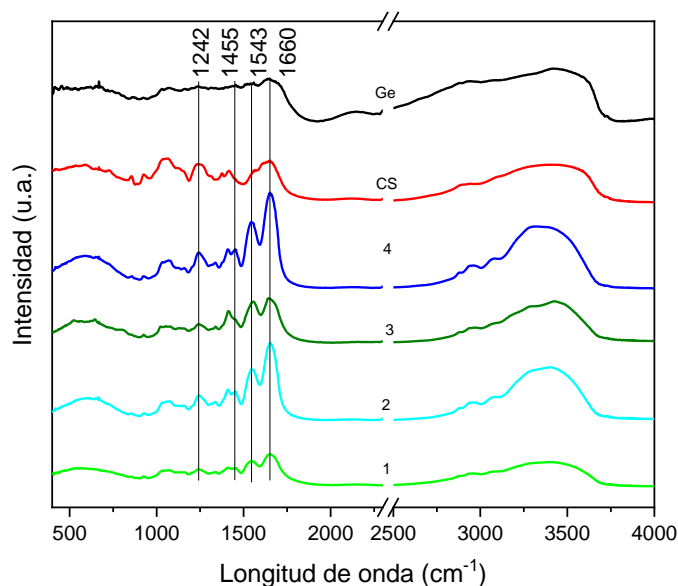


Figura 5.6. Espectros de FTIR de los polímeros Ge y CS y de los microgeles 1, 2, 3 y 4.

El espectro del CS exhibe picos característicos en distintas regiones, los mismos fueron analizados en la sección 5.2.2. Estos picos también se encuentran en los microgeles. En estos últimos,

se destaca un pico a 1543 cm^{-1} que no está presente en el espectro del CS, corresponde al grupo -NH_2 de la Ge, por lo tanto, dicho pico también se observa en el espectro de la Ge (Chaibi et al., 2015). En el CS, en la región entre $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, se observa una banda ancha que en los hidrogeles se resuelve en dos picos más definidos (1543 y 1660 cm^{-1}). Además, hay un pico en 1416 cm^{-1} que está levemente desplazado en el espectro de los microgeles. Estas diferencias probablemente correspondan a interacciones entre los grupos funcionales presentes en los microgeles. Sin embargo, la interpretación de los espectros es compleja, ya que ambos polímeros presentan bandas de absorción en regiones similares, lo que genera una superposición de picos y dificulta la asignación precisa de las señales (Gonzalez et al., 2020).

La presencia de NaCl no genera señales en el espectro de FTIR, ni se observó ausencia o desplazamiento de picos en los espectros de los hidrogeles con NaCl en su composición en comparación con aquellos sin sal. De manera similar, la adición de AgNPs no produjo diferencias notables en la aparición ni en el desplazamiento de picos en los espectros FTIR de estos geles. Esto sugiere que las AgNPs no alteran significativamente las interacciones moleculares observadas o que las modificaciones son sutiles. Resultados similares han sido reportados en estudios previos (Mourad et al., 2019; Varaprasad et al., 2011).

5.8 Evaluación de las propiedades térmicas.

El análisis de TGA se realizó sobre el polvo de los microgeles y los polímeros individuales. En todos los casos, se observó una primera etapa de pérdida de masa atribuida a la eliminación del agua residual (Panwar et al., 2023), tal como se ve en la Figura 5.7.

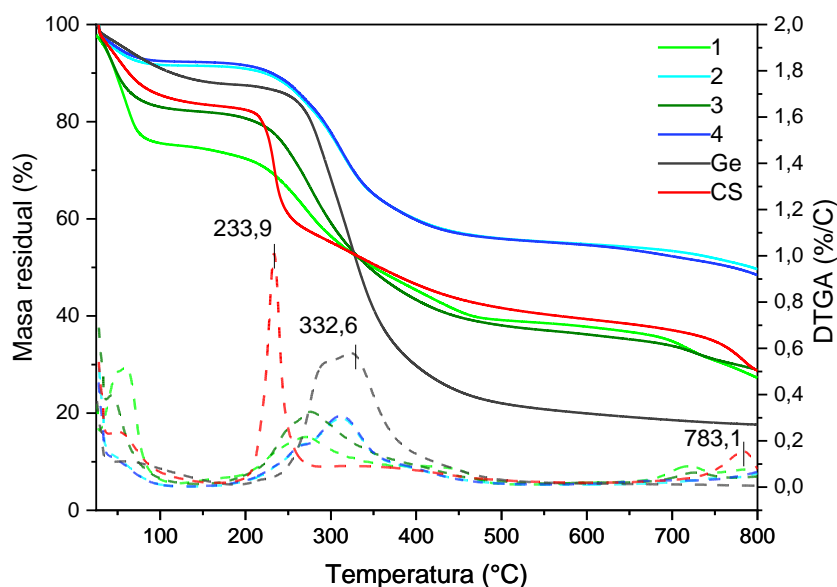


Figura 5.7. Resultado de TGA de los microgeles y de los polímeros Ge y CS, con las curvas de masa residual (líneas sólidas) y de DTGA (líneas discontinuas) en función a la temperatura.

Posteriormente, la T_{max} se registró en torno a 332,6 °C para la Ge, con un pico amplio en la curva correspondiente a la derivada de la masa residual. En el caso del CS, se observaron dos picos de degradación, el más intenso a 233,9 °C y el segundo a 783,1 °C. Para los microgeles, los valores de T_{max} se encontraron dentro del rango de temperaturas de degradación de los polímeros individuales.

Los microgeles con NaCl presentaron valores más altos de T_{max} , tanto en ausencia de AgNPs (311,0 °C frente a 271,3 °C) como en su presencia (316,7 °C frente a 280,4 °C). No obstante, las diferencias en T_{max} entre los sistemas con y sin AgNPs no resultaron significativas.

Por otro lado, el porcentaje de masa residual al finalizar el ensayo fue mayor en los microgeles con NaCl en comparación con los formulados sin sal y con los polímeros individuales. Estos resultados indican que la incorporación de NaCl mejora las propiedades térmicas de los microgeles, mientras que la adición de AgNPs no genera cambios evidentes en este aspecto.

5.9 Tamaño y morfología de las partículas de microgeles.

El tamaño y la morfología de las partículas de microgeles fueron analizados mediante SEM. En la Figura 5.8 se presentan imágenes de los hidrogeles sin NaCl ni AgNPs. En promedio, el área de cada partícula fue de $6,0 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$, con morfologías redondeadas y elipsoides.

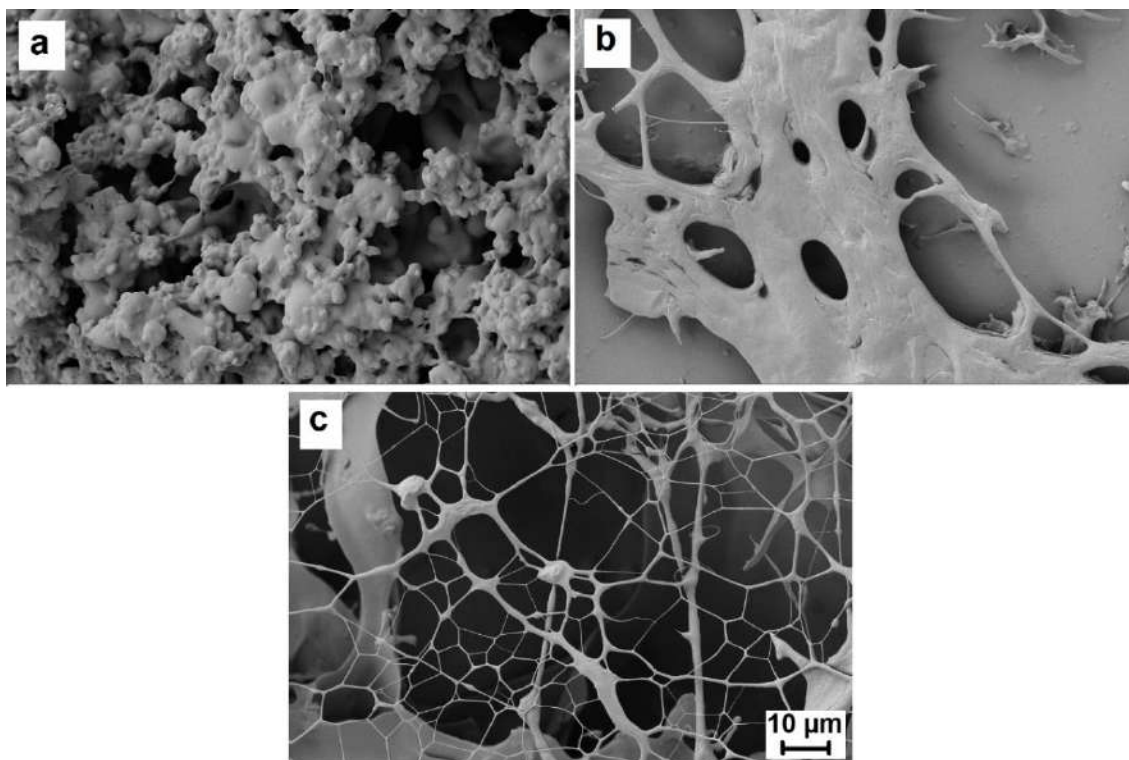


Figura 5.8. Micrografías de SEM de hidrogeles GCS sin NaCl ni AgNPs: (a) polvo liofilizado de microgeles, (b) microgeles liofilizados tras hincharse en agua destilada y (c) hidrogeles con menor concentración en agua.

Al hidratarse, estos microgeles experimentan modificaciones estructurales, formando redes y uniéndose entre sí (Figura 5.8 b y c). Este comportamiento puede estar relacionado con la teoría de formación de PECs, la cual postula que las interacciones electrostáticas entre los polielectrolitos conducen a la formación de microagregados sólidos. Estos agregados pueden luego fusionarse y generar un complejo líquido, alterando su estructura en fase líquida (Srivastava and Tirrell, 2016).

La incorporación de NaCl provocó modificaciones en el tamaño de las partículas de los microgeles, resultando en estructuras de mayor tamaño. En particular, las partículas presentaron un área promedio de $85,6 \pm 35,9 \mu\text{m}^2$, como se observa en la Figura 5.9. Además, se apreció una diferencia en el tamaño de las partículas al incorporar AgNPs, observándose un aumento exponencial en el tamaño promedio de los hidrogeles, tanto con NaCl como sin él.

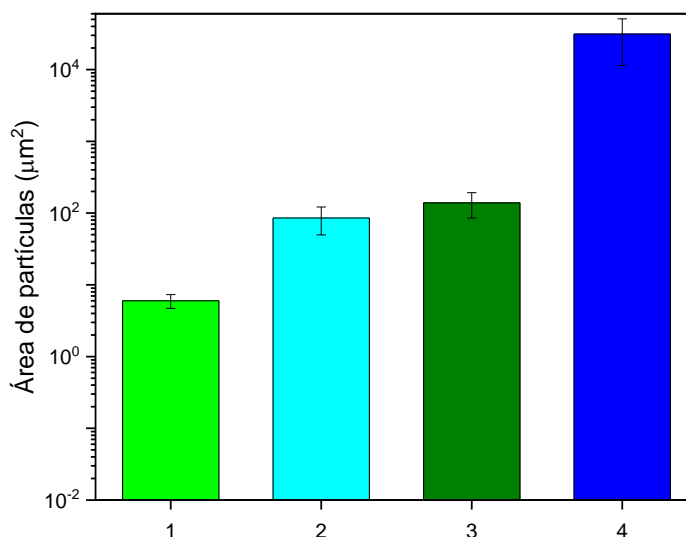


Figura 5.9. Resultado del área de las partículas de los diferentes microgeles.

Suponiendo que las partículas presentan una morfología perfectamente redondeada, los radios promedio de los microgeles fueron de 1,4 μm, 5,2 μm, 6,7 μm y 99,7 μm para las muestras 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Estos resultados evidencian que la adición de NaCl y AgNPs durante la síntesis modifica de manera notable el tamaño de las partículas obtenidas. Las diferencias en cuanto a las propiedades y caracterización de los geles estarán relacionadas con estas variaciones en el tamaño de las partículas.

Cabe señalar que el tamaño de las partículas, entre otros factores, depende de los parámetros utilizados durante el proceso de spray. Dado que se emplearon los mismos parámetros para las cuatro muestras, se concluye que la diferencia en el tamaño de las partículas está asociada a la composición específica de los microgeles.

5.10 Impacto de NaCl y AgNPs en la absorción de agua y el grado de hinchamiento de los microgeles.

Los hidrogeles desarrollados demostraron una excelente capacidad para absorber agua, con valores que variaron entre un 200% y un 800% de absorción. La Ge, utilizada como control, presentó la mayor capacidad de absorción, lo cual era esperado debido a sus características conocidas de alta

absorción de agua (Lv et al., 2022). Este resultado resalta la efectividad de los hidrogeles en términos de capacidad de hinchamiento, un factor clave en la aplicación de estos materiales, especialmente en contextos biomédicos (Vo et al., 2022). Los valores de absorción fueron comparables entre la Ge sola y el hidrogel sin NaCl ni AgNPs (muestra 1), tal como se observa en la Figura 5.10.

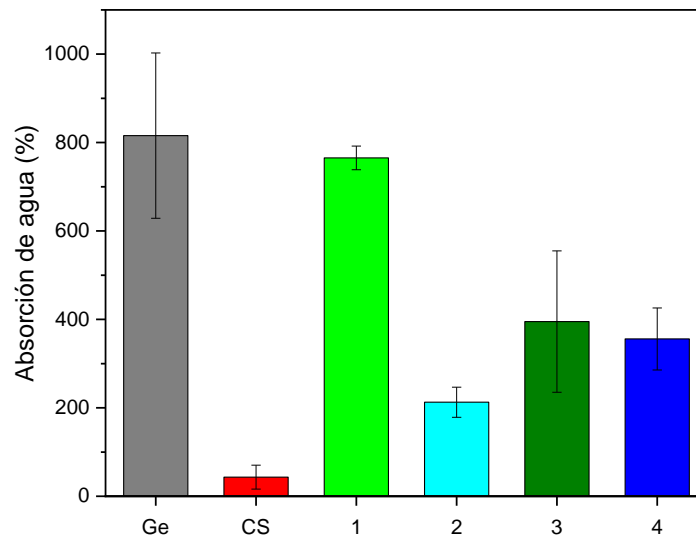


Figura 5.10. Resultados de porcentaje de absorción de agua para los microgeles (1,2,3 y 4) y los polímeros solos (Ge y CS).

En particular, el CS mostró una absorción de agua inferior al 50%, lo que se atribuye a su alta solubilidad y justifica su uso en combinación con otros polímeros para mejorar la estabilidad (Fajardo et al., 2012).

