



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

**EFFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE
ENTRECruzAMIENTO SOBRE LAS PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE ANDAMIOS DE
QUITOSANO-COLÁGENO**

Tesis que presenta
VICTOR ALONSO REYNA URRUTIA

En opción al título de
**DOCTORADO EN CIENCIAS
MATERIALES POLIMÉRICOS**

**Mérida, Yucatán, México
Junio, 2019**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS EN MATERIALES POLIMÉRICOS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Víctor Alonso Reyna Urrutia** titulado **Efecto de Diferentes Métodos de Entrecruzamiento sobre las Propiedades Fisicoquímicas y Biológicas de Andamios de Quitosano-Colágeno** fue realizado en la Unidad de Materiales, dentro de la línea de investigación "Materiales para Medicina Regenerativa" del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del **Dr. José Manuel Cervantes Uc**, perteneciente al Programa de Doctorado en Ciencias, del Posgrado en Materiales Poliméricos, del Centro.

Atentamente

Dra. Clélia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de mayo de 2019.

A Dios

A mis padres Víctor Reyna Orozco y Norma Urrutia Contreras

A mi hermano Rodrigo Reyna, tíos y primos

A mi compañera de vida María Fernanda Zavala Oros

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca económica con número 169398 que me brindó durante mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. por aceptarme para realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones.

A mi director de Tesis, el Dr. José Manuel Cervantes Uc. Gracias por ser un excelente maestro y ser humano; por todas sus enseñanzas, por compartir sus conocimientos, por su infinita paciencia y comprensión.

A la Dra. Verónica Mata Haro por ser parte de mi comité y compartir sus enseñanzas con los ensayos celulares durante la estancia en Sonora.

Al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por su orientación y consejo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao, Q.I. Rossana Vargas Coronado, Q.I. Santiago Duarte Aranda y M.C. José Martín Bass López por sus consejos y ayuda técnica en la realización de los experimentos.

A la M.C. Leticia Félix Valenzuela y M.C. Joel Said García Romo por su apoyo en la Microscopía de Fluorescencia.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio: Rita Sulub, Soledad Pech, David Alejandro, Ena Bolaina, Carlos Bellaner por compartir sus conocimientos, su apoyo y buenos momentos.

A todos mis amigos de Mérida y Sonora por su amistad y apoyo sincero.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Capítulo 1	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1 Ingeniería de Tejidos (IT)	5
1.2 Piel: función y estructura	6
1.2.1 La epidermis	7
1.2.2 La dermis	8
1.2.3 El tejido subcutáneo	8
1.3 Selección del material para la obtención de andamios	9
1.3.1 Quitosano (QS)	10
1.3.1.1 Características fisicoquímicas	11
1.3.1.2 Propiedades fisicoquímicas	14
1.3.2 Colágeno	15
1.4 Elaboración de un andamio	17
1.4.1. Hidrogel	17
1.4.2. Andamios Porosos 3D	18
1.4.2.1. Porosidad	19
1.4.2.2. Tamaño de poro	19
1.4.2.3. Biocompatibilidad y biofuncionalidad	20
1.4.2.3.1. Inmunogenicidad	20
1.4.2.3.2. Antigenicidad	20
1.4.2.4. Propiedades de la superficie	20
1.4.2.5. Propiedades mecánicas	20
1.4.2.6. Biodegradabilidad	21
1.5 Tecnologías para obtener andamios o soportes 3D	21
1.5.1 Liofilización	22
ANTECEDENTES	23
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo general	28

2.2	<i>Objetivos particulares</i>	28
Capítulo 2		29
METODOLOGÍA.....		29
2.1	<i>Materiales</i>	29
2.2	<i>Caracterización fisicoquímica del Quitosano</i>	29
2.2.1	Peso Molecular.....	29
2.2.2	Grado de acetilación.....	30
2.3	<i>Obtención de andamios 3D</i>	31
2.3.1	QS-HA.....	31
2.3.2	QS-AC.....	31
2.3.3	QS-GA.....	32
2.3.4	QS-Co-AH, QS-Co-AC y QS-Co-GA.....	32
2.4	<i>Caracterización fisicoquímica de andamios 3D</i>	33
2.4.1	Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	33
2.4.2	Mapeo de Nitrógeno por análisis EDX.....	33
2.4.3	Área superficial.....	33
2.4.4	Estructura (FTIR).....	33
2.4.5	Análisis termogravimétrico.....	34
2.4.6	Absorción de humedad.....	34
2.4.7	Degradación In vitro.....	34
2.5	<i>Evaluación de las propiedades bioactivas de los andamios 3D</i>	35
2.5.1	Esterilización de muestras.....	35
2.5.2	Biocompatibilidad.....	35
2.5.2.1	Método indirecto.....	35
2.5.2.2	Método directo.....	36
2.5.3	Proliferación Celular.....	37
2.6	<i>Análisis Estadístico</i>	37
Capítulo 3		38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		38
3.1	<i>Caracterización fisicoquímica del QS</i>	38
3.1.1	Peso Molecular.....	38
3.1.2	Grado de acetilación.....	41
3.2	<i>Obtención de andamios 3D</i>	43
3.2.1	Aspecto físico de los hidrogeles.....	43
3.2.2	Morfología.....	45
3.2.3	Mapeo de Nitrógeno por análisis EDX.....	48
3.2.4	Distribución de tamaño de poro y área superficial.....	50

3.2.5	Estructura (FTIR)	57
3.2.6	Análisis Termogravimétrico (TGA).....	59
3.2.7	Absorción de humedad	60
3.2.8	Degradación in vitro.....	62
3.3	<i>Evaluación de las propiedades biológicas</i>	63
3.3.1	Biocompatibilidad.....	63
3.3.2	Proliferación fibroblastos L929 sobre andamios.....	66
	CONCLUSIONES.....	69
	RECOMENDACIONES.....	71
	BIBLIOGRAFÍA.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Corte transversal de la piel²².	7
Figura 1.2. Modelo de la estructura del quitosano.	11
Figura 1.3. Polimorfos de la quitina en la naturaleza y ejemplos biológicos de cada uno de ellos. Las flechas representan la disposición de las cadenas poliméricas.	13
Figura 1.4. Estructura del colágeno⁵⁰.	16
Figura 3.1. Representación de Huggins, Kraemer y Punto único, a 25°C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para QPP.	40
Figura 3.2. Representación de Huggins, Kraemer y Punto único, a 25°C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para QPM.	40
Figura 3.3. Espectros de FTIR de quitosanos QPP y QPM.	41
Figura 3.4. Espectros de 13C RMN de A) QPM y B) QPP.	42
Figura 3.5. Hidrogeles de quitosano (parte superior) y andamios 3D (parte inferior) para HA, AC y GA.	44
Figura 3.6. Micrografías de MEB de andamios QPP obtenidos a una magnificación de 500x.	46
Figura 3.7. Micrografías de MEB de andamios QPP obtenidos a una magnificación de 2500x. Círculo azul: poros interconectados; Flecha Roja: Zona densa.	46
Figura 3.8. Micrografías de MEB de andamios QPM obtenidos a una magnificación de 500x. Flecha verde: zona no porosa; círculo verde: zona porosa; flechas rojas: estructura densa.	48
Figura 3.9. Micrografías de MEB de andamios QPM obtenidos a una magnificación de 2500x. Flecha verde: zona no porosa.	48
Figura 3.10. Micrografías MEB de fibras de colágeno a una magnificación de 500x (A) y 2500x (B).	48
Figura 3.11. Mapeo de nitrógeno MEB-EDX para muestras de QPP que contienen colágeno (fila inferior) y sin colágeno (fila superior).	49
Figura 3.12. Mapeo de nitrógeno MEB-EDX para muestras de QPM que contienen colágeno (fila inferior) y sin colágeno (fila superior).	50
Figura 3.13. Distribuciones de tamaños de poro de los andamios 3D obtenidos por liofilización de hidrogeles de quitosano QPP.	52
Figura 3.14. Distribuciones de tamaños de poro de los andamios 3D obtenidos por liofilización de hidrogeles de quitosano QPM.	52

Figura 3.15. Isotermas BET de adsorción y desorción de Nitrógeno de andamios sin colágeno para los quitosanos QPP y QPM.	55
Figura 3.16. Isotermas BET de adsorción y desorción de Nitrógeno de andamios con colágeno para los quitosanos QPP y QPM.	56
Figura 3.17. Espectros de FTIR de los andamios de quitosano QPP; A) sin colágeno y B) con colágeno.....	58
Figura 3.18. Espectros de FTIR de los andamios de quitosano QPM; A) sin colágeno y B) con colágeno.....	59
Figura 3.19. Análisis termogravimétrico de los andamios de quitosano QPP (A) y QPM (B), así como del colágeno tipo I en estado puro.....	60
Figura 3.20. Porcentaje de absorción de humedad del 50 ± 1 % de andamios 3D: A) QPP y B) QPM	61
Figura 3.21. Porcentaje de absorción de humedad del 91 ± 1 % de andamios 3D: A) QPP y B) QPM	61
Figura 3.22. Pérdida de masa progresiva de los andamios con A) QPP y B) QPM después del almacenamiento en PBS a 37 °C con 1.5 μg/mL de lisozima. Los datos que se observan son el valor promedio \pm la desviación estándar (n=3).....	63
Figura 3.23. Biocompatibilidad de andamios 3D de QPP con fibroblastos L929 por contacto indirecto. Azul de tripán y ensayo MTT. CN: control negativo (DMSO), CP: control positivo (Medio RPMI 1640), *$p < 0.05$, prueba de Tukey.....	64
Figura 3.24. Biocompatibilidad de andamios 3D de QPP con fibroblastos L929 por contacto directo. Azul de tripán y ensayo MTT. CN: control negativo (DMSO), CP: control positivo (Medio RPMI 1640), *$p < 0.05$, prueba de Tukey.	65
Figura 3.25. Biocompatibilidad de andamios 3D de QPM con fibroblastos L929 por contacto indirecto. Azul de tripán y ensayo MTT. CN: control negativo (DMSO), CP: control positivo (Medio RPMI 1640), *$p < 0.05$, prueba de Tukey.....	65
Figura 3.26. Biocompatibilidad de andamios 3D de QPM con fibroblastos L929 por contacto directo. Azul de tripán y ensayo MTT. CN: control negativo (DMSO), CP: control positivo (Medio RPMI 1640), *$p < 0.05$, prueba de Tukey.	66
Figura 3.27. Micrografías de microscopía epifluorescencia (20X) del cultivo de células L929 sobre andamios 3D de QPP a los 14 días	67
Figura 3.28. Micrografías de microscopía epifluorescencia (20X) del cultivo de células L929 sobre andamios 3D de QPM a los 14 días.	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Características de algunos colágenos ^{50,51}	17
Tabla 1.2. Andamios para la regeneración de piel.	23
Tabla 2.1. Diferentes tipos de entrecruzamientos utilizados en la obtención de los andamios 3D	32
Tabla 3.1. Tiempos de elución para las disoluciones de QPP.	38
Tabla 3.2. Tiempos de elución para las disoluciones de QPM.	38
Tabla 3.3. Parámetros viscosimétrico del QPP a 25°C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.	39
Tabla 3.4. Parámetros viscosimétrico del QPM, a 25°C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.....	39
Tabla 3.5. Porcentajes de N-acetilación y de desacetilación calculados para QPP y QPM por técnicas de ATR-FTIR y ¹³ C RMN.	43
Tabla 3.6. Área superficial (S _{BET}) y promedio del tamaño de poro (T _{pMEB}) de los andamios-3D.	54