La adición de NaCl (muestra 2) resultó en una ligera disminución en la absorción de agua, lo que es consistente con la literatura. Se ha demostrado que los iones Na^+ y Cl^- pueden alterar la estructura de las cadenas poliméricas, neutralizando los grupos funcionales cargados y reduciendo la afinidad del hidrogel por el agua (Costa et al., 2015).

En cuanto a la incorporación de AgNPs, se podría esperar que las nanopartículas agranden las redes poliméricas y que su carga superficial aumente la afinidad del hidrogel por el agua, mejorando así su capacidad de hinchamiento y absorción de agua (Ahmed and Aggor, 2010). Sin embargo, no siempre se observa este comportamiento, ya que las AgNPs pueden no tener un efecto significativo en la capacidad de absorción de agua del hidrogel (Yu et al., 2007). En este estudio, se observó que

el hidrogel sin sal presentó una disminución en la capacidad de absorción de agua (muestra 3). Sin embargo, la combinación de AgNPs y NaCl (muestra 4) mostró un aumento en la absorción de agua en comparación con la muestra 2, que contenía NaCl sin AgNPs, sugiriendo que las AgNPs podrían influir en esta propiedad y mejorar la retención de agua bajo ciertas condiciones.

Para evaluar si estos resultados coinciden con lo observado al dejar hinchar las muestras durante distintos tiempos en SF a 37 °C (simulando condiciones corporales), se realizaron ensayos de hinchamiento. Como era esperable y en concordancia con el ensayo anterior, la Ge presentó valores de hinchamiento mayores en comparación con las demás muestras. Además, se observaron variaciones en el grado de hinchamiento con el paso del tiempo, alcanzándose los valores más altos a los 15 minutos de exposición. Estos resultados se presentan en la Figura 5.11.

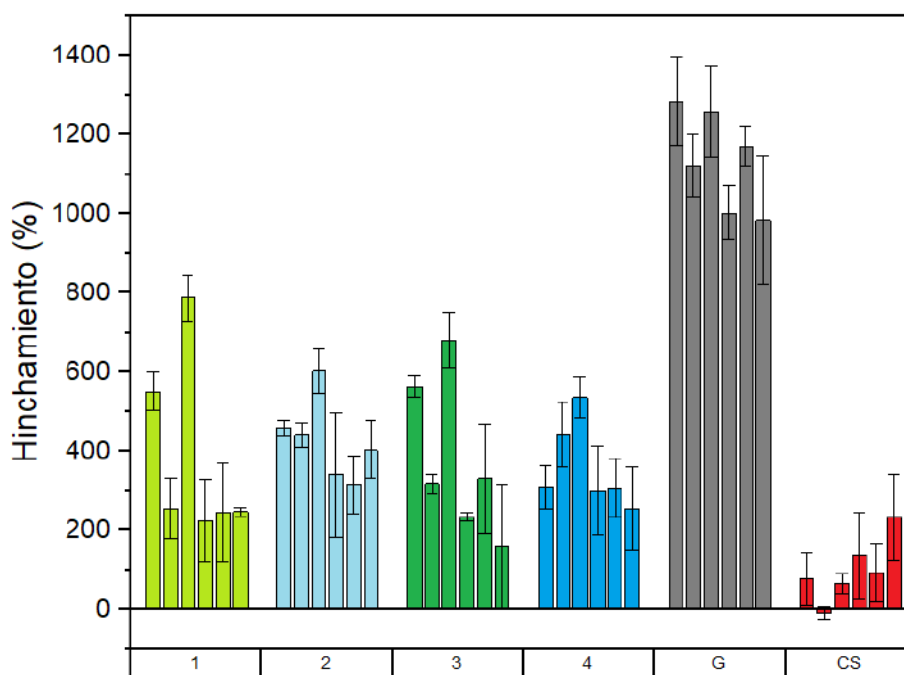


Figura 5.11. Porcentaje de hinchamiento obtenido para los hidrogeles y los polímeros a los distintos tiempos: 1, 6, 15, 30, 60 y 120 (de izquierda a derecha).

No se observó un hinchamiento apreciable en el CS, lo que coincide con su baja capacidad de absorción previamente reportada. En cuanto a los microgeles, luego de 2 horas de estudio, los valores más altos de hinchamiento se registraron en la muestra 2, que contiene NaCl en su composición, alcanzando un valor cercano al 400%. Sin embargo, en los tiempos iniciales, las muestras 1 y 3 (sin NaCl) presentaron diferencias significativas respecto a las muestras 2 y 4, con un mayor grado de hinchamiento, que osciló entre un 500% y un 600% aproximadamente. Se observó además que el

grado de hinchamiento varió en función del tiempo de exposición, con valores máximos a los 15 minutos.

En lo que respecta a la incorporación de AgNPs, los resultados indicaron que los valores de hinchamiento fueron comparables a los obtenidos en las muestras sin nanopartículas. Esto sugiere que la presencia de AgNPs no afecta significativamente el comportamiento de hinchamiento en las condiciones evaluadas.

5.11 Estabilidad de los microgeles.

Con base en el ensayo previo, en el cual el hinchamiento de los materiales arrojó valores superiores para la Ge en comparación con los hidrogeles, se procedió a evaluar su comportamiento a temperatura fisiológica (37 °C). Dado que el hidrogel se encuentra entrecruzado con CS, se espera que su degradación sea más lenta en comparación con la Ge sin modificar.

Los resultados obtenidos indicaron que la Ge se desintegró casi de manera instantánea, mientras que el hidrogel requirió más de una hora para desintegrarse por completo. En la Figura 5.12 se presentan los hidrogeles tras 10 segundos de exposición en el ensayo.



Figura 5.12. Desintegración del hidrogel de Ge solo (a) en comparación con la desintegración parcial del hidrogel de GCS(b) luego de 10 segundos de colocados en agua destilada a 37 °C.

Estos resultados evidencian la ventaja de emplear el hidrogel entrecruzado en lugar de la Ge sola, ya que su estabilidad y duración son superiores. En términos de aplicación, se prevé que los microgeles permanezcan en la herida durante el tiempo necesario para la coagulación sanguínea y el

control de la hemorragia. Ensayos *in vitro* realizados con sangre entera determinaron que este proceso suele completarse entre 5 y 7 minutos bajo condiciones normales (Gaharwar et al., 2014; Peng et al., 2021).

5.12 Ensayos biológicos.

5.12.1 Ensayos antimicrobianos.

El ensayo se llevó a cabo conforme al protocolo descrito en el Capítulo 2. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Medidas del halo de inhibición (mm) contra *E. coli* y *S. aureus* luego de 24 horas de incubación.

	Sin AgNPs (mm)		Con 1% AgNPs (mm)	
	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	18,3 ± 7,6*	13,3 ± 2,9	43,3 ± 11,5	38,3 ± 2,9
<i>S. aureus</i>	10,7 ± 1,1	9 ± 8,5**	48,3 ± 2,9	40,3 ± 0,6

*No se observa halo definido, pseudohalo (es decir que se ralentizó el crecimiento bacteriano). **Una de las réplicas no presentó halo.

La adición de AgNPs incrementó la actividad antimicrobiana de los geles, observándose valores comparables tanto para *E. coli* como para *S. aureus*. Estos resultados eran esperables por la actividad antimicrobiana de las AgNPs, que fue mencionada en el Capítulo 4, sección 4.2.

5.12.2 Hemólisis como prueba clave para la aplicación de los microgeles en heridas agudas.

El ensayo de hemólisis se realizó con el propósito de evaluar la interacción de los materiales con los glóbulos rojos. Tras el cultivo y la centrifugación, el sobrenadante de las muestras se observa en la Figura 5.13, donde las diferencias entre las formulaciones con y sin AgNPs son evidentes.

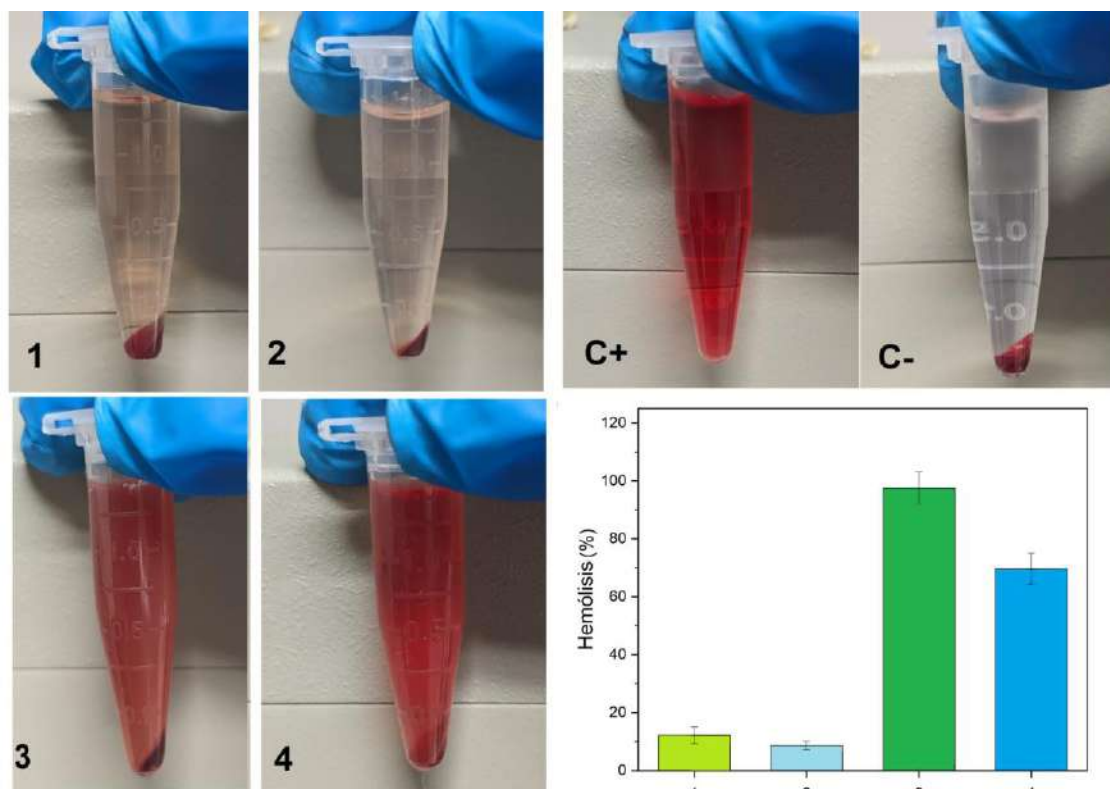


Figura 5.13. Resultados de las pruebas hemolíticas de las cuatro muestras y los controles (positivos y negativos) y porcentaje de hemólisis de todas las muestras, notándose una diferencia significativa entre muestras con o sin AgNPs y con la adición de NaCl.

En el caso de concentraciones elevadas de microgeles, se observó una mayor absorción de la solución de glóbulos rojos, lo que se detalla en el Anexo 4. Este comportamiento sugiere que los microgeles pueden interactuar con los eritrocitos y formar geles in situ, lo que resulta de interés para aplicaciones en el control del sangrado, como se discute en mayor profundidad en el Anexo 4.

Los resultados indicaron diferencias significativas en los porcentajes de hemólisis entre las muestras con AgNPs y aquellas sin nanopartículas. Las primeras presentaron valores superiores al 50%. A pesar de que los microgeles con AgNPs mostraron una mayor eficacia antibacteriana y propiedades favorables de absorción de agua e hinchamiento, su aplicación en heridas agudas podría verse limitada por el incremento en la hemólisis. En este sentido, futuras investigaciones podrían explorar formulaciones con concentraciones reducidas de AgNPs o evaluar el impacto de otros agentes antimicrobianos sobre la viabilidad de los glóbulos rojos.

Según la norma ASTM F756-00 (ASTM International, 2000), los materiales con un porcentaje de hemólisis superior al 5% se consideran hemolíticos. Todas las muestras analizadas presentaron algún grado de hemólisis. No obstante, la adición de NaCl redujo los valores promedio de hemólisis en

los microgeles ($8,6 \pm 1,4$ % con NaCl frente a $12,2 \pm 2,9$ % sin NaCl), con una disminución aún más pronunciada en las formulaciones con AgNPs. Asimismo, los microgeles con NaCl mostraron un mejor rendimiento general. En función de estos resultados, la formulación óptima para el manejo de heridas incluiría GCS y NaCl 0,15 M, acompañado de un agente antibacteriano cuya incorporación no incremente significativamente el porcentaje de hemólisis.

5.13 Conclusiones del capítulo.

Se formularon y seleccionaron para su caracterización los hidrogeles sintetizados a pH 4 con concentraciones de polímeros de 10 o 15 mg/ml y sin NaCl. Asimismo, se eligieron los hidrogeles formulados a pH 3,5 con 15 mg/ml de polímeros con y sin 0,15 M NaCl, y aquellos a pH 3,5 con 10 mg/ml de Ge y 20 mg/ml de CS, sin NaCl. Al evaluar el comportamiento en PBS a 37 °C, los hidrogeles formulados a pH 4 se degradaron completamente tras 2 horas de incubación, además su hinchamiento a T_{amb} fue menor en comparación con los formulados a pH 3,5 y la diferencia de potencial zeta entre las soluciones poliméricas fue mayor. Considerando estos resultados, se decidió continuar la caracterización con las formulaciones a pH 3,5. Se evaluó la incorporación de refuerzos, pero no fue posible incorporar CNWs a los hidrogeles; sin embargo, se logró integrar exitosamente AgNPs al 1% p/p.

La modificación del método de síntesis hacia la obtención de microgeles, mediante secado por aspersión en lugar de centrifugación, resultó exitosa. El rendimiento fue superior en los microgeles que contenían NaCl. Los espectros obtenidos mostraron la presencia de los grupos carboxilo y amino, característicos de los polímeros utilizados y de los microgeles. Las propiedades térmicas de los microgeles mejoraron con la adición de NaCl, mientras que la incorporación de AgNPs no generó variaciones significativas.

En los análisis de microscopía, se evidenciaron cambios estructurales al hidratar el polvo de los microgeles, observándose además que el tamaño de las partículas varía en función de la formulación empleada. Los ensayos de absorción de agua e hinchamiento permitieron prever el comportamiento de los microgeles al ser aplicados; el mayor hinchamiento se registró a los 15 minutos de exposición. Para diferenciar los microgeles de los polímeros individuales y analizar el efecto de su

interacción, se realizó un ensayo de degradación. A diferencia de la Ge sola, la degradación del microgel se produjo varias horas después, indicando una mayor estabilidad estructural.

En los ensayos biológicos, los microgeles demostraron actividad antimicrobiana al incorporar AgNPs. Sin embargo, el porcentaje de hemólisis fue significativamente mayor en presencia de las nanopartículas, superando los límites recomendados. Por lo tanto, para la aplicación prevista, resulta más conveniente considerar el uso de microgeles sin AgNPs. Asimismo, sería pertinente ajustar ciertos parámetros del proceso de secado por aspersion para optimizar el rendimiento.

6 CONCLUSIONES GENERALES.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal el desarrollo de PECs con potencial aplicación en apósitos para heridas. A lo largo del estudio, se lograron formular con éxito CoPECs utilizando Q y P, tras evaluar diferentes combinaciones de concentración de polímeros, pH de formulación y concentración de NaCl. La selección de las formulaciones más adecuadas se llevó a cabo mediante la caracterización integral de los hidrogeles obtenidos, analizando su morfología a nivel macroscópico y microscópico, su capacidad de hinchamiento, sus propiedades térmicas, mecánicas y fisicoquímicas. Además, la adición de NaCl permitió la obtención de materiales saloplásticos, evidenciándose modificaciones en la morfología y en las propiedades térmicas de los hidrogeles.

Posteriormente, se incorporaron diferentes componentes con el propósito de optimizar sus propiedades, incluyendo LD como compuesto activo, AgNPs y CNWs como refuerzos. Estos componentes fueron incorporados de manera individual en formulaciones específicas para evaluar su impacto en las propiedades de los hidrogeles. Los ensayos de liberación confirmaron la capacidad de los hidrogeles para vehicular LD, mientras que la incorporación de CNWs permitió determinar el porcentaje óptimo de adición. Sin embargo, los hidrogeles con AgNPs no mostraron un aumento significativo en su actividad antimicrobiana, por lo que no se continuó con su investigación.

Se realizaron ensayos de GF y WVTR, ambos relevantes para la aplicación en apósitos. A partir del WVTR, se estableció que los hidrogeles presentaban propiedades adecuadas para su uso en el tratamiento de quemaduras de primer grado. Además, los ensayos de biocompatibilidad celular evidenciaron que la presencia de NaCl disminuye la viabilidad celular, mientras que la adición de LD o CNWs al 10% mejora significativamente esta propiedad en los hidrogeles con sal. La incorporación de CNWs no afectó la actividad antimicrobiana de los hidrogeles, observándose actividad en todas las formulaciones. En cuanto a la degradación en condiciones fisiológicas, los hidrogeles perdieron más del 10 % de su masa en el primer día, alcanzando valores inferiores al 40 % tras 21 días de incubación. Este proceso de degradación resulta favorable para su aplicación en apósitos, ya que acompaña la progresión natural del proceso de cicatrización.

En colaboración con estudiantes de la UBA, se estableció que la forma más adecuada de aplicación de estos hidrogeles es en formato de parches, en un empaque cerrado con SF para hidratación inmediata al momento de su uso. Se llevaron a cabo estudios de estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento, determinándose que los hidrogeles conservaron sus propiedades

mecánicas y estructurales sin alteraciones significativas durante 60 días. Sin embargo, posteriormente se observó una disminución progresiva en el módulo de compresión, indicando una leve pérdida de resistencia mecánica. A pesar de ello, la microestructura y la morfología se mantuvieron estables. La degradabilidad de los hidrogeles en SF a 37 °C confirmó su idoneidad para aplicaciones biomédicas, con una tasa de degradación que se aceleró en presencia de NaCl.

Además de los hidrogeles desarrollados a partir de Q y P, se sintetizaron CoPECs de Ge y CS, a los que también se adicionó NaCl para la obtención de materiales saloplásticos. Sin embargo, estos hidrogeles presentaron diferencias estructurales significativas, siendo altamente frágiles y de difícil manipulación tras su compactación. A pesar de esta limitación, se realizaron estudios de caracterización mediante ensayos de hinchamiento, potencial zeta y GF, entre otros. La incorporación de CNWs a estos hidrogeles no permitió obtener una formulación homogénea, mientras que la adición de AgNPs se llevó a cabo con éxito, logrando una dispersión homogénea en la matriz polimérica, de manera tal que queden al 1% p/p de nanopartículas.

Dado que los hidrogeles de GCS compactados no pudieron ser moldeados para su aplicación final, se optimizó el método de síntesis para obtener microgeles mediante secado por aspersión (spray dryer) en lugar de centrifugación. Utilizando parámetros previamente determinados como óptimos, se formularon microgeles en polvo, cuya aplicación está dirigida al tratamiento de heridas agudas con necesidad de control rápido del sangrado. Este enfoque permitió desarrollar un método de síntesis simple y escalable.

Los microgeles obtenidos fueron caracterizados en profundidad. Las imágenes obtenidas por SEM revelaron la formación de redes tridimensionales tras su hidratación. Los estudios de absorción de agua e hinchamiento en condiciones fisiológicas mostraron que el mayor hinchamiento ocurre a los 15 minutos. Los ensayos de actividad antimicrobiana evidenciaron un incremento significativo en la actividad bactericida con la incorporación de AgNPs. Sin embargo, los ensayos de hemólisis demostraron un aumento en la destrucción de eritrocitos en presencia de nanopartículas, aunque este efecto se vio atenuado en formulaciones que contenían NaCl. Asimismo, la síntesis de microgeles con NaCl presentó un mayor rendimiento en comparación con aquellas sin sal.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo permitieron la redacción de cuatro artículos científicos, con perspectivas de una publicación adicional en el futuro.

6.1 Trabajos futuros.

En relación con los hidrogeles de QP, resulta relevante optimizar el proceso de síntesis para hacerlo rentable y escalable, dado que la utilización de la centrifuga para su compactación representa una limitación en este aspecto. Además, sería pertinente realizar un mayor número de ensayos *in vivo* en modelos de heridas por quemaduras, tanto en animales como en humanos, con el objetivo de evaluar su desempeño en condiciones clínicas. Asimismo, se considera de interés profundizar en el estudio de la cinética de liberación de otros fármacos a partir de estos hidrogeles.

Por otro lado, en lo que respecta a los microgeles de GCS, sería conveniente evaluar su síntesis a gran escala y determinar si el empleo de equipos de mayor tamaño influye en el rendimiento de la reacción. Asimismo, resulta relevante modificar los parámetros del spray dryer para analizar su impacto en la cantidad de microgeles obtenidos. La realización de ensayos *in vitro* adicionales, incluyendo pruebas con cultivos celulares, permitiría obtener una caracterización más completa de la biocompatibilidad y funcionalidad de los microgeles. Finalmente, los ensayos *in vivo* en modelos animales y en humanos serían fundamentales para validar su aplicación en el tratamiento de heridas.

7 ANEXOS

ANEXO 1: Citotoxicidad celular.

1.1 Evaluación del método de los estudios de citotoxicidad.

1.1.1 Primer ensayo de citotoxicidad.

El primer ensayo realizado para evaluar el efecto citotóxico de los hidrogeles consistió en un cultivo celular utilizando una línea celular de fibroblastos humanos (MRC-5). Se empleó el método de citotoxicidad directa según la norma ISO 10993-5 (International Organization for Standardization, 2009), poniendo en contacto los hidrogeles con la monocapa celular. Para ello, se cultivaron 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos.

Como control positivo se utilizó la adición de células sin hidrogeles, mientras que como control negativo se utilizaron los pocillos sin células. Se analizaron un total de 8 muestras diferentes: QP-0, QP-0-10%CNWs, QP-0-20%CNWs, QP-0-LD, QP-0,15, QP-0,15-10%CNWs, QP-0,15-20%CNWs y QP-0,15-LD. De cada muestra se realizaron 8 réplicas. Los hidrogeles fueron previamente prensados, cortados en círculos de 4 mm de diámetro, liofilizados y esterilizados por irradiación ultravioleta durante 15 minutos de cada lado. Antes de la incorporación de los hidrogeles en el cultivo celular, estos fueron hinchados en PBS estéril durante aproximadamente 15 minutos.

Una vez cultivadas las células, estas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas, hasta observarse la formación de una monocapa celular. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por uno nuevo y se agregaron los hidrogeles previamente esterilizados e hinchados. Se mantuvo la incubación durante 24 horas en las mismas condiciones iniciales. Posteriormente, se retiraron los hidrogeles y se realizó el ensayo de determinación de reducción metabólica mediante el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Después de dos horas de incubación con el reactivo, se desechó el MTT y se añadió dimetilsulfóxido para solubilizar los cristales formados. La absorbancia

de cada pocillo fue medida y, a partir de estos valores, se calculó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la Ecuación 2.13.

Los resultados obtenidos mostraron valores promedio de viabilidad menores al 80 %, lo que indica que los hidrogeles evaluados presentan algún grado de citotoxicidad. Sin embargo, este resultado puede estar asociado con las condiciones del ensayo, ya que es posible que la cantidad de células sembradas no haya sido suficiente en relación con el tamaño y peso de los hidrogeles utilizados. Además, es relevante considerar que el método de MTT podría no haber sido el más adecuado para esta evaluación específica. En función de estos aspectos, se optó por realizar una evaluación adicional para verificar si existían variaciones en los valores de viabilidad celular utilizando los hidrogeles en diferentes tamaños de placas.

1.1.2 Determinación del tamaño de placas adecuado.

En este segundo ensayo, se emplearon los mismos parámetros utilizados en el ensayo anterior. La concentración celular fue de 1×10^6 células por pocillo en placa de 96 pocillos, 3×10^6 células en placa de 48 pocillos y 6×10^6 células en placa de 24 pocillos. Después de la formación de la monocapa celular, se incorporaron los hidrogeles. Como en el ensayo anterior, se consideró como control positivo la monocapa sin los hidrogeles y como control negativo los pocillos sin células. La viabilidad celular fue medida 24 horas después de la incubación utilizando el protocolo de MTT. Los hidrogeles fueron retirados antes de la adición del reactivo.

Se observó que a medida que aumentaba el área del pocillo, también lo hacía la viabilidad celular. Sin embargo, todas las muestras mostraron signos de citotoxicidad. La relación óptima entre el área del hidrogel y el área del pocillo es 1:10 (Słota et al., 2021), lo que motivó el cálculo de esta relación, como se muestra en la Tabla A1.1. Es importante señalar que tanto la cara inferior como la superior del hidrogel están en contacto con el medio debido a la tridimensionalidad del mismo. Con base en estos resultados, se decidió continuar utilizando la placa de 24 pocillos con hidrogeles de 4 mm de diámetro.

Tabla A1.1. Resultados de la relación entre el área del hidrogel y área del pocillo y de viabilidad celular en placas con pocillos de distintos tamaños, colocando discos de hidrogeles de 4 mm de diámetro o medio disco.

Pocillos	Área del pocillo (cm ²)	Área hidrogel/área pocillo	Viabilidad (%)	
			QP-0	QP-0,15
96	0,32	0,75	39,4	24,4
48	1,10	0,22	41,6	28
24	1,90	0,13	59,5	46,8
24 - Medio hidrogel	1,90	0,06	62,9	60,2

Se optó por repetir el ensayo, variando el área de los hidrogeles en relación con el área de la monocapa celular. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento en placas de 24 y 48 pocillos. En la placa de 24 pocillos, además, se incorporaron hidrogeles cortados a la mitad para reducir aún más su área. La viabilidad celular obtenida se observa en la tabla A1.1.

Los resultados obtenidos indicaron que, al reducir el área del hidrogel en relación con el área del pocillo, se lograron valores de viabilidad celular mayores. Esto sugiere que la relación entre el área del hidrogel y el área del pocillo es un factor importante a tener en cuenta en estos estudios.

1.1.3 Método de medición de viabilidad: MTT o resazurina.

Para determinar si la elección del método de medición podría estar afectando los resultados obtenidos, se compararon el método de MTT con el de resazurina. En este caso, debido a cuestiones de disponibilidad, se utilizaron células de fibroblastos de ratón N38.

Los resultados mostraron que la prueba de resazurina presentó menor desviación entre réplicas en los grupos de control. Además, este método evita el uso de solventes adicionales que podrían interferir con la estructura del hidrogel. Por otro lado, el promedio de viabilidad entre el control positivo (células sin hidrogel) y el control negativo (pocillos sin células) fue superior utilizando resazurina en comparación con MTT.

En base a estos resultados, se decidió continuar con las pruebas utilizando resazurina. Además, se evaluó la forma de lectura de las placas, comparando la lectura desde arriba y desde

abajo. Se observó que había menor desviación al realizar la lectura desde arriba, por lo que se adoptó este enfoque de manera continua.

En conclusión, los ensayos preliminares permitieron optimizar el procedimiento para evaluar la citotoxicidad de los hidrogeles. Se determinó que la relación entre el área del pocillo y el hidrogel en contacto con la monocapa celular es un factor crítico. Por lo tanto, se decidió utilizar placas de 24 pocillos con la concentración celular inicial recomendada para este tipo de placas, y se continuó utilizando resazurina para la medición de viabilidad, con la lectura de las placas desde arriba.

ANEXO 2: Modificación en la síntesis de hidrogeles CoPECs de GCS a microgeles.

Debido a la forma en que se obtienen los CoPECs, estos adoptan la forma de la base del tubo de centrífuga. Dado que los mismos son frágiles, al someterlos a compresión para modificar su forma, tienden a romperse o, si no se rompen, regresan a su forma original. Por esta razón, no es posible realizar ensayos de compresión ni de WVTR, ya que no se obtiene una forma geométrica homogénea. Además, se considera más favorable que los hidrogeles presenten una morfología distinta para su aplicación en apósitos.

Con el objetivo de modificar la morfología de los hidrogeles, se realizaron pruebas adicionales. La formulación inicial de los hidrogeles se mantuvo, pero antes de centrifugar, el contenido se dividió en frascos que fueron llevados a la heladera o a temperatura ambiente, con el fin de evaluar si el hidrogel precipita de forma natural sin necesidad de centrifugación. No se observaron diferencias a nivel macroscópico entre ambos frascos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se dejó el precipitado en una placa de Petri durante 24 horas a temperatura ambiente para su secado. Como resultado, se formó un film que no se rompió fácilmente ni se quebró (Figura A2.1 a). Sin embargo, al agregar agua destilada, después de 20 minutos, el hidrogel se hinchó, pero se desarmó, lo que sugiere que no se había compactado correctamente.

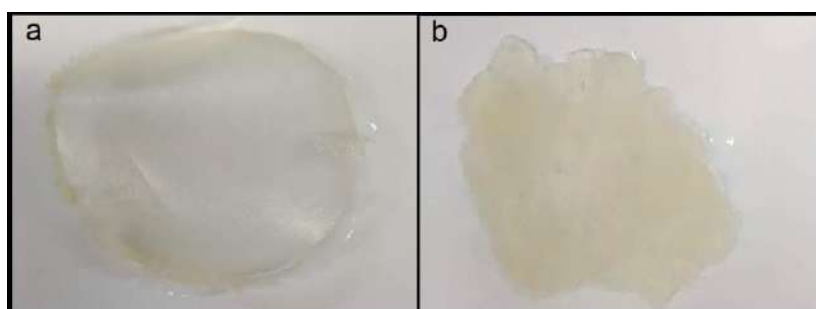


Figura A2.1. Aspecto macroscópico de los hidrogeles mediante distintas técnicas de formación. Sin centrifugar, habiendo dejado secar el gel 24 horas a temperatura ambiente (a) o centrifugado, comprimido y luego de 24 horas en heladera (b).