RESUMEN

Métodos de entrecruzamiento químico y físico utilizando glutaraldehído e hidróxido de amonio, respectivamente, fueron utilizados para entrecruzar hidrogeles de quitosano (con dos pesos moleculares diferentes) y quitosano-colágeno; posteriormente, estos materiales fueron sometidos a un proceso de secado por liofilización para obtener andamios tridimensionales (3D). Se analizó el efecto de los métodos de entrecruzamiento sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los andamios. Los resultados indicaron que el método de entrecruzamiento juega un papel fundamental en la morfología, tamaño de poro promedio, distribución del tamaño de poro, degradación y citotoxicidad de los andamios; también se observaron algunas diferencias en estos parámetros al cambiar el peso molecular del quitosano utilizado. En general, los andamios entrecruzados físicamente exhibieron morfologías más homogéneas, con un tamaño de poro de entre 10 μm -18 μm y mayor interconectividad en comparación con los otros andamios; además estos andamios mostraron una viabilidad del 80-90%. Los andamios sometidos a un cambio de fase con acetona, presentaron contracción, un tamaño de poro más pequeño de 5.24 μm -7.71 μm y tasas de degradación del 30-50%. Finalmente, los materiales entrecruzados químicamente con glutaraldehído resultaron citotóxicos con valores de biocompatibilidad por abajo del 70% y exhibieron morfologías heterogéneas con tamaños de poro de 10 μm -40 μm . El peso molecular del quitosano parece no afectar las propiedades de los andamios obtenidos, aunque se observó cierto efecto en la distribución de tamaños de poro, área superficial específica y absorción de humedad. La incorporación de colágeno a los andamios genera materiales con mayor grado de porosidad y tiende a reducir el efecto citotóxico del glutaraldehído aumentando del 70% al 90% la viabilidad del andamio. Los resultados obtenidos sugieren que los andamios de quitosano entrecruzados físicamente, con y sin colágeno, resultan atractivos para ser utilizados en la ingeniería de tejidos.

ABSTRACT

Chemical and physical crosslinking methods, using glutaraldehyde and ammonium hydroxide respectively, were used to prepare chitosan (with two different molecular weights) and chitosan/collagen hydrogels; these materials were then ~~subjected to~~ freeze-dried to obtain 3D porous scaffolds. The effect of crosslinking methods on the physicochemical and biological properties of the scaffolds was studied. Results indicated that crosslinking method plays a key role on morphology, average pore size, pore size distribution, degradation and cytotoxicity of the scaffolds; some differences in these properties were observed when molecular weight was varied. Physically crosslinked scaffolds exhibited a homogeneous morphology with with a pore size between 10 μm -18 μm and greater interconnectivity in comparison to other prepared scaffolds; also, these samples, these scaffolds showed a biocompatibility of 80-90%. Scaffolds derived from hydrogels treated with acetone showed shrinkage, smaller pore size a smaller pore size of 5.24 μm -7.71 μm and degradation rates of 30-50%; Finally, the materials crosslinked chemically with glutaraldehyde were cytotoxic with viability values below 70% and exhibited heterogeneous morphologies with pore sizes of 10 μm -40 μm .. Molecular weight of chitosan seems not affect the properties of obtained scaffolds, but pore size distribution, specific surface area and water absorption exhibited some variations. The addition of collagen to chitosan scaffolds yields materials with higher porosity and tends to reduce the cytotoxic effect of GA, increasing the viability of the scaffolding from 70% to 90%. Overall, these results suggest that the scaffolds physically crosslinked, with and without collagen, results are very attractive materials to use in tissue engineering

INTRODUCCIÓN

Existen distintos materiales empleados en la elaboración de andamios para ingeniería de tejidos; algunos son de origen sintético y otros de origen natural, siendo el quitosano (QS) uno de los más importantes de este último grupo. Este es un polisacárido que comúnmente es obtenido mediante la desacetilación extensiva de la quitina de algunos crustáceos¹. El QS es un biopolímero que puede utilizarse en diversas aplicaciones biomédicas debido a su baja toxicidad y a sus propiedades bioactivas (hemostático, actividad antimicrobiana, biocompatibilidad, etc.). Además, presenta disponibilidad comercial, a un costo relativamente bajo, y se ha usado ampliamente para elaborar biomateriales en el campo farmacéutico y médico².

Otro material que se ha utilizado para la elaboración de soportes es el colágeno (Co) tipo I; esta es la proteína principal de la matriz extracelular de muchos tejidos de los mamíferos^{3,4}. El Co no presenta inmunogenicidad, es biocompatible y biodegradable. Debido a las propiedades antes mencionadas, se ha utilizado en la fabricación de materiales para la liberación de fármacos, apósitos para ayudar a la cicatrización de heridas, sellador del tejido vascular y, en la elaboración de soportes (andamios) para la ingeniería de tejidos⁵⁻⁸.

Hoy en día se han estudiado biomateriales compuestos (QS-Co) para fines farmacéuticos y médicos. Estos se han elaborado por medio de una variedad de técnicas como el electrohilado o liofilizado, utilizando agentes entrecruzantes para mejorar sus propiedades mecánicas y de estabilidad química⁹⁻¹¹; sin embargo, estos agentes de entrecruzamiento afectan las propiedades biológicas del material, las cuales son muy importantes en las pruebas de biocompatibilidad. En algunos estudios, se ha encontrado una mejor biocompatibilidad y viabilidad celular (fibroblastos) en soportes fabricados por el proceso de liofilización en comparación con el electrohilado¹². A pesar de lo anterior, durante el proceso de congelación del soporte se ven afectadas las cadenas del QS, formándose aglomeraciones que reducen la disponibilidad de los grupos funcionales relacionados con la biocompatibilidad de la molécula de QS¹³. Para disminuir este efecto se han utilizado distintos agentes entrecruzantes como el glutaraldehído, la genipina, el oxaldehído,

etc., aunque estos compuestos han sido considerados citotóxicos o presentan biocompatibilidad desconocida¹⁴. Es por esto que se pretende estudiar un método alternativo de formar un gel QS-Co sin emplear compuestos químicos citotóxicos como agentes entrecruzantes, con la finalidad de no afectar la biocompatibilidad del material, así como dejar de utilizar los grupos aminos disponibles en la molécula de QS, los cuales generalmente se ven involucrados en la reacción de entrecruzamiento; de esta manera, se evitaría una disminución de la funcionalidad de los biomateriales (QS-Co), imitando la estructura extracelular de los tejidos. Este procedimiento utiliza hidróxido de amonio, el cual genera enredamientos físicos en lugar de reacciones de entrecruzamiento químico.