Además, se realizó una prueba consistente en centrifugar la muestra a distintas velocidades y tiempos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1500 rpm x 5' → No hubo diferencia
- 3000 rpm x 10' → No hubo diferencia
- 6500 rpm x 5' → No hubo diferencia
- 8500 rpm x 5' → No hubo diferencia

Posteriormente, se almacenó el precipitado en la heladera para que adquiriera mayor consistencia, se eliminó el agua restante y se comprimió con la base de un vaso. Finalmente, el hidrogel se desarmó (Figura A2.1b).

Ante estos resultados, se decidió modificar el proceso de síntesis para obtener microgeles de GCS en lugar de los CoPECs originales.

ANEXO 3: Secado por aspersión.

3.1 Modificación de parámetros del spray dryer y su influencia en el rendimiento.

3.1.1 Muestra más diluida.

Con el fin de evaluar el impacto de la concentración de los polímeros en la solución, se preparó nuevamente la síntesis utilizando concentraciones menores de polímeros. En lugar de 22,5 mg/ml de Ge, se utilizó 2,25 mg/ml. La solución de CS también se redujo en un factor de 10.

El rendimiento obtenido en esta condición fue del 10,4%, sin que se observaran mejoras respecto a la muestra más concentrada (11,3%) al preparar 100 ml de solución. No obstante, la muestra no se adhirió al tubo como sucedió con la muestra más concentrada y, además, las partículas de polvo obtenidas mostraron un tamaño más homogéneo a nivel macroscópico. Aunque algo de muestra permaneció adherida a la cámara, la cantidad fue menor que en el caso de la muestra más concentrada. Este factor resulta determinante en el rendimiento cuando se utiliza Ge, como se indicó en estudios previos (Kanwate et al., 2019). Por lo tanto, se decidió realizar nuevas pruebas utilizando la muestra diluida.

3.1.2 Variación en la cantidad inicial de solución.

Al preparar 200 ml de solución en lugar de 100 ml, se observó un aumento en el rendimiento, alcanzando un 50,9%, sin modificar el resto de los parámetros.

Para ver si esto se ve modificado con la variación en las temperaturas iniciales se decidió probar utilizando también 200 ml pero variando las temperaturas de entrada.

3.1.3 Variación en las temperaturas iniciales.

Según los resultados obtenidos mediante TGA, tanto los polímeros como los microgeles no presentan degradación a temperaturas inferiores a 233°C, por lo que se consideró seguro modificar la temperatura inicial para evaluar su impacto en el rendimiento. Se probaron distintas temperaturas iniciales, obteniendo los siguientes resultados:

- Temperatura inicial de 160 °C: rendimiento de 36,7 %.
- Temperatura inicial de 80 °C: rendimiento de 29,9 %.
- Temperatura inicial de 120 °C: rendimiento de 50,9 %.

En conclusión, se continuará utilizando la temperatura inicial de 120 °C en muestras diluidas y con 200 ml mínimo.

ANEXO 4: Interacción microgeles- glóbulos rojos.

Al realizar el mismo procedimiento utilizado en el ensayo de hemólisis, pero empleando una mayor concentración de partículas de microgeles, se observó la formación de tapones, con los glóbulos rojos retenidos en el gel formado in situ (Figura A4.1).

Esta capacidad de absorción de los microgeles, así como su interacción con los glóbulos rojos para formar geles in situ, se considera una propiedad positiva, dado que el objetivo es que estos hidrogeles sirvan para frenar el sangrado. De todas formas, serían necesarios otros estudios para confirmar esto. Se planea realizar a futuro ensayos de tiempo de coagulación utilizando sangre entera, así como estudios *in vivo* para evaluar si los microgeles realmente cumplen con este propósito.

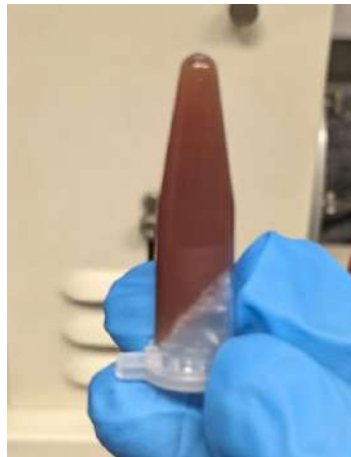


Figura A4.1. Microgel GCS hinchado con sangre.

8 REFERENCIAS.

- Abou-Okeil, A., Rehan, M., El-Sawy, S.M., El-bisi, M.K., Ahmed-Farid, O.A., Abdel-Mohdy, F.A., 2018. Lidocaine/ β -cyclodextrin inclusion complex as drug delivery system. *European Polymer Journal* 108, 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.09.016>
- Ahmed, E.M., Aggor, F.S., 2010. Swelling kinetic study and characterization of crosslinked hydrogels containing silver nanoparticles. *J of Applied Polymer Sci* 117, 2168–2174. <https://doi.org/10.1002/app.31934>
- Akhtar, M.F., Hanif, M., Ranjha, N.M., 2016. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 24, 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.022>
- Alex, M., Alsawaftah, N.M., Hussein, G.A., 2024. State-of-Art and Prospective Hydrogel-Based Transdermal Drug Delivery Systems. *Applied Sciences* 14, 2926. <https://doi.org/10.3390/app14072926>
- Alizadeh, M., Abbasi, F., Khoshfetrat, A.B., Ghaleh, H., 2013. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Materials Science and Engineering: C* 33, 3958–3967. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.039>
- Alsakhawy, M.A., Abdelmonsif, D.A., Haroun, M., Sabra, S.A., 2022. Naringin-loaded Arabic gum/pectin hydrogel as a potential wound healing material. *International Journal of Biological Macromolecules* 222, 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.200>
- Altam, A., Zhu, L., Huang, W., Huang, H., Yang, S., 2021. Polyelectrolyte complex beads of carboxymethylcellulose and chitosan: The controlled formation and improved properties. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2, 100100. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100100>
- Ambrožová, N., Zálešák, B., Ulrichová, J., Čížková, K., Galandáková, A., 2017. Low concentrations of silver nanoparticles have a beneficial effect on wound healing in vitro. *J Nanopart Res* 19, 108. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3809-7>
- Amirian, J., Zeng, Y., Shekh, M.I., Sharma, G., Stadler, F.J., Song, J., Du, B., Zhu, Y., 2021. In-situ crosslinked hydrogel based on amidated pectin/oxidized chitosan as potential wound dressing for skin repairing. *Carbohydrate Polymers* 251, 117005. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117005>

- Anitua, E., Zaldueño, M., Troya, M., Erezuma, I., Lukin, I., Hernández-Moya, R., Orive, G., 2022. Composite alginate-gelatin hydrogels incorporating PRGF enhance human dental pulp cell adhesion, chemotaxis and proliferation. *International Journal of Pharmaceutics* 617, 121631. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121631>
- Araki, J., Miyayama, M., 2020. Wet spinning of cellulose nanowhiskers; fiber yarns obtained only from colloidal cellulose crystals. *Polymer* 188, 122116. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.122116>
- Araki, J., Urata, T., 2020. Cellulose Nanowhisker/Silver Nanoparticle Hybrids Sterically Stabilized by Surface Poly(ethylene glycol) Grafting. *Langmuir* 36, 10868–10875. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02129>
- ASTM International, 2017. ASTM E96-00e1. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials.
- ASTM International, 2000. ASTM F756-00. Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials.
- Aswathy, S.H., Narendrakumar, U., Manjubala, I., 2020. Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon* 6, e03719. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03719>
- Bagher, Z., Ehterami, A., Safdel, M.H., Khastar, H., Semiari, H., Asefnejad, A., Davachi, S.M., Mirzaii, M., Salehi, M., 2020. Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 55, 101379. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101379>
- Bajpai, S.K., Pathak, V., Chand, N., Soni, B., 2013. Cellulose Nano Whiskers (CNWs) Loaded-Poly(sodium acrylate) Hydrogels. Part-I. Effect of Low Concentration of CNWs on Water Uptake. *Journal of Macromolecular Science, Part A* 50, 466–477. <https://doi.org/10.1080/10601325.2013.780946>
- Bano, I., Arshad, M., Yasin, T., Ghauri, M.A., Younus, M., 2017. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *International Journal of Biological Macromolecules* 102, 380–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047>
- Bao, N., Miao, X., Hu, X., Zhang, Q., Jie, X., Zheng, X., 2017. Novel Synthesis of Plasmonic Ag/AgCl@TiO₂ Continuous Fibers with Enhanced Broadband Photocatalytic Performance. *Catalysts* 7, 117. <https://doi.org/10.3390/catal7040117>

- Bediako, J.K., Mouele, E.S.M., El Ouardi, Y., Repo, E., 2023. Saloplastics and the polyelectrolyte complex continuum: Advances, challenges and prospects. *Chemical Engineering Journal* 462, 142322. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142322>
- Bento, C., Gaspar, M.C., Coimbra, P., de Sousa, H.C., Braga, M., 2023. A review of conventional and emerging technologies for hydrogels sterilization. *International Journal of Pharmaceutics* 634, 122671. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122671>
- Berger, S., Zhang, H., Pich, A., 2009. Microgel-Based Stimuli-Responsive Capsules. *Advanced Functional Materials* 19, 554–559. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801203>
- Bertrand, G.-M.E., 1997. Electrostatics and Hydrogen Bonding, in: *Advances in Molecular and Cell Biology*. Elsevier, pp. 109–132. [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(08\)60108-3](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(08)60108-3)
- Bhushan, B., 2012. Nanotribological and nanomechanical properties of skin with and without cream treatment using atomic force microscopy and nanoindentation. *Journal of Colloid and Interface Science* 367, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.10.019>
- Bigucci, F., Luppi, B., Cerchiara, T., Sorrenti, M., Bettinetti, G., Rodriguez, L., Zecchi, V., 2008. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 35, 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.09.004>
- Birch, N.P., Barney, L.E., Pandres, E., Peyton, S.R., Schiffman, J.D., 2015. Thermal-Responsive Behavior of a Cell Compatible Chitosan/Pectin Hydrogel. *Biomacromolecules* 16, 1837–1843. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00425>
- Bombaldi de Souza, F.C., Bombaldi de Souza, R.F., Drouin, B., Mantovani, D., Moraes, Â.M., 2019. Comparative study on complexes formed by chitosan and different polyanions: Potential of chitosan-pectin biomaterials as scaffolds in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 132, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.187>
- Bonkovoski, L.C., Vilsinski, B.H., Panice, M.R., Nunes, C.S., Braga, G., Lazzarin-Bidóia, D., Nakamura, C.V., Martins, A.F., Muniz, E.C., 2021. Cytocompatible drug delivery devices based on poly[(2-dimethylamino) ethyl methacrylate]/chondroitin sulfate polyelectrolyte complexes prepared in ionic liquids. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 63, 102520. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102520>
- Borsoi, C., Zimmermann, M.V.G., Zattera, A.J., Santana, R.M.C., Ferreira, C.A., 2016. Thermal

- degradation behavior of cellulose nanofibers and nanowhiskers. *J Therm Anal Calorim* 126, 1867–1878. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5653-x>
- Branca, C., D'Angelo, G., Crupi, C., Khouzami, K., Rifici, S., Ruello, G., Wanderlingh, U., 2016. Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. *Polymer* 99, 614–622. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.07.086>
- Brocklehurst, S., Ghousifam, N., Zuniga, K., Stolley, D., Rylander, M.N., 2023. Multilayer In Vitro Human Skin Tissue Platforms for Quantitative Burn Injury Investigation. *Bioengineering* 10, 265. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020265>
- Brumberg, V., Astrelina, T., Malivanova, T., Samoilov, A., 2021. Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings. *Biomedicines* 9, 1235. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091235>
- Burd, A., 2007. Evaluating the use of hydrogel sheet dressings in comprehensive burn wound care. *Ostomy Wound Manage* 53, 52–62.
- Buriuli, M., Verma, D., 2017. Polyelectrolyte Complexes (PECs) for Biomedical Applications, in: Tripathi, A., Melo, J.S. (Eds.), *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications, Advanced Structured Materials*. Springer Singapore, Singapore, pp. 45–93. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3328-5_2
- Calvert, P., 2009. Hydrogels for Soft Machines. *Advanced Materials* 21, 743–756. <https://doi.org/10.1002/adma.200800534>
- Carvalho, S.G., dos Santos, A.M., Silvestre, A.L.P., Meneguim, A.B., Ferreira, L.M.B., Chorilli, M., Gremião, M.P.D., 2021. New insights into physicochemical aspects involved in the formation of polyelectrolyte complexes based on chitosan and dextran sulfate. *Carbohydrate Polymers* 271, 118436. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118436>
- Cha, C., Kohman, R.H., Kong, H., 2009. Biodegradable Polymer Crosslinker: Independent Control of Stiffness, Toughness, and Hydrogel Degradation Rate. *Adv Funct Materials* 19, 3056–3062. <https://doi.org/10.1002/adfm.200900865>
- Chaibi, S., Benachour, D., Merbah, M., Esperanza Cagiao, M., Baltá Calleja, F.J., 2015. The role of crosslinking on the physical properties of gelatin based films. *Colloid Polym Sci* 293, 2741–2752. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3660-2>
- Chang, C., He, M., Zhou, J., Zhang, L., 2011. Swelling Behaviors of pH- and Salt-Responsive Cellulose-

- Based Hydrogels. *Macromolecules* 44, 1642–1648. <https://doi.org/10.1021/ma102801f>
- Chang, K.L.B., Lin, J., 2000. Swelling behavior and the release of protein from chitosan–pectin composite particles. *Carbohydrate Polymers* 43, 163–169. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00145-4)
- Chen, D., Liu, X., Qi, Y., Ma, X., Wang, Y., Song, H., Zhao, Y., Li, W., Qin, J., 2022. Poly(aspartic acid) based self-healing hydrogel with blood coagulation characteristic for rapid hemostasis and wound healing applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 214, 112430. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112430>
- Chen, J.L., Steele, T.W.J., Stuckey, D.C., 2018. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. *Biotechnol Bioeng* 115, 351–358. <https://doi.org/10.1002/bit.26475>
- Chen, S., Li, D., Wen, Y., Peng, G., Ye, K., Huang, Y., Long, S., Li, X., 2024. Polyelectrolyte Complex Hydrogels from Controlled Kneading and Annealing-Induced Tightly Wound and Highly Entangled Natural Polysaccharides. *Advanced Healthcare Materials* 13, 2302973. <https://doi.org/10.1002/adhm.202302973>
- Chetouani, A., Follain, N., Marais, S., Rihouey, C., Elkolli, M., Bounekhel, M., Benachour, D., Le Cerf, D., 2017. Physicochemical properties and biological activities of novel blend films using oxidized pectin/chitosan. *Int J Biol Macromol* 97, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.018>
- Chipara, Magdalena, Lozano, K., Hernandez, A., Chipara, Mircea, 2008. TGA analysis of polypropylene–carbon nanofibers composites. *Polymer Degradation and Stability* 93, 871–876. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.01.001>
- Cho, S.Y., Park, H.H., Yun, Y.S., Jin, H.-J., 2013. Cellulose nanowhisker-incorporated poly(lactic acid) composites for high thermal stability. *Fibers Polym* 14, 1001–1005. <https://doi.org/10.1007/s12221-013-1001-y>
- Chowdhury, Z.Z., Chandran, R.R.R., Jahan, A., Khalid, K., Rahman, M.M., Al-Amin, M., Akbarzadeh, O., Badruddin, I.A., Khan, T.M.Y., Kamangar, S., Hamizi, N.A.B., Wahab, Y.A., Johan, R.B., Adebisi, G.A., 2019. Extraction of Cellulose Nano-Whiskers Using Ionic Liquid-Assisted Ultrasonication: Optimization and Mathematical Modelling Using Box–Behnken Design. *Symmetry* 11, 1148. <https://doi.org/10.3390/sym11091148>
- Christodoulakis, K. e., Vamvakaki, M., 2010. pH-Responsive Microgel Particles Comprising Solely

- Basic or Acidic Residues. *Macromolecular Symposia* 291–292, 106–114.
<https://doi.org/10.1002/masy.201050513>
- Consolo, V.F., Torres-Nicolini, A., Alvarez, V.A., 2020. Mycosynthetized Ag, CuO and ZnO nanoparticles from a promising *Trichoderma harzianum* strain and their antifungal potential against important phytopathogens. *Sci Rep* 10, 20499. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77294-6>
- Costa, R.R., Costa, A.M.S., Caridade, S.G., Mano, J.F., 2015. Compact Saloplastic Membranes of Natural Polysaccharides for Soft Tissue Engineering. *Chem. Mater.* 27, 7490–7502.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b03648>
- Cuomo, F., Cofelice, M., Lopez, F., 2019. Rheological Characterization of Hydrogels from Alginate-Based Nanodispersion. *Polymers* 11, 259. <https://doi.org/10.3390/polym11020259>
- da Costa, M.P.M., de Mello Ferreira, I.L., de Macedo Cruz, M.T., 2016. New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay. *Carbohydrate Polymers* 146, 123–130.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.025>
- Dai, H., Ou, S., Huang, Y., Huang, H., 2018. Utilization of pineapple peel for production of nanocellulose and film application. *Cellulose* 25, 1743–1756. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1671-0>
- Dash, R., Cateto, C.A., Ragauskas, A.J., 2014. Synthesis of a co-cross-linked nanocomposite hydrogels from poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid)-polyethylene glycol and nanofibrillated cellulose. *Cellulose* 21, 529–534. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0142-x>
- Dash, R., Foston, M., Ragauskas, A.J., 2013. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers* 91, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.080>
- Dautzenberg, H., 1997. Polyelectrolyte Complex Formation in Highly Aggregating Systems. 1. Effect of Salt: Polyelectrolyte Complex Formation in the Presence of NaCl. *Macromolecules* 30, 7810–7815. <https://doi.org/10.1021/ma970803f>
- De Mesquita, J.P., Donnici, C.L., Pereira, F.V., 2010. Biobased Nanocomposites from Layer-by-Layer Assembly of Cellulose Nanowhiskers with Chitosan. *Biomacromolecules* 11, 473–480.
<https://doi.org/10.1021/bm9011985>
- Derakhshandeh, H., Kashaf, S.S., Aghabaglou, F., Ghanavati, I.O., Tamayol, A., 2018. Smart Bandages: The Future of Wound Care. *Trends in Biotechnology* 36, 1259–1274.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.007>

- Derler, S., Gerhardt, L.-C., 2012. Tribology of Skin: Review and Analysis of Experimental Results for the Friction Coefficient of Human Skin. *Tribol Lett* 45, 1–27. <https://doi.org/10.1007/s11249-011-9854-y>
- Devi, N., Deka, C., Maji, T., Kakati, D., 2016. Gelatin and Gelatin-Polyelectrolyte Complexes: Drug Delivery. pp. 3557–3569. <https://doi.org/10.1081/E-EBPP-120049954>
- Domínguez-Saavedra, G., Hernández-Galván, J.M., 2022. Actualización en el manejo de heridas. *Cir Plast* 31, 124–136.
- Dong, Z., Meng, X., Yang, W., Zhang, J., Sun, P., Zhang, H., Fang, X., Wang, D.-A., Fan, C., 2021. Progress of gelatin-based microspheres (GMSs) as delivery vehicles of drug and cell. *Materials Science and Engineering: C* 122, 111949. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111949>
- Drozdov, A.D., Christiansen, J. deC., 2020. Tension–compression asymmetry in the mechanical response of hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 110, 103851. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103851>
- Dumville, J.C., Lipsky, B.A., Hoey, C., Cruciani, M., Fiscon, M., Xia, J., 2017. Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* 2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011038.pub2>
- Dziadek, M., Dziadek, K., Salagierski, S., Drozdowska, M., Serafim, A., Stancu, I.-C., Szatkowski, P., Kopec, A., Rajzer, I., Douglas, T.E.L., Cholewa-Kowalska, K., 2022. Newly crosslinked chitosan- and chitosan-pectin-based hydrogels with high antioxidant and potential anticancer activity. *Carbohydrate Polymers* 290, 119486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119486>
- Edirisinghe, S.L., Rajapaksha, D.C., Nikapitiya, C., Oh, C., Lee, K.-A., Kang, D.-H., De Zoysa, M., 2020. Spirulina maxima derived marine pectin promotes the in vitro and in vivo regeneration and wound healing in zebrafish. *Fish & Shellfish Immunology* 107, 414–425. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.10.008>
- Ehman, N.V., 2019. Nanocelulosa a partir de residuos agro y foresto industriales.
- Eichhorn, S.J., 2011. Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. *Soft Matter* 7, 303–315. <https://doi.org/10.1039/C0SM00142B>
- Emami, S., Ebrahimi, M., 2023. Bioactive wound powders as wound healing dressings and drug delivery systems. *Powder Technology* 423, 118501. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2023.118501>
- Enawgaw, H., Tesfaye, T., Yilma, K.T., Limeneh, D.Y., 2021. Synthesis of a Cellulose-Co-AMPS

- Hydrogel for Personal Hygiene Applications Using Cellulose Extracted from Corncobs. *Gels* 7, 236. <https://doi.org/10.3390/gels7040236>
- Erceg, T., Dapčević-Hadnađev, T., Hadnađev, M., Ristić, I., 2021. Swelling kinetics and rheological behaviour of microwave synthesized poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. *Colloid Polym Sci* 299, 11–23. <https://doi.org/10.1007/s00396-020-04763-9>
- Eroglu, E., Eroglu, F., Agalar, F., Altuntas, I., Sutcu, R., Ozbasar, D., 2001. The effect of lidocaine/prilocaine cream on an experimental wound healing model. *European Journal of Emergency Medicine* 8, 199.
- Espacenet – patent search [WWW Document], n.d. URL <https://worldwide.espacenet.com/> (accessed 1.30.24).
- Fajardo, A.R., Lopes, L.C., Pereira, A.G.B., Rubira, A.F., Muniz, E.C., 2012. Polyelectrolyte complexes based on pectin–NH₂ and chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers* 87, 1950–1955. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.096>
- Fakhouri, F.M., Costa, D., Yamashita, F., Martelli, S.M., Jesus, R.C., Alganer, K., Collares-Queiroz, F.P., Innocentini-Mei, L.H., 2013. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers* 95, 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.027>
- Farrukh, M.A., 2012. *Advanced Aspects of Spectroscopy*. <https://doi.org/10.5772/2757>
- Fernández-Benito, A., Martínez-López, J.C., Javad Jafari, M., Solin, N., Martínez, J.G., García-Gimenez, D., Ederth, T., Inganäs, O., Carretero-González, J., 2023. Green and Scalable Biopolymer-Based Aqueous Polyelectrolyte Complexes for Zinc-Ion Charge Storage Devices. *ChemElectroChem* 10, e202300327. <https://doi.org/10.1002/celec.202300327>
- Ferrante, M., Gallo, M.B., Gende, L.B., Consolo, V.F., Álvarez, V.A., González, J.S., 2025. Synthesis and characterization of gelatin/chondroitin sulfate microgels with NaCl: Preliminary research toward wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 290, 138953. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138953>
- Firlar, I., Altunbek, M., McCarthy, C., Ramalingam, M., Camci-Unal, G., 2022. Functional Hydrogels for Treatment of Chronic Wounds. *Gels* 8, 127. <https://doi.org/10.3390/gels8020127>
- Flutto, L., 2003. Pectin - Properties and Determination, in: Caballero, B. (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 4440–4449. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00901-9>

- Fonseca, M.C., Vale, A.C., Costa, R.R., Reis, R.L., Alves, N.M., 2023. Exploiting Polyelectrolyte Complexation for the Development of Adhesive and Bioactive Membranes Envisaging Guided Tissue Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials* 14, 3. <https://doi.org/10.3390/jfb14010003>
- Francesko, A., Petkova, P., Tzanov, T., 2019. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *CMC* 25, 5782–5797. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920161246>
- Gaharwar, A.K., Avery, R.K., Assmann, A., Paul, A., McKinley, G.H., Khademhosseini, A., Olsen, B.D., 2014. Shear-Thinning Nanocomposite Hydrogels for the Treatment of Hemorrhage. *ACS Nano* 8, 9833–9842. <https://doi.org/10.1021/nn503719n>
- García González, R.F., Gago Fornell, M., Chumilla López, S., Gaztelu Valdés, V., 2013. Abordaje de enfermería en heridas de urgencias. *Gerokomos* 24, 132–138. <https://doi.org/10.4321/S1134-928X2013000300007>
- Geerligts, M., Oomens, C., Ackermans, P., Baaijens, F., Peters, G., 2011a. Linear shear response of the upper skin layers. *Biorheology* 48, 229–245. <https://doi.org/10.3233/BIR-2011-0590>
- Geerligts, M., van Breemen, L., Peters, G., Ackermans, P., Baaijens, F., Oomens, C., 2011b. *In vitro* indentation to determine the mechanical properties of epidermis. *Journal of Biomechanics* 44, 1176–1181. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.01.015>
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., Juarranz, Á., 2016. Chapter 1 - Anatomy and Function of the Skin, in: Hamblin, M.R., Avci, P., Prow, T.W. (Eds.), *Nanoscience in Dermatology*. Academic Press, Boston, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- Giusto, G., Vercelli, C., Comino, F., Caramello, V., Tursi, M., Gandini, M., 2017. A new, easy-to-make pectin-honey hydrogel enhances wound healing in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17, 266. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1769-1>
- Gonzalez, J.S., Alvarez, V.A., 2014. Mechanical properties of polyvinylalcohol/hydroxyapatite cryogel as potential artificial cartilage. *J Mech Behav Biomed Mater* 34, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.01.019>
- Gonzalez, J.S., Burlaka, A., Paz, J., Salavagione, H., Carretero-González, J., Hernández, R., 2020. Compact polyelectrolyte hydrogels of gelatin and chondroitin sulfate as ion's mobile media in sustainable all-solid state electrochemical devices. *Materials Advances* 1, 2526–2535. <https://doi.org/10.1039/D0MA00514B>

- Gonzalez, J.S., Ludueña, L.N., Ponce, A., Alvarez, V.A., 2014a. Poly(vinyl alcohol)/cellulose nanowhiskers nanocomposite hydrogels for potential wound dressings. *Materials Science and Engineering: C* 34, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.10.006>
- Goy, R.C., Britto, D. de, Assis, O.B.G., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 19, 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Grand View Research, n.d. Advanced Wound Dressing Market Size & Share Report, 2030 [WWW Document]. URL <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/advanced-wound-care-dressing-market> (accessed 10.29.24).
- Guarín-Corredor, C., Quiroga-Santamaría, P., Landínez-Parra, N.S., 2013. Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Revista de la Facultad de Medicina* 61, 441–448.
- Gucht, J. van der, Spruijt, E., Lemmers, M., Cohen Stuart, M.A., 2011. Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems. *Journal of Colloid and Interface Science* 361, 407–422. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.05.080>
- Hamedi, H., Moradi, S., Hudson, S.M., Tonelli, A.E., 2018. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers* 199, 445–460. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.114>
- Haq, M.A., Su, Y., Wang, D., 2017. Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* 70, 842–855. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.081>
- Hariri, H.H., Schlenoff, J.B., 2010. Saloplastic Macroporous Polyelectrolyte Complexes: Cartilage Mimics. *Macromolecules* 43, 8656–8663. <https://doi.org/10.1021/ma1012978>
- He, H., Cao, X., Lee, L.J., 2004. Design of a novel hydrogel-based intelligent system for controlled drug release. *Journal of Controlled Release* 95, 391–402. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.12.004>
- Hebeish, A., Farag, S., Sharaf, S., Shaheen, Th.I., 2014. Thermal responsive hydrogels based on semi interpenetrating network of poly(NIPAm) and cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers* 102, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.054>
- Hendriks, F.M., Brokken, D., Oomens, C.W.J., Bader, D.L., Baaijens, F.P.T., 2006. The relative contributions of different skin layers to the mechanical behavior of human skin in vivo using

- suction experiments. *Medical Engineering & Physics* 28, 259–266.
<https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2005.07.001>
- Hertz, H., 1882. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*. <https://doi.org/10.1515/crll.1882.92.156>
- Holt, B., Tripathi, A., Morgan, J., 2008. Viscoelastic Response of Human Skin to Low Magnitude Physiologically Relevant Shear. *J Biomech* 41, 2689–2695.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.06.008>
- Hu, X., Wang, Y., Zhang, L., Xu, M., 2020. Formation of self-assembled polyelectrolyte complex hydrogel derived from salectan and chitosan for sustained release of Vitamin C. *Carbohydrate Polymers* 234, 115920. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115920>
- Huang, J., Zhou, Y., Dong, L., Zhou, Z., Liu, R., 2017. Enhancement of mechanical and electrical performances of insulating presspaper by introduction of nanocellulose. *Composites Science and Technology* 138, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2016.11.020>
- Hussain, Z., Thu, H.E., Rawas-Qalaji, M., Naseem, M., Khan, S., Sohail, M., 2022. Recent developments and advanced strategies for promoting burn wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 68, 103092. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103092>
- International Organization for Standardization, 2015. ISO 14577-1:2015. Metallic materials — Instrumented indentation test for hardness and materials parameters — Part 1: Test method [WWW Document]. ISO. URL <https://www.iso.org/standard/30104.html> (accessed 8.26.24).
- International Organization for Standardization, 2009. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [WWW Document]. ISO. URL <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accessed 8.27.24).
- Jimenez-Kairuz, A., Allemandi, D., Manzo, R.H., 2002. Mechanism of Lidocaine Release From Carbomer–Lidocaine hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91, 267–272.
<https://doi.org/10.1002/jps.10036>
- Johnson, K.L., Kendall, K., Roberts, A.D., Tabor, D., 1997. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* 324, 301–313. <https://doi.org/10.1098/rspa.1971.0141>
- Kaith, B.S., Singh, A., Sharma, A.K., Sud, D., 2021. Hydrogels: Synthesis, Classification, Properties and Potential Applications—A Brief Review. *J Polym Environ* 29, 3827–3841.