En el capítulo 1 de este trabajo se describe brevemente la anatomía del tejido epitelial y se presenta una revisión bibliográfica acerca de la importancia de los polímeros para la ingeniería del tejido epitelial. El capítulo 2 describe detalladamente los materiales y la metodología utilizada para la fabricación y caracterización de los andamios fabricados. En el capítulo 3 se presenta los resultados de los análisis fisicoquímicos y biológicos de los andamios poliméricos, así como la discusión de los mismos. Finalmente, se presentan las conclusiones a las que se llegaron con los resultados obtenidos en este trabajo.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Ingeniería de Tejidos (IT)

Esta disciplina consiste en el uso de los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica, orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales de los mamíferos, y en el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función. En otras palabras, la IT es el montaje tridimensional de tejidos u órganos vitales, mediante un proceso que incluye células, señales y respuestas, así como una matriz extracelular ¹⁵.

El concepto de IT tiene una gran variedad de aplicaciones en la medicina regenerativa, término utilizado para definir el reemplazo, reparación o el realce funcional de tejidos y órganos.

La IT es una de las áreas con más potencial dentro de la medicina regenerativa. La utilización de esta metodología implicaría la disminución de los problemas relacionados como: las intervenciones costosas y dolorosas para la extracción de tejido en caso de los autoinjertos, la disponibilidad de donantes y las reacciones de rechazo (en el caso de los aloinjertos), así como el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas en el caso de los xenoinjertos.

La IT se basa en la utilización de biomateriales denominados de tercera generación, es decir, aquellos materiales diseñados para interactuar con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular-molecular y la interacción de las propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material, actuando como andamios temporales en la reparación de defectos en los tejidos. Dentro de esta área, existen dos etapas; la primera, consiste en tomar células específicas del paciente mediante una biopsia, para hacer crecer células sobre un soporte poroso tridimensional bajo condiciones de cultivo *in vitro*; la segunda, se

basa en incorporar el soporte dentro del cuerpo del paciente (*in vivo*), donde el soporte puede ser degradado con el paso del tiempo.

Una de las ventajas de la IT, es que reduce el número intervenciones quirúrgicas, permitiendo que el paciente se recupere en un período de tiempo mucho más corto. El desarrollo de piel, hueso, cartílago, músculo, tendones, componentes cardiovasculares, constituyentes del ojo y nervios son algunos ejemplos de órganos y tejidos obtenidos por medio de la IT ¹⁶⁻²¹.

1.2 Piel: función y estructura

La piel es el principal órgano de protección que recubre parte de la superficie exterior del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes del mismo, tanto por tamaño como por sus funciones. La piel es una envoltura completa sin interrupción, ya que en las regiones donde se encuentran los orificios naturales del organismo, la piel se transforma paulatinamente en una mucosa. Esta es una barrera contra agresiones mecánicas, químicas, compuestos tóxicos, cambios de temperatura, radiación UV y microorganismos. Además, la piel es esencial para el mantenimiento del equilibrio de fluidos corporales, actuando como barrera ante la posible pérdida de agua, el mantenimiento del equilibrio térmico y la transmisión de una gran cantidad de información externa que accede al organismo por el tacto, la presión, la temperatura y los receptores del dolor ^{22,23}.

La extensión de la piel es de alrededor de dos metros cuadrados y pesa entre 4-5 kilos; su grosor es variable, pudiendo tener menos de 0.1 milímetros en algunas zonas de piel fina (párpados) y entre 0.5 a 4 milímetros en la mayor parte del cuerpo o más de 1.5 milímetros en las plantas de los pies²².

Desde afuera hacia dentro, se distinguen tres capas de tejido (Figura 1.1), cuyo origen embriológico es totalmente distinto, perteneciendo cada capa a una capa embriológica diferente: la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo (hipodermis o subcutis). Los anexos cutáneos son las glándulas sudoríparas ecrinas, las glándulas apocrinas, el aparato pilosebáceo y las uñas.

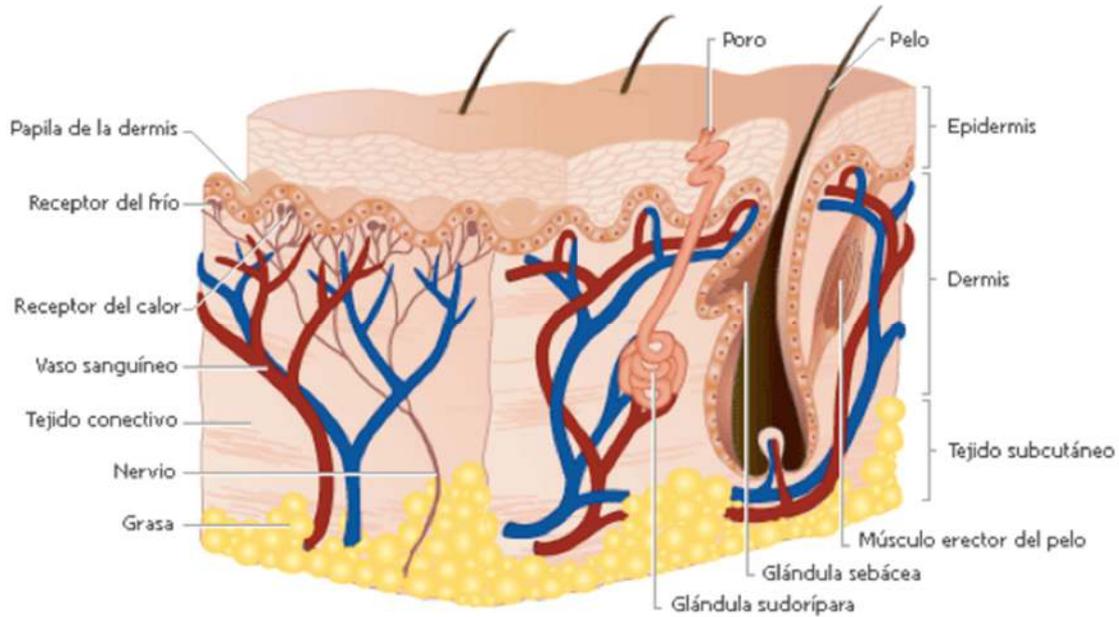


Figura 1.1. Corte transversal de la piel²².