<https://doi.org/10.1007/s10924-021-02184-5>

- Kanwate, B.W., Ballari, R.V., Kudre, T.G., 2019. Influence of spray-drying, freeze-drying and vacuum-drying on physicochemical and functional properties of gelatin from *Labeo rohita* swim bladder. International Journal of Biological Macromolecules 121, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.015>
- Khorasani, M.T., Joorabloo, A., Adeli, H., Milan, P.B., Amoupour, M., 2021. Enhanced antimicrobial and full-thickness wound healing efficiency of hydrogels loaded with heparinized ZnO nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. International Journal of Biological Macromolecules 166, 200–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.142>
- Kim, T.-H., Kim, M., Park, H.-S., Shin, U.S., Gong, M.-S., Kim, H.-W., 2012. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. Journal of Biomedical Materials Research Part A 100A, 1033–1043. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34053>
- Kiran Kumar, Ravi, Pavani, Bhavani, Sharma, Sharma, 2012. Electrical conduction mechanism in NaCl complexed PEO/PVP polymer blend electrolytes. Journal of Non-Crystalline Solids 358, 3205–3211. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrsol.2012.08.022>
- Kocağa, B., Öztürk, Y., Ceren Kurçin, H., Güner-Yılmaz, Ö.Z., Kurcuoglu, O., Tatlier, M., Özdemir, İ., Kervancioglu Demirci, E., Kotil, T., Solakoğlu, S., Aksu, B., Batirel, S., Bal-Öztürk, A., Güner, F.S., 2024. Developing multifunctional pectin-based hydrogel for wound dressing: *In silico*, *in vitro* and *in vivo* evaluation. European Polymer Journal 216, 113280. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113280>
- Kohn, J.C., Ebenstein, D.M., 2013. Eliminating adhesion errors in nanoindentation of compliant polymers and hydrogels. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 20, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.02.002>
- Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., Goodwin, C., 2011. Anatomy and Physiology of the Skin. Journal of the Dermatology Nurses' Association 3, 203. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Koshy, J., Sangeetha, D., 2024. Recent progress and treatment strategy of pectin polysaccharide based tissue engineering scaffolds in cancer therapy, wound healing and cartilage regeneration. International Journal of Biological Macromolecules 257, 128594. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128594>
- Kulkarni, A.D., Vanjari, Y.H., Sancheti, K.H., Patel, H.M., Belgamwar, V.S., Surana, S.J., Pardeshi,

- C.V., 2016. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 44, 1615–1625. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1129624>
- Lau, H.K., Rattan, S., Fu, H., Garcia, C.G., Barber, D.M., Kiick, K.L., Crosby, A.J., 2020. Micromechanical Properties of Microstructured Elastomeric Hydrogels. *Macromol Biosci* 20, e1900360. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900360>
- LeClair, D.A., Cranston, E.D., Xing, Z., Thompson, M.R., 2016. Optimization of Spray Drying Conditions for Yield, Particle Size and Biological Activity of Thermally Stable Viral Vectors. *Pharm Res* 33, 2763–2776. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2003-4>
- Lee, G., 2002. Spray-Drying of Proteins, in: Carpenter, J.F., Manning, M.C. (Eds.), *Rational Design of Stable Protein Formulations, Pharmaceutical Biotechnology*. Springer US, Boston, MA, pp. 135–158. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0557-0_6
- Lee, K.Y., Bouhadir, K.H., Mooney, D.J., 2004. Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules. *Biomaterials* 25, 2461–2466. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.030>
- Leong, M.Y., Kong, Y.L., Harun, M.Y., Looi, C.Y., Wong, W.F., 2023. Current advances of nanocellulose application in biomedical field. *Carbohydrate Research* 532, 108899. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108899>
- Li, B., Li, H., Chen, H., Liu, Y., Chen, J., Feng, Q., Cao, X., Dong, H., 2023. Microgel Assembly Powder Improves Acute Hemostasis, Antibacterial, and Wound Healing via In Situ Co-Assembly of Erythrocyte and Microgel. *Advanced Functional Materials* 33, 2302793. <https://doi.org/10.1002/adfm.202302793>
- Li, D., Wang, S., Meng, Y., Li, Jun-fang, Li, Jun, 2020. An injectable, self-healing hydrogel system from oxidized pectin/chitosan/ γ -Fe₂O₃. *International Journal of Biological Macromolecules* 164, 4566–4574. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.072>
- Li, F., Mascheroni, E., Piergiovanni, L., 2015. The Potential of NanoCellulose in the Packaging Field: A Review. *Packaging Technology and Science* 28, 475–508. <https://doi.org/10.1002/pts.2121>
- Li, S., Pan, H., Wang, Y., Sun, J., 2020. Polyelectrolyte complex-based self-healing, fatigue-resistant and anti-freezing hydrogels as highly sensitive ionic skins. *J. Mater. Chem. A* 8, 3667–3675. <https://doi.org/10.1039/C9TA13213A>

- Liang, Y., He, J., Guo, B., 2021. Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano* 15, 12687–12722. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04206>
- Liao, Q., Huang, J., Zhu, T., Xiong, C., Fang, J., 2010. A hybrid model to determine mechanical properties of soft polymers by nanoindentation. *Mechanics of Materials* 42, 1043–1047. <https://doi.org/10.1016/j.mechmat.2010.09.005>
- Lichstein, H.C., Soule, M.H., 1944. Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. *J Bacteriol* 47, 221–230.
- Lima, A.C., Sher, P., Mano, J.F., 2012. Production methodologies of polymeric and hydrogel particles for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*.
- Lin, Y., Chen, J., Li, Q., Pan, K., 2009. Moisture vapor transmission rates of various transparent dressings at different temperatures and humidities. *Chinese Medical Journal* 122, 927. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.08.009>
- Long, J., Etxeberria, A.E., Nand, A.V., Bunt, C.R., Ray, S., Seyfoddin, A., 2019. A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery. *Materials Science and Engineering: C* 104, 109873. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109873>
- Lunardi, C.N., Gomes, A.J., Rocha, F.S., De Tommaso, J., Patience, G.S., 2021. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 99, 627–639. <https://doi.org/10.1002/cjce.23914>
- Lv, Y., Yu, Z., Li, C., Zhou, J., Lv, X., Chen, J., Wei, M., Liu, J., Yu, X., Wang, C., Hu, P., Liu, Y., 2022. Gelatin-based nanofiber membranes loaded with curcumin and borneol as a sustainable wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules* 219, 1227–1236. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.198>
- Madden, M., Stark, J., 2019. Understanding the development of advanced wound care in the UK: Interdisciplinary perspectives on care, cure and innovation. *Journal of Tissue Viability* 28, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2019.03.003>
- Markets and Markets, n.d. Advanced Wound Care Market Growth, Drivers, and Opportunities [WWW Document]. *MarketsandMarkets*. URL <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/advanced-wound-care-market-88705076.html> (accessed 10.29.24).
- Markiewicz-Gospodarek, A., Kozioł, M., Tobiasz, M., Baj, J., Radzikowska-Büchner, E., Przekora, A., 2022. Burn Wound Healing: Clinical Complications, Medical Care, Treatment, and Dressing

- Types: The Current State of Knowledge for Clinical Practice. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 1338. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031338>
- Martins, J.G., Camargo, S.E.A., Bishop, T.T., Popat, K.C., Kipper, M.J., Martins, A.F., 2018a. Pectin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. *Carbohydrate Polymers* 197, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.062>
- Martins, J.G., de Oliveira, A.C., Garcia, P.S., Kipper, M.J., Martins, A.F., 2018b. Durable pectin/chitosan membranes with self-assembling, water resistance and enhanced mechanical properties. *Carbohydrate Polymers* 188, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.112>
- Mat Zain, N.F., 2014. Preparation and Characterization of Cellulose and Nanocellulose From Pomelo (*Citrus grandis*) Albedo. *J Nutr Food Sci* 05. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000334>
- Mehta, P., Sharma, M., Devi, M., 2023. Hydrogels: An overview of its classifications, properties, and applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 147, 106145. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.106145>
- Meka, V.S., Sing, M.K.G., Pichika, M.R., Nali, S.R., Kolapalli, V.R.M., Kesharwani, P., 2017. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discovery Today* 22, 1697–1706. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.008>
- Men'shikov, D.D., Lazareva, E.B., Popova, T.S., Shramko, L.U., Tokaev, I.S., Zalogueva, G.V., Gaponova, I.N., 1997. Antimicrobial properties of pectins and their effects on antibiotics. *Antibiot Khimioter* 42, 10–15.
- Miethling-Graff, R., Rumpker, R., Richter, M., Verano-Braga, T., Kjeldsen, F., Brewer, J., Hoyland, J., Rubahn, H.-G., Erdmann, H., 2014. Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicology in Vitro* 28, 1280–1289. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.005>
- Mirhaj, M., Labbaf, S., Tavakoli, M., Seifalian, A.M., 2022. Emerging treatment strategies in wound care. *International Wound Journal* 19, 1934–1954. <https://doi.org/10.1111/iwj.13786>
- Mishra, R.K., Sabu, A., Tiwari, S.K., 2018. Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect. *Journal of Saudi Chemical Society* 22, 949–978. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.02.005>
- Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., Gomez d'Ayala, G., 2020. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A

- review. *Carbohydrate Polymers* 233, 115839. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>
- Mogna, L., Del Piano, M., Deidda, F., Nicola, S., Soattini, L., Debiaggi, R., Sforza, F., Strozzi, G., Mogna, G., 2012. Assessment of the In Vitro Inhibitory Activity of Specific Probiotic Bacteria Against Different *Escherichia coli* Strains. *Journal of Clinical Gastroenterology* 46, S29. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31826852b7>
- Mohan, P., Rangari, V.D., Kesavan, K., 2022. Cationic Chitosan/Pectin Polyelectrolyte Nanocapsules of Moxifloxacin as Novel Topical Management System for Bacterial Keratitis. *Current Eye Research* 47, 1498–1507. <https://doi.org/10.1080/02713683.2022.2124274>
- Mollea, C., Bosco, F., Fissore, D., 2022. Agar Plate Methods for Assessing the Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils against *S. epidermidis* and *E. coli*. *Antibiotics* 11, 1809. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121809>
- Moneris, M., Broglia, M.F., Yslas, E.I., Barbero, C.A., Rivarola, C.R., 2019. Highly effective antimicrobial nanocomposites based on hydrogel matrix and silver nanoparticles: long-lasting bactericidal and bacteriostatic effects. *Soft Matter* 15, 8059–8066. <https://doi.org/10.1039/C9SM01118H>
- Mori, S., Barth, H.G., 1999. *Size Exclusion Chromatography*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-03910-6>
- Morris, G.A., Kök, S.M., Harding, S.E., Adams, G.G., 2010. Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 27, 257–284. <https://doi.org/10.1080/02648725.2010.10648153>
- Mourad, R., Helaly, F., Darwesh, O., Sawy, S.E., 2019. Antimicrobial and physicochemical natures of silver nanoparticles incorporated into silicone-hydrogel films. *Contact Lens and Anterior Eye* 42, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2019.02.007>
- Murali Mohan, Y., Lee, K., Premkumar, T., Geckeler, K.E., 2007. Hydrogel networks as nanoreactors: A novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications. *Polymer* 48, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.10.045>
- Murali Mohan, Y., Vimala, K., Thomas, V., Varaprasad, K., Sreedhar, B., Bajpai, S.K., Mohana Raju, K., 2010. Controlling of silver nanoparticles structure by hydrogel networks. *Journal of Colloid and Interface Science* 342, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.10.008>
- Myron, P., Siddiquee, S., Azad, S.A., 2017. Partial structural studies of fucosylated chondroitin sulfate

- (FuCS) using attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy* 89, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.12.008>
- Naficy, S., Dehghani, F., Chew, Y.V., Hawthorne, W.J., Le, T.Y.L., 2020. Engineering a Porous Hydrogel-Based Device for Cell Transplantation. *ACS Appl. Bio Mater.* 3, 1986–1994. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01144>
- Nakano, T., Betti, M., Pietrasik, Z., 2010. Extraction, Isolation and Analysis of Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 2, 61–74.
- Nakayama, M., Shigemune, N., Tsugukuni, T., Jun, H., Matsushita, T., Mekada, Y., Kurahachi, M., Miyamoto, T., 2012. Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control* 25, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.021>
- Nascimento, D.M., Almeida, J.S., Dias, A.F., Figueirêdo, M.C.B., Morais, J.P.S., Feitosa, J.P.A., Rosa, M. de F., 2014. A novel green approach for the preparation of cellulose nanowhiskers from white coir. *Carbohydrate Polymers* 110, 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.053>
- Nemecz, D., Golińska, P., 2022. Antibacterial Properties of Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus*—Insight into the Mechanism of Action. *Molecules* 27, 7726. <https://doi.org/10.3390/molecules27227726>
- Nešović, K., Mišković-Stanković, V., 2020. A comprehensive review of the polymer-based hydrogels with electrochemically synthesized silver nanoparticles for wound dressing applications. *Polymer Engineering & Science* 60, 1393–1419. <https://doi.org/10.1002/pen.25410>
- Neufeld, L., Bianco-Peled, H., 2017. Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. *International Journal of Biological Macromolecules* 101, 852–861. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.167>
- Nicu, R., Ciolacu, F., Ciolacu, D.E., 2021. Advanced Functional Materials Based on Nanocellulose for Pharmaceutical/Medical Applications. *Pharmaceutics* 13, 1125. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081125>
- Norman, G., Christie, J., Liu, Z., Westby, M.J., Jefferies, J.M., Hudson, T., Edwards, J., Mohapatra, D.P., Hassan, I.A., Dumville, J.C., 2017. Antiseptics for burns. *Cochrane Database Syst Rev*