1.2.1 La epidermis

La epidermis es un epitelio plano poliestratificado queratinizado que cubre la totalidad de la superficie corporal. Es la capa de la piel con mayor número de células y con una dinámica de recambio extraordinariamente grande. Presenta un espesor variable, con un valor medio de 0.1 mm, pudiendo alcanzar espesores de 1 ó 2 mm en zonas como las plantas de los pies y las palmas de las manos. Tiene pocas terminaciones nerviosas ya que la sensibilidad de la piel se encuentra principalmente en la dermis. Se considera que la epidermis está formada por queratinocitos, debido a la capacidad de estas células de sintetizar queratina²³.

Aunque los queratinocitos constituyen el 80% de las células epidérmicas, también se encuentran otros tipos de células como los siguientes:

- a) Los melanocitos, que suponen alrededor del 10% de las células epidérmicas y que son las células encargadas de la síntesis de melanina, pigmento que da color a la piel y protección frente a los rayos UV²⁴.
- b) Las células de Langerhans, que son células provenientes de la médula ósea, emigradas a la piel y que forman parte del sistema inmunológico ²⁵.

c) Las células de Merkel, son células sensoriales, situadas en el estrato basal y contactan con terminaciones de neuronas sensoriales para transmitir información de tacto²³.

1.2.2 La dermis

La dermis es la estructura de soporte de la piel que le proporciona resistencia y elasticidad. Está formada básicamente de tejido conectivo fibroelástico. La matriz extracelular contiene una elevada proporción de fibras, no muy compactadas, de colágeno (>75%), elastina y reticulina. Es un tejido vascularizado que sirve de soporte y alimento a la epidermis. Constituye la mayor masa de la piel y su grosor máximo es de unos 5 mm. Entre las células que comprenden esta capa están los fibroblastos, los macrófagos, los mastocitos o células cebadas, los linfocitos, las células plasmáticas, los eosinófilos y los monocitos.

Los fibroblastos son los responsables de sintetizar y mantener en buen estado las fibras; son células de forma estrellada, con largas prolongaciones. Su actividad aumenta cuando se producen lesiones en la dermis o durante los procesos de cicatrización. Los fibroblastos sintetizan y liberan los precursores del colágeno, elastina y proteoglicanos para construir la matriz extracelular²⁶.

La matriz extracelular es el espacio libre entre los elementos celulares y fibrosos; está relleno con un fluido gelatinoso en el que las células se pueden mover libremente. Es una sustancia amorfa compuesta principalmente por proteoglicanos (heteropolisacáridos y proteínas), que debido a su gran capacidad de absorción de agua, forman una materia pegajosa y gelatinosa, que no sólo sirve como elemento de unión entre el resto de componentes celulares y fibrosos, sino que influye en la migración, la cementación y la diferenciación celular²⁷.

1.2.3 El tejido subcutáneo

Está constituido por un tejido graso y uno conjuntivo laxo de fibras más finas que la dermis. Este tejido está constituido por los adipocitos, los cuales son un importante componente de la hipodermis. El tejido fibroso separa a los adipocitos en lóbulos y lobulillos. La cantidad de adipocitos varía según la zona del cuerpo y también depende de las características personales y del dimorfismo sexual, entre otros

factores. Otra de sus funciones es la de mantener la temperatura corporal, ya que actúa como aislante. Esta protección térmica se debe a que la hipodermis es un tejido muy vascularizado y los vasos sanguíneos de estas zonas pierden poco calor. También cumple un papel de protección mecánica de estructuras vitales y es el soporte de vasos sanguíneos y nervios que pasan desde los tejidos subyacentes hacia la dermis. Además, permite el desplazamiento-movilidad de la piel sobre los planos profundos y también como un moldeador de la figura y fisonomía del individuo²⁸.

1.3 Selección del material para la obtención de andamios

La selección del material para la obtención de andamios porosos 3D es de gran importancia y en muchas ocasiones bastante compleja; la elección depende de la funcionalidad del tejido a reparar. Existen muchos materiales biocompatibles disponibles dentro de la familia de los polímeros; estos pueden modelarse con relativa facilidad en formas geoméricamente complejas y buen resultado en numerosas aplicaciones biomédicas²⁹.

La IT ha evolucionado en los últimos años apoyándose en el desarrollo y aplicación clínica de una amplia gama de materiales poliméricos biodegradables, tanto de origen natural como sintético. A pesar de que se encuentran disponibles para la elaboración de andamios una gran cantidad de estos polímeros, existe una marcada tendencia en aplicar aquellos que ya han sido utilizados para aplicaciones biomédicas bien contrastadas y cuyo uso clínico ya ha sido aprobado por la administración sanitaria de los países avanzados. No obstante, la creciente demanda de materiales y la sofisticación de nuevos implantes biomédicos, supone un reto para el desarrollo de sistemas poliméricos específicos en los que se considera no solo su composición química sino también aspectos morfológicos y geométricos.

Está claramente establecido que los requisitos necesarios para la selección de materiales biodegradables para su uso como implantes en aplicaciones biomédicas deben de ajustarse a las siguientes propiedades:

- No provocar ningún proceso inflamatorio crónico o tóxico.
- Ser metabolizado en el organismo después de cumplir su función.

- Ser fácilmente procesable para obtener la forma del soporte.
- Demostrar una durabilidad aceptable.
- Ser fácil de esterilizar.

1.3.1 Quitosano (QS)

El QS es el principal polímero derivado de la quitina y comúnmente es obtenido mediante la desacetilación extensiva de los grupos acetamidos de la quitina. La quitina fue descubierta a principios del siglo XIX por Bracconot cuando estaba trabajando con un material nitrogenado en estudios con hongos³⁰. La quitina es considerada el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa; químicamente está compuesta, en su mayoría, por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1-4)$ ³¹. Se considera el componente más abundante en la estructura esquelética de muchas especies del grupo de los invertebrados (artrópodos, moluscos, celentéreos, etc.). Al igual que la celulosa, proporciona soporte y defensa a los organismos que la contienen¹¹.

La importancia de la quitina y su riqueza en la biósfera impulsó a profundizar en la investigación sobre este polisacárido. A mediados del siglo XIX Rouget descubrió que el tratamiento térmico de la quitina con soluciones concentradas de hidróxido de potasio (KOH) modificaban su estructura confiriéndole solubilidad en soluciones ácidas diluidas; tiempo después, este compuesto fue nombrado como quitosano por Hooper-Seiler³².

El QS es un polisacárido formado por cadenas de 2-N-acetil-D-glucosamina y 2-D-glucosamina unidas por enlaces $\beta(1-4)$ (Figura 1.2). Este se encuentra en la naturaleza cumpliendo funciones estructurales en hongos, principalmente del género *Zygomycetes* y también en algunas microalgas como *Bacillariophyceae* (diatomeas)^{30,33}. A diferencia de la quitina, su característica primordial es ser soluble en medios ligeramente ácidos, lo que le confiere un carácter policationico en solución, propiedad poco frecuente entre los biopolímeros^{33,34}. A nivel industrial el QS se obtiene por desacetilación de la quitina. Generalmente se emplean procedimientos termoalcalinos para la remoción del grupo acetilo enlazado al grupo amido del carbono 2 (C2) en las unidades glucopiranosas que forman el polímero³⁵.

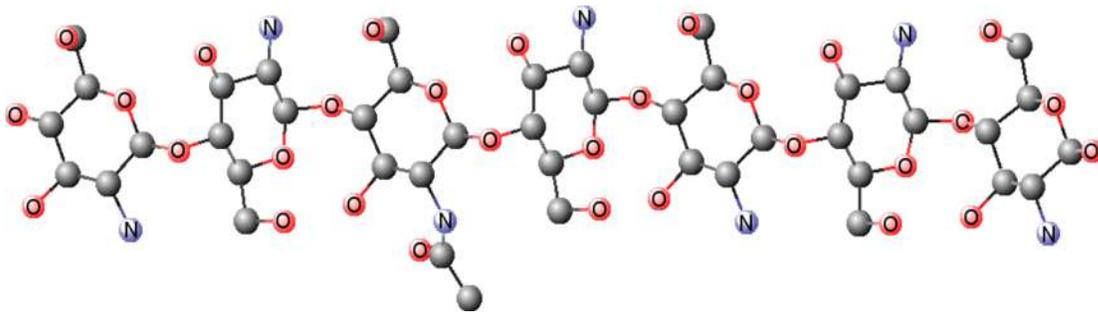


Figura 1.2. Modelo de la estructura del quitosano.

1.3.1.1 Características fisicoquímicas

La composición y dimensión de las cadenas del QS varían de acuerdo a la materia prima y al método de obtención. Es por esto que el grado de acetilación, el peso molecular y la cristalinidad son tres parámetros de alta importancia para caracterizar una muestra de quitosano.

- Grado de acetilación GA

Este parámetro está dado por el porcentaje de grupos N-acetilamina que quedan unidos en la molécula de QS y está estrechamente vinculado con sus propiedades fisicoquímicas (conformación de la molécula de quitosano con fuerzas iónicas específicas, fuerza a la elongación, resistencia, solubilidad, hinchamiento, etc.)³⁶. Otra forma de expresarlo es como grado de desacetilación (GD), que es complementario al GA, pero refleja la proporción de unidades de glucosamina respecto al total de unidades en la cadena polimérica³⁷. Cuando ocurre la hidrólisis del grupo N-acetilo, su capacidad hidrofílica aumenta ya que si se encuentran en medio ácido ocurre la protonación de los grupos aminos del QS, confiriéndole a la molécula de QS un carácter altamente reactivo³⁸. Esta reactividad influye en las propiedades bioactivas como: biodegradabilidad, biocompatibilidad, su actividad inmunológica y actividad antibacteriana. Este hecho es importante al momento de seleccionar el QS adecuado para cada aplicación. Por ejemplo, cuando se utiliza como soporte para la inmovilización de células, el quitosano con un menor grado de acetilación es más susceptible a una adhesión celular debido a una mayor disponibilidad de los grupos aminos en las cadenas de quitosano. La adhesión

también depende mucho del tipo de célula que se trabaje, por ejemplo los queratinocitos se adhieren hasta dos veces más que los fibroblastos¹¹.

Dada la importancia del GA sobre las propiedades del QS, resulta necesario realizar una determinación precisa de este parámetro. Actualmente se han desarrollado numerosos métodos para la determinación del GA, entre los que se encuentran: la espectroscopía infrarroja, espectroscopía ultravioleta, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), potenciometría y la conductimetría. Otros métodos incluyen el análisis químico elemental, la termogravimetría, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y el dicroísmo circular³⁹. Sin embargo, la espectroscopía infrarroja es una de las técnicas mayormente utilizadas; la metodología consiste en correlacionar las absorbancias de dos bandas de absorción determinadas, con la proporción de unidades acetiladas del QS³⁸.

- Peso molecular (PM)

El PM de las muestras de QS es otro parámetro que debe tomarse en cuenta ya que afecta la funcionalidad, así como su polidispersidad, la cual refleja la variabilidad de pesos moleculares que se pueden encontrar en una muestra de quitosano. Su determinación se puede llevar a cabo empleando diferentes metodologías basadas en técnicas cromatográficas, de dispersión de luz y de viscosidad⁴⁰⁻⁴².

La técnica más utilizada para la determinación del peso molecular del QS es la viscosimetría capilar. La determinación de peso molecular promedio viscosimétrico (M_v) se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca $[\eta]$. Este valor se relaciona con M_v mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) (Ecuación 1).

$$[\eta] = K \cdot M_v^\alpha \quad (1)$$

Siendo K y α , dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, su relación con el disolvente(s) utilizado(s) y la temperatura⁴³.