2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011821.pub2>
- Nuutila, K., Eriksson, E., 2021. Moist Wound Healing with Commonly Available Dressings. *Advances in Wound Care* 10, 685–698. <https://doi.org/10.1089/wound.2020.1232>
- Ofori-Kwakye, K., Fell, J.T., Kipo, S.L., 2006. Effects of pH of medium and molecular weight on polyelectrolyte complex formation between pectin and chitosan. *Journal of Science and Technology (Ghana)* 26, 66–73. <https://doi.org/10.4314/just.v26i2.32990>
- Omotoyinbo O, V., 2017. Effect of Varying NaCl Concentrations on the Growth Curve of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.
- Op 'T Veld, R.C., Walboomers, X.F., Jansen, J.A., Wagener, F.A.D.T.G., 2020. Design Considerations for Hydrogel Wound Dressings: Strategic and Molecular Advances. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 26, 230–248. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0281>
- Ortega, M.A., De Leon-Oliva, D., Boaru, D.L., Fraile-Martinez, O., García-Montero, C., Díaz, R., Coca, S., Barrena-Blázquez, S., Bujan, J., García-Honduvilla, N., Saez, M.A., Álvarez-Mon, M., Saz, J.V., 2023. Unraveling the New Perspectives on Antimicrobial Hydrogels: State-of-the-Art and Translational Applications. *Gels* 9, 617. <https://doi.org/10.3390/gels9080617>
- Osman, Z., Arof, A.K., 2003. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta* 48, 993–999. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(02\)00812-5](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(02)00812-5)
- Otoni, C.G., Queirós, M.V.A., Sabadini, J.B., Rojas, O.J., Loh, W., 2020. Charge Matters: Electrostatic Complexation As a Green Approach to Assemble Advanced Functional Materials. *ACS Omega* 5, 1296–1304. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03690>
- Oyen, M.L., 2014. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews* 59, 44–59. <https://doi.org/10.1179/1743280413Y.0000000022>
- Pailler-Mattéi, C., Zahouani, H., 2006. Analysis of adhesive behaviour of human skin in vivo by an indentation test. *Tribology International* 39, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.triboint.2004.11.003>
- Pang, S., Gao, Y., Wang, F., Wang, Y., Cao, M., Zhang, W., Liang, Y., Song, M., Jiang, G., 2020. Toxicity of silver nanoparticles on wound healing: A case study of zebrafish fin regeneration model. *Science of The Total Environment* 717, 137178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137178>
- Pangli, H., Vatanpour, S., Hortamani, S., Jalili, R., Ghahary, A., 2021. Incorporation of Silver

- Nanoparticles in Hydrogel Matrices for Controlling Wound Infection. *Journal of Burn Care & Research* 42, 785–793. <https://doi.org/10.1093/jbcr/iraa205>
- Panwar, V., Sharma, A., Murugesan, P., Salaria, N., Ghosh, D., 2023. Free-flowing, self-crosslinking, carboxymethyl starch and carboxymethyl cellulose microgels, as smart hydrogel dressings for wound repair. *International Journal of Biological Macromolecules* 246, 125735. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125735>
- Paz, N. de la, Pérez, D., Fernández, M., López, O.D., Nogueira, A., Rapado Paneque, M., Altanés Valentín, S., García, C.M., 2013. Evaluación viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 14, 84–91.
- Peng, X., Xu, X., Xiao, D., Deng, Y., Xie, X., Xu, L., Xu, X., Yuan, W., Yang, B., Yang, X., Xia, X., Duan, L., Bian, L., 2021. Ultrafast Self-Gelling and Wet Adhesive Powder for Acute Hemostasis and Wound Healing. *Advanced Functional Materials* 31, 2102583. <https://doi.org/10.1002/adfm.202102583>
- Percival, N.J., 2002. Classification of Wounds and their Management. *Surgery (Oxford), Basic Surgical Techniques / Wound Healing / Theatre Problems* 20, 114–117. <https://doi.org/10.1383/surg.20.5.114.14626>
- Pereda, M., Ponce, A.G., Marcovich, N.E., Ruseckaite, R.A., Martucci, J.F., 2011. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids* 25, 1372–1381. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.001>
- Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34, 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Pooyan, P., Tannenbaum, R., Garmestani, H., 2012. Mechanical behavior of a cellulose-reinforced scaffold in vascular tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 7th TMS Symposium on Biological Materials Science* 7, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.09.009>
- Popat, A., Liu, J., Qing (Max) Lu, G., Zhang Qiao, S., 2012. A pH-responsive drug delivery system based on chitosan coated mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 22, 11173–11178. <https://doi.org/10.1039/C2JM30501A>
- Porcel, C.H., Schlenoff, J.B., 2009. Compact Polyelectrolyte Complexes: "Saloplastic" Candidates for

- Biomaterials. *Biomacromolecules* 10, 2968–2975. <https://doi.org/10.1021/bm900373c>
- Pourshahrestani, S., Zeimaran, E., Kadri, N.A., Mutlu, N., Boccaccini, A.R., 2020. Polymeric Hydrogel Systems as Emerging Biomaterial Platforms to Enable Hemostasis and Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials* 9, 2000905. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000905>
- Prinn, K.B., Costantino, H.R., Tracy, M., 2002. Statistical Modeling of protein spray drying at the lab scale. *AAPS PharmSciTech* 3, 32–39. <https://doi.org/10.1208/pt030104>
- Proksch, E., 2018. pH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology* 45, 1044–1052. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489>
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., Du, Y., 2006. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* 63, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.023>
- Qu, J., Zhao, X., Liang, Y., Xu, Y., Ma, P.X., Guo, B., 2019. Degradable conductive injectable hydrogels as novel antibacterial, anti-oxidant wound dressings for wound healing. *Chemical Engineering Journal* 362, 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.028>
- Quadrado, R.F.N., Fajardo, A.R., 2022. Vapor-induced polyelectrolyte complexation of chitosan/pectin: A promising strategy for the preparation of hydrogels for controlled drug delivery. *Journal of Molecular Liquids* 361, 119604. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119604>
- Ramli, H., Zainal, N.F.A., Hess, M., Chan, C.H., 2022. Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. *Chemistry Teacher International* 4, 307–326. <https://doi.org/10.1515/cti-2022-0010>
- Rashid, S., Dutta, H., 2020. Characterization of nanocellulose extracted from short, medium and long grain rice husks. *Industrial Crops and Products* 154, 112627. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112627>
- Ravishankar, K., Venkatesan, M., Desingh, R.P., Mahalingam, A., Sadhasivam, B., Subramaniyam, R., Dhamodharan, R., 2019. Biocompatible hydrogels of chitosan-alkali lignin for potential wound healing applications. *Materials Science and Engineering: C* 102, 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.038>
- Reguieg, F., Ricci, L., Bouyacoub, N., Belbachir, M., Bertoldo, M., 2020. Thermal characterization by DSC and TGA analyses of PVA hydrogels with organic and sodium MMT. *Polym. Bull.* 77, 929–948. <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02782-3>
- Rodrigues, M.N., Oliveira, M.B., Costa, R.R., Mano, J.F., 2016. Chitosan/Chondroitin Sulfate

- Membranes Produced by Polyelectrolyte Complexation for Cartilage Engineering. *Biomacromolecules* 17, 2178–2188. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00399>
- Roy, N., Saha, N., Saha, P., 2013. Stability Study of Novel Medicated Hydrogel Wound Dressings. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 62, 150–156. <https://doi.org/10.1080/00914037.2011.641697>
- Rusu, A.G., Popa, M.I., Lisa, G., Vereștiuc, L., 2015. Thermal behavior of hydrophobically modified hydrogels using TGA/FTIR/MS analysis technique. *Thermochimica Acta* 613, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.05.018>
- Rydzek, G., Pakdel, A., Witecka, A., Awang Shri, D.N., Gaudière, F., Nicolosi, V., Mokarian-Tabari, P., Schaaf, P., Boulmedais, F., Ariga, K., 2018. pH-Responsive Saloplastics Based on Weak Polyelectrolytes: From Molecular Processes to Material Scale Properties. *Macromolecules* 51, 4424–4434. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b00609>
- Saha, C.N., Bhattacharya, S., 2011. Intellectual property rights: An overview and implications in pharmaceutical industry. *J Adv Pharm Technol Res* 2, 88–93. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82952>
- Sahiner, N., Godbey, W.T., McPherson, G.L., John, V.T., 2006. Microgel, nanogel and hydrogel–hydrogel semi-IPN composites for biomedical applications: synthesis and characterization. *Colloid Polym Sci* 284, 1121–1129. <https://doi.org/10.1007/s00396-006-1489-4>
- Sakiyama, T., Chu, C.-H., Fujii, T., Yano, T., 1993. Preparation of a polyelectrolyte complex gel from chitosan and κ -carrageenan and its pH-sensitive swelling. *Journal of Applied Polymer Science* 50, 2021–2025. <https://doi.org/10.1002/app.1993.070501121>
- Sarmah, D., Borah, M., Mandal, M., Karak, N., 2023. Swelling induced mechanically tough starch–agar based hydrogel as a control release drug vehicle for wound dressing applications. *Journal of Materials Chemistry B* 11, 2927–2936. <https://doi.org/10.1039/D2TB02775E>
- Schaaf, P., Schlenoff, J.B., 2015. Saloplastics: Processing Compact Polyelectrolyte Complexes. *Advanced Materials* 27, 2420–2432. <https://doi.org/10.1002/adma.201500176>
- Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C., Delair, T., 2004. Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes. *Biomacromolecules* 5, 1882–1892. <https://doi.org/10.1021/bm049786+>
- Schröder, P., Cord-Landwehr, S., Schönhoff, M., Cramer, C., 2023. Composition and Charge

- Compensation in Chitosan/Gum Arabic Complex Coacervates in Dependence on pH and Salt Concentration. *Biomacromolecules* 24, 1194–1208. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01255>
- Shanti, S.K., Aprilita, N.H., Siswanta, D., 2022. Sodium Dodecyl Sulfate Adsorption on Sulfuric Acid-Crosslinked Chitosan/Pectin Polyelectrolyte Complex Film. *Key Engineering Materials* 920, 43–50. <https://doi.org/10.4028/p-k915ls>
- Sharma, S., Swetha, K.L., Roy, A., 2019. Chitosan-Chondroitin sulfate based polyelectrolyte complex for effective management of chronic wounds. *International Journal of Biological Macromolecules* 132, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.186>
- Shen, Z., Zhang, C., Wang, T., Xu, J., 2023. Advances in Functional Hydrogel Wound Dressings: A Review. *Polymers* 15, 2000. <https://doi.org/10.3390/polym15092000>
- Shi, C., Wang, C., Liu, H., Li, Q., Li, R., Zhang, Y., Liu, Y., Shao, Y., Wang, J., 2020. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8.
- Shinmei, M., Miyauchi, S., Machida, A., Miyazaki, K., 1992. Quantitation of chondroitin 4—sulfate and chondroitin 6—sulfate in pathologic joint fluid. *Arthritis & Rheumatism* 35, 1304–1308. <https://doi.org/10.1002/art.1780351110>
- Shu, M., Long, S., Huang, Y., Li, D., Li, H., Li, X., 2019. High strength and antibacterial polyelectrolyte complex CS/HS hydrogel films for wound healing. *Soft Matter* 15, 7686–7694. <https://doi.org/10.1039/C9SM01380F>
- Simões, D., Miguel, S.P., Ribeiro, M.P., Coutinho, P., Mendonça, A.G., Correia, I.J., 2018. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 127, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>
- Słota, D., Głąb, M., Tylińczak, B., Dogulas, T.E.L., Rudnicka, K., Miernik, K., M Urbaniak, M., Rusek-Wala, P., Sobczak-Kupiec, A., 2021. Composites Based on Hydroxyapatite and Whey Protein Isolate for Applications in Bone Regeneration. *Materials (Basel)* 14, 2317. <https://doi.org/10.3390/ma14092317>
- Sofos, J.N., 1984. Antimicrobial Effects of Sodium and Other Ions in Foods: A Review. *Journal of Food Safety* 6, 45–78. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1984.tb00478.x>
- Soler, D.M., Rodríguez, Y., Correa, H., Moreno, A., Carrizales, L., 2012. Pilot scale-up and shelf stability

- of hydrogel wound dressings obtained by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry, International Meeting on Radiation Processing* 81, 1249–1253. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.02.024>
- Soubhagya, A.S., Moorthi, A., Prabakaran, M., 2020. Preparation and characterization of chitosan/pectin/ZnO porous films for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules* 157, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.156>
- Spagnol, C., Rodrigues, F.H.A., Pereira, A.G.B., Fajardo, A.R., Rubira, A.F., Muniz, E.C., 2012. Superabsorbent hydrogel nanocomposites based on starch-g-poly(sodium acrylate) matrix filled with cellulose nanowhiskers. *Cellulose* 19, 1225–1237. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9711-7>
- Srivastava, S., Tirrell, M.V., 2016. Polyelectrolyte complexation, in: Rice, S.A., Dinner, A.R. (Eds.), *Advances in Chemical Physics*. Wiley, pp. 499–544. <https://doi.org/10.1002/9781119290971.ch7>
- Stojkov, G., Niyazov, Z., Picchioni, F., Bose, R.K., 2021. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels* 7, 255. <https://doi.org/10.3390/gels7040255>
- Sui, J., 2022. Osmotic release of drugs via deswelling dynamics of microgels: modeling of collaborative flow and diffusions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 25, 410–418. <https://doi.org/10.1039/D2CP02668F>
- Suneetha, M., Rao, K.M., Han, S.S., 2020. Mechanically improved porous hydrogels with polysaccharides via polyelectrolyte complexation for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 144, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.096>
- Surowiecka, A., Strużyna, J., Winiarska, A., Korzeniowski, T., 2022. Hydrogels in Burn Wound Management—A Review. *Gels* 8, 122. <https://doi.org/10.3390/gels8020122>
- Szpak, M., Trziszka, T., Polanowski, A., Gburek, J., Gołąb, K., Juszczynska, K., Janik, P., Malicki, A., Szyplik, K., 2014. Evaluation of the Antibacterial Activity of Cystatin against Selected Strains of *Escherichia coli*. *Folia Biologica* 62, 187–192. https://doi.org/10.3409/fb62_3.187
- Tavakoli, S., Klar, A.S., 2020. Advanced Hydrogels as Wound Dressings. *Biomolecules* 10, 1169. <https://doi.org/10.3390/biom10081169>
- Ten, E., Bahr, D.F., Li, B., Jiang, L., Wolcott, M.P., 2012. Effects of Cellulose Nanowhiskers on