Debido a la polidispersidad del quitosano, se manejan distintos promedios estadísticos como índices de peso molecular, por eso se comercializa QS de bajo,

mediano o alto peso molecular⁴⁰. El coeficiente de hinchamiento del QS se ve minimizado cuando hay un descenso en el peso molecular¹¹.

-Patrón cristalino

La cristalinidad de la quitina ha sido investigada por largo tiempo. Los estudios por difracción de rayos X demostraron que la quitina, al igual que la celulosa, se encuentra en la naturaleza formando una matriz sólida hidratada compuesta por regiones amorfas en las que coexisten porciones cristalinas y altamente ordenadas. Dependiendo de su origen, la estructura cristalina de la quitina se halla presente en tres polimorfos diferentes denominados *alfa* (α), *beta* (β), y *gamma* (γ) quitina (Figura 1.3). Como en el caso de la quitina, el QS también es cristalino y muestra polimorfismo, tal como se evidencia por sus patrones de difracción de rayos X. Su estructura es diferente de los alomorfos de la quitina y las estructuras cristalinas han sido obtenidas de varias formas incluyendo formas anhidras e hidratadas, así como de varios tipos de sales. Se ha observado que la estructura cristalina depende en alguna extensión del método utilizado en la preparación de la muestra, ya que presentan estructuras de diferente estabilidad y nivel de hidratación ⁴⁴.

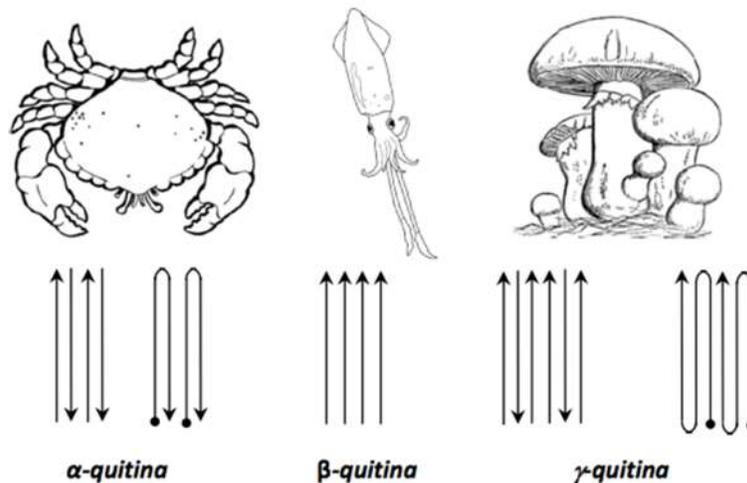


Figura 1.3. Polimorfos de la quitina en la naturaleza y ejemplos biológicos de cada uno de ellos. Las flechas representan la disposición de las cadenas poliméricas.

1.3.1.2 Propiedades fisicoquímicas

-Solubilidad

La presencia de grupos amino en las cadenas de la molécula QS permite la disolución de esta macromolécula en soluciones acuosas ácidas diluidas, con pH 6.0 o menor. La disolución del quitosano se debe a la protonación de los grupos amino, lo que genera cargas a lo largo de la cadena que se repelen entre sí, favoreciendo su dispersión en el medio. De esta manera el QS puede disolverse en ácidos inorgánicos diluidos como el clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, yodhídrico, nítrico y el perclórico⁴⁵.

El QS tiende a formar sales solubles con ácidos orgánicos de bajo peso molecular, tales como el ácido acético, fórmico, así también como con ácidos mono y dicarboxílicos. En consecuencia, las cargas positivas en la cadena dominan en gran medida el comportamiento de las soluciones de QS. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que el carácter polielectrolítico del quitosano influye en sus propiedades hidrodinámicas, ácido-base, conductimétricas y reológicas, entre otras. El carácter catiónico hace al QS único entre los polímeros de origen natural, pudiendo interactuar con compuestos cargados negativamente tales como proteínas, polisacáridos aniónicos, ácidos grasos, ácidos biliares y fosfolípidos, formando derivados que amplían enormemente su campo de acción⁴⁶.

Entre las variables más importantes a tener en cuenta al trabajar con soluciones de QS se encuentran las siguientes: la naturaleza del contra-ión de la sal de quitosano, el grado de acetilación, el peso molecular, el pH, la fuerza iónica y la adición de un no-disolvente acuoso de este biopolímero; por ejemplo, la acetona. El QS al ser una base, forma sales con ácidos y origina polielectrolitos. De esta manera, la densidad de carga del quitosano junto con el GA son dos de los principales parámetros fisicoquímicos que influyen en la solubilidad^{47,48}.

-Propiedades estructurales

El QS es un biopolímero de gran interés no solo por sus propiedades físicas y químicas, sino también por sus propiedades mecánicas. Se ha encontrado que, en solución, el QS presenta una conformación semi-flexible, o vermiforme, esto es un

ovillo con una rigidez considerable. Su comportamiento viscoelástico está influenciado por el grado de acetilación y el estado iónico de la solución, además de la influencia de la temperatura y la concentración del polímero. En un amplio intervalo de concentraciones, se comporta como un fluido no-newtoniano con adelgazamiento por deformación; solo para concentraciones y GA muy bajos se observa un comportamiento newtoniano.

El QS es un polisacárido que carece de propiedades termoplásticas ya que se degrada antes de llegar a su transición vítrea. Es por esto que en la mayoría de los procedimientos para generar materiales estructurados a partir de quitosano, requieren que éste se encuentre en solución. Por otra parte, el carácter policationico del QS también influye sobre la formación de estos complejos debido a que se pueden producir distintos tipos de interacciones físicas o químicas. Estas propiedades son tomadas en cuenta en la elaboración de partículas, cápsulas, películas, fibras, geles y estructuras porosas que dependerán en gran parte de las características fisicoquímicas (PM, GA, etc.) del QS utilizado¹¹.

1.3.2 Colágeno

La molécula de tropocolágeno es la unidad básica de las fibras de colágeno que es una triple hélice de cadenas polipeptídicas, cada una de ellas con aproximadamente 1000 residuos. Esta estructura helicoidal triple que se presenta en la Figura 1.4 (a y b), es característica del colágeno. Las cadenas individuales son hélices orientadas a la izquierda con aproximadamente 3.3 residuos/vuelta. Tres de estas cadenas se enrollan, una alrededor de las otras, hacia la derecha, con enlaces de hidrógeno que se extienden entre ellas.

El examen del modelo revela que cada tercer residuo debe encontrarse cerca del centro de la triple hélice, y esta suele ser la glicina (Gly). Cualquier cadena lateral distinta de Gly sería demasiado voluminosa. La formación de las hélices individuales del tipo colágeno también resulta favorecida por la presencia de prolina o hidroxiprolina en la molécula de tropocolágeno. Un conjunto que se repite en la secuencia es la Gly-X-Y, donde X suele ser prolina e Y, prolina o hidroxiprolina. Para realizar adecuadamente sus múltiples funciones, el colágeno presenta un gran número de variantes genéticas en los organismos superiores⁴⁹.

El colágeno es excepcional en su extensa modificación de prolina a hidroxiprolina. La mayoría de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas en la triple hélice se establecen entre los protones de las amidas y los oxígenos del grupo carbonilo, aunque los grupos -OH de la hidroxiprolina también parecen participar en la estabilización de la estructura. Las moléculas individuales de tropocolágeno se empaquetan y forman una fibra de colágeno de una manera específica (ver Figura 1.4-c). Cada molécula tiene una longitud de aproximadamente 300 nm y se solapa con su vecina en aproximadamente 64 nm, produciendo el aspecto característico de bandas de las fibras que aparecen en la Figura 1.4-d. Esta estructura proporciona una resistencia notable: las fibras de colágeno de los tendones tienen una resistencia comparable a la del cable de cobre de alta resistencia⁴⁹. Existen 28 tipos de colágeno, sin embargo, se muestran en la Tabla 1.1 los más estudiados.

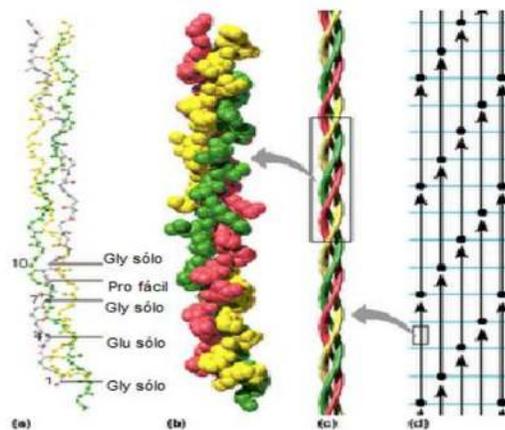


Figura 1.4. Estructura del colágeno⁵⁰.

Parte de la dureza del colágeno se debe al entrecruzamiento de las moléculas de tropocolágeno mediante una reacción que utiliza los grupos laterales de la lisina. Algunos grupos laterales de la lisina se oxidan para dar lugar a derivados aldehídicos que pueden reaccionar con otros grupos de lisina mediante una condensación aldólica y deshidratación para dar lugar a un entrecruzamiento. Este proceso sigue a lo largo de la vida y los entrecruzamientos que se acumulan hacen que el colágeno sea cada vez menos elástico y más quebradizo⁵⁰.

Tabla 1.1. Características de algunos colágenos^{50,51}.

Tipo	Organización molecular	Distribución tisular	Detalles estructurales
I	$[\alpha 1(I)]_2 [\alpha (I)]$	Dermis-Hueso-Tendón-Ligamentos-Cornea	Fibrillas estriadas de 20 a a100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras de colágeno mayores
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartílago-Núcleo pulposo y el humor vítreo del ojo	Fibras finas de 10 a 20 nm, pero en otros microambientes pueden formar fibrillas más grandes, indistinguibles morfológicamente del colágeno tipo I
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Tejido conjuntivo laxo-Vasos sanguíneos-Dermis	Constituyente importante de las fibras de 50 nm que se han llamado tradicionalmente fibras reticulares
IV	$[\alpha 1(IV)]_2$ $[\alpha 2 (IV)]$	Membrana basal-Placas anclaje	No se polimeriza en fibrillas, sino que forma un fieltro de moléculas orientadas al azar, asociados a proteoglicanos y con las proteínas estructurales, laminas y fibronectina

1.4 Elaboración de un andamio

Uno de los procedimientos que se utilizan para la formación de un andamio tridimensional es primero obtener un hidrogel que presente por sí mismo propiedades estructurales; del mismo modo dichas propiedades le confieren cierta estabilidad al gel.

1.4.1. Hidrogel

Los hidrogeles son considerados como redes tridimensionales poliméricas, hidrófilas, capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Debido a su alto contenido de agua, porosidad y consistencia suave, simulan el tejido vivo natural, más que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos⁵². Dependiendo de la naturaleza del agente entrecruzante y de las interacciones presentes en la red del hidrogel, éstos pueden clasificarse en hidrogeles químicos o físicos.

En los hidrogeles de carácter químico se involucra la formación de enlaces covalentes entre las cadenas y puede lograrse empleando monómeros multifuncionales a bajas concentraciones o mediante el acoplamiento de radicales generados por radiación⁵³. Los entrecruzantes químicos permiten obtener redes permanentes en el hidrogel; en el caso del quitosano entrecruzado las redes pueden

ser preparadas usando los grupos químicos disponibles $-OH$ y $-NH_2$. Muchas moléculas bifuncionales han sido usadas para entrecruzar quitosano, incluyendo glutaraldehído, genipina, diglicidil éter, disocianato, diacrilatos, formaldehído entre otros^{54,55}.

Por ejemplo, las aminas del quitosano reaccionan con compuestos carbonílicos (como los aldehídos) por medio de una adición nucleofílica; cuando la amina es primaria y el producto de adición final sufre una deshidratación para formar un compuesto que contiene un doble enlace carbono nitrógeno ($C=N$), el cual se llama enlace imina⁵⁶