- Mechanical, Dielectric, and Rheological Properties of Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate)/Cellulose Nanowhisker Composites. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 2941–2951. <https://doi.org/10.1021/ie2023367>
- Tontul, I., Topuz, A., 2017. Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science & Technology* 63, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>
- Ujang, Z., Rashid, A.H.A., Suboh, S.K., Halim, A.S., Lim, C.K., 2014. Physical Properties and Biocompatibility of Oligochitosan Membrane Film as Wound Dressing. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* 12, 155–162. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000190>
- Varaprasad, K., Mohan, Y.M., Vimala, K., Mohana Raju, K., 2011. Synthesis and characterization of hydrogel-silver nanoparticle-curcumin composites for wound dressing and antibacterial application. *Journal of Applied Polymer Science* 121, 784–796. <https://doi.org/10.1002/app.33508>
- Verma, J., Kanoujia, J., Parashar, P., Tripathi, C.B., Saraf, S.A., 2017. Wound healing applications of sericin/chitosan-capped silver nanoparticles incorporated hydrogel. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 7, 77–88. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0322-y>
- Vieyra, H., Juárez, E., López, U.F., Morales, A.G., Torres, M., 2018. Cytotoxicity and biocompatibility of biomaterials based in polyhydroxybutyrate reinforced with cellulose nanowhiskers determined in human peripheral leukocytes. *Biomed. Mater.* 13, 045011. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aaaaf4>
- Vildanova, R.R., Petrova, S.F., Kolesov, S.V., Khutoryanskiy, V.V., 2023. Biodegradable Hydrogels Based on Chitosan and Pectin for Cisplatin Delivery. *Gels* 9, 342. <https://doi.org/10.3390/gels9040342>
- Vo, T.S., Vo, T.T.B.C., Tran, T.T., Pham, N.D., 2022. Enhancement of water absorption capacity and compressibility of hydrogel sponges prepared from gelatin/chitosan matrix with different polyols. *Progress in Natural Science: Materials International* 32, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2021.10.001>
- Volod'ko, A.V., Davydova, V.N., Nedashkovskaya, O.I., Terentieva, N.A., Chusovitin, E.A., Galkin, N.G., Yermak, I.M., 2018. Morphology, electrokinetic characteristics and the effect on biofilm formation of carrageenan:chitosan polyelectrolyte complexes. *Int J Biol Macromol* 117, 1118–

1124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.215>
- Voron'ko, N.G., Derkach, S.R., Kuchina, Y.A., Sokolan, N.I., 2016. The chitosan–gelatin (bio)polyelectrolyte complexes formation in an acidic medium. *Carbohydrate Polymers* 138, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.059>
- Wang, Q., Schlenoff, J.B., 2014. The Polyelectrolyte Complex/Coacervate Continuum. *Macromolecules* 47, 3108–3116. <https://doi.org/10.1021/ma500500q>
- Wang, T., Zhang, S., Ren, S., Zhang, X., Yang, F., Chen, Y., Wang, B., 2020. Structural characterization and proliferation activity of chondroitin sulfate from the sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *International Journal of Biological Macromolecules* 164, 3005–3011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.110>
- Wang, W., Feng, Y., Chen, W., Adie, K., Liu, D., Yin, Y., 2020. Citrus pectin modified by microfluidization and ultrasonication: Improved emulsifying and encapsulation properties. *Ultrason Sonochem* 70, 105322. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105322>
- Wang, W., Ummartyotin, S., Narain, R., 2023. Advances and challenges on hydrogels for wound dressing. *Current Opinion in Biomedical Engineering* 26, 100443. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2022.100443>
- Wei, H., Li, W., Chen, H., Wen, X., He, J., Li, J., 2020. Simultaneous Diels-Alder click reaction and starch hydrogel microsphere production via spray drying. *Carbohydrate Polymers* 241, 116351. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116351>
- Weinschenk, S., Mergenthaler, C., Armstrong, C., Göllner, R., Hollmann, M.W., Strowitzki, T., 2017. Local Anesthetics, Procaine, Lidocaine, and Mepivacaine Show Vasodilatation but No Type 1 Allergy: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *BioMed Research International* 2017, e9804693. <https://doi.org/10.1155/2017/9804693>
- Westby, M.J., Dumville, J.C., Soares, M.O., Stubbs, N., Norman, G., 2017. Dressings and topical agents for treating pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011947.pub2>
- Wijnker, J.J., Koop, G., Lipman, L.J.A., 2006. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology* 23, 657–662. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.11.004>
- Woollard, A.C., Tatham, K.C., Barker, S., 2007. The influence of essential oils on the process of wound

- healing: a review of the current evidence. *Journal of Wound Care* 16, 255–257. <https://doi.org/10.12968/jowc.2007.16.6.27064>
- Wu, X., Sun, H., Qin, Z., Che, P., Yi, X., Yu, Q., Zhang, H., Sun, X., Yao, F., Li, J., 2020. Fully physically crosslinked pectin-based hydrogel with high stretchability and toughness for biomedical application. *International Journal of Biological Macromolecules* 149, 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.297>
- Xiong, W., Li, Y., Ren, C., Li, J., Li, B., Geng, F., 2021. Thermodynamic parameters of gelatin-pectin complex coacervation. *Food Hydrocolloids* 120, 106958. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106958>
- Xu, J., Tsai, Y.-L., Hsu, S.-H., 2020. Design Strategies of Conductive Hydrogel for Biomedical Applications. *Molecules* 25, 5296. <https://doi.org/10.3390/molecules25225296>
- Xu, R., Xia, H., He, W., Li, Z., Zhao, J., Liu, B., Wang, Y., Lei, Q., Kong, Y., Bai, Y., Yao, Z., Yan, R., Li, H., Zhan, R., Yang, S., Luo, G., Wu, J., 2016. Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. *Sci Rep* 6, 24596. <https://doi.org/10.1038/srep24596>
- Xu, Z., Han, S., Gu, Z., Wu, J., 2020. Advances and Impact of Antioxidant Hydrogel in Chronic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials* 9, 1901502. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901502>
- Xue, W., Champ, S., Huglin, M.B., 2001. Network and swelling parameters of chemically crosslinked thermoreversible hydrogels. *Polymer* 42, 3665–3669. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00627-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00627-3)
- Yan, C., Yang, T., Zhu, S., Wu, H., 2017. Synthesis and properties of poly(DEX-GMA/AAC) microgel particle as a hemostatic agent. *J. Mater. Chem. B* 5, 3697–3705. <https://doi.org/10.1039/C7TB00768J>
- Yang, J., Shen, M., Wu, T., Luo, Y., Li, M., Wen, H., Xie, J., 2020. Role of salt ions and molecular weights on the formation of *Mesona chinensis* polysaccharide-chitosan polyelectrolyte complex hydrogel. *Food Chemistry* 333, 127493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127493>
- Yoo, S.-H., Fishman, M.L., Hotchkiss, A.T., Lee, H.G., 2006. Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocolloids* 20, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.03.003>
- Yu, H., Xu, X., Chen, X., Lu, T., Zhang, P., Jing, X., 2007. Preparation and antibacterial effects of PVA-

- PVP hydrogels containing silver nanoparticles. *J of Applied Polymer Sci* 103, 125–133. <https://doi.org/10.1002/app.24835>
- Zain, N., 2014. Preparation and Characterization of Cellulose and Nanocellulose From Pomelo (*Citrus grandis*) Albedo. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 05. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000334>
- Zakia, M., Koo, J.M., Kim, D., Ji, K., Huh, P., Yoon, J., Yoo, S.I., 2020. Development of silver nanoparticle-based hydrogel composites for antimicrobial activity. *Green Chemistry Letters and Reviews* 13, 34–40. <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1725149>
- Zhang, K., Xian, Y., Li, M., Pan, Z., Zhu, Z., Yang, Y., Wang, H., Zhang, L., Zhang, C., Wu, D., 2023. Gelable and Adhesive Powder for Lethal Non-Compressible Hemorrhage Control. *Advanced Functional Materials* 33, 2305222. <https://doi.org/10.1002/adfm.202305222>
- Zhang, M., Zeng, G., Pan, Y., Qi, N., 2018. Difference research of pectins extracted from tobacco waste by heat reflux extraction and microwave-assisted extraction. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 15, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.022>
- Zhou, C., Sheng, C., Chen, J., Liang, Y., Liu, Q., Li, P., Huang, X., Liu, B., 2022. Gradual hydrogel degradation for programable repairing full-thickness skin defect wound. *Chemical Engineering Journal* 450, 138200. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138200>
- Zhu, J., Zhong, K., Zong, Y., Wang, S., Yang, H., Zhen, L., Tao, S., Sun, L., Yang, J., Li, J., 2022. A mussel-inspired wet-adhesion hydrogel with hemostasis and local anti-inflammation for managing the development of acute wounds. *Materials & Design* 213, 110347. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110347>

9 INFORMACIÓN EXTRA:

9.1 Listado de publicaciones, participaciones, ponencias, congresos.

9.1.1 Publicaciones.

9.1.1.1 Capítulos de Libro.

- Estado: Publicado. Ferrante M., Alvarez V. & Gonzalez J., "Chapter 21. Current Applications of Biomolecules in Biomedical Engineering". 2023. En Chandrabhan Verma, Dakeshwar Kumar Verma (Ed.), Biomolecules (Fundamentals, Properties and Current Applications). <https://doi.org/10.1016/C2021-0-00444-2>
- Estado: Publicado. Ferrante M., Alvarez V., Narain R. & Gonzalez J., "Properties of hydrogels". En Ravin Narain (Ed.), Natural and Synthetic Hydrogels. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-16168-1.00001-5>
- Estado: Enviado. Ferrante M., & Gonzalez J., "Natural biomaterials-based antimicrobial biocomposites". En Md Saquib Hasnain, Ibrahim M. El-Sherbiny, Amit Kumar NayakVerma (Ed.), Natural Composites for Biomedical Applications.

9.1.1.2 Artículos científicos en revistas indexadas.

- Ferrante, M., Alvarez, V.A., Gende, L.B. et al. Polyelectrolyte complexes hydrogels based on chitosan/pectin/NaCl for potentially wound dressing: development, characterization, and evaluation. Colloid Polymer Science (2024). <https://doi.org/10.1007/s00396-024-05261-y>
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera Alejandra; Narain, Ravin; Ounkaew, Artjima; González, Jimena Soledad. Enhancing the Properties of Chitosan-Pectin Hydrogels with Cellulose Nanowhiskers for Potential Applications in Wound Dressings. Macromolecular Chemistry and Physics (2024). <https://doi.org/10.1002/macp.202400088>
- Ferrante, M., González, A., Álvarez, V. A., González, J.S. Hidrogeles basados en polielectrolitos naturales para el cuidado de heridas. Revista Plásticos Modernos (2024). ISSN: 0034-8708.

- Rodriguez G., P., D'Ippólito, S., Nercessian, D., Ferrante, M., Alvarez, V.A., Gonzalez, J.S. Polyelectrolytes Complex-Based Hydrogels Derived from Natural Polymers and Cannabinoids for Applications as Wound Dressing. Polysaccharides (2024). <https://doi.org/10.3390/polysaccharides5040036>
- Ferrante, M., Casado, Ulises., Álvarez, V.A., Gonzalez, J.S. Mechanical, rheological, nanoindentation and degradability evaluation of soft composite Chitosan/Pectin/NaCl hydrogels with cellulose nanowhiskers. Journal of Polymer Science (2025). <https://doi.org/10.1007/s10965-024-04234-7>
- Ferrante, M., Gallo, M. B., Gende, L. B., Consolo, V. F., Álvarez, V. A., & González, J. S. Synthesis and characterization of gelatin/chondroitin sulfate microgels with NaCl: Preliminary research toward wound healing applications. International Journal of Biological Macromolecules (2025). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138953>
- (Enviado) Ferrante, M., Cisneros, M., Álvarez, V. A., González, J. S. Searching patents on natural hydrogels for wounds.
- (En redacción) Canepelle, L. M., Di Fonzo, L. M., Ferrante, M., Gende L. B., Dellatorre, F., Alvarez V. A., Gonzalez, J. S. Functional textiles using microgels based on chitosan and fucoïdan.

9.1.2 Congresos.

- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "Síntesis y caracterización de hidrogeles de complejos polielectrolitos compactos con quitosano y pectina" - VII Encuentro Argentino de Materia Blanda. Lugar: Buenos Aires (modalidad virtual); Fecha: 27 a 29 de septiembre de 2021.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "Desarrollo de hidrogeles de complejos polielectrolitos compactos de quitosano/pectina bajo distintas condiciones de ph y salinidad". XIV Simposio argentino de Polímeros. Lugar: Bahía Blanca; Fecha: 1 a 3 de diciembre de 2021.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "Obtención de hidrogeles compuestos quitosano/pectina con nanohilos de celulosa por un método simple y ecoamigable". XIV Simposio argentino de Polímeros. Lugar: Bahía Blanca; Fecha: 1 a 3 de diciembre de 2021.

- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Consolo, Fabiana Verónica; Gende, Liesel; Gonzalez, Jimena. Síntesis e incorporación de nanopartículas de plata a hidrogeles de pectina/quitosano para vendajes de heridas. SAM CONAMET 2022. Lugar: Mar del Plata; Fecha: 2 a 6 de mayo de 2022.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. Incorporación de nanohilos de celulosa y nanopartículas de plata a hidrogeles de quitosano/pectina. Fronteras en Nanobiotecnología III, Lugar: Buenos Aires; Fecha: 20 a 22 de julio de 2022.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "Nanohilos de celulosa: síntesis, caracterización e incorporación a biohidrogeles para vendajes de heridas". XXI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados. Lugar: Río Cuarto, Córdoba (modalidad virtual); Fecha: 9 a 11 de agosto de 2022.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "VENDAJES. Hidrogeles naturales biodegradables". Nanomercosur 2022, Lugar: Buenos Aires; Fecha: 16 a 17 de noviembre de 2022.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "Caracterización térmica, mecánica y físico-química de hidrogeles polielectrolitos con distintos porcentajes de nanohilos de celulosa". XXII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados. Lugar: Bahía Blanca; Fecha: 6 a 8 de septiembre de 2023.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena; Narain, Ravin. "Citotoxicidad de hidrogeles compuestos de quitosano/ pectina con nanohilos de celulosa". XXII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados. Lugar: Bahía Blanca; Fecha: 6 a 8 de septiembre de 2023.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena; Narain, Ravin. "Ensayos antimicrobianos y de citotoxicidad celular en hidrogeles de quitosano y pectina". XV Simposio Argentino de Polímeros. I Congreso Argentino de Materiales Compuestos. Lugar: Mar del Plata; Fecha: 4 al 7 de diciembre de 2023.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "Formulación y selección de hidrogeles de gelatina y condroitín sulfato". XV Simposio Argentino de Polímeros. I Congreso Argentino de Materiales Compuestos. Lugar: Mar del Plata; Fecha: 4 al 7 de diciembre de 2023.

- Ferrante, Micaela; Casado, Ulises; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "Propiedades mecánicas de hidrogeles de quitosano/pectina/NaCl reforzados con nanohilos de celulosa". XXII Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales, SAM-CONAMET 2024. Lugar: Buenos Aires; Fecha: 6 al 9 de agosto de 2024.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera; Gonzalez, Jimena. "Microgeles de gelatina y condroitín sulfato para hemostasia de heridas: síntesis y caracterización. XXII Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales, SAM-CONAMET 2024. Lugar: Buenos Aires; Fecha: 6 al 9 de agosto de 2024.
- Ferrante, Micaela; Alvarez, Vera A.; Gende, Lisel B.; Consolo, Verónica F.; Gallo, Micaela B.; Gonzalez, Jimena S. "Microgeles antimicrobianos de gelatina y condroitín sulfato de nanopartículas de plata". V Workshop virtual de polímeros biodegradables y biocompuestos, BIOPOLI. Lugar: Mar del Plata (modalidad virtual); Fecha: 27 al 29 de noviembre de 2024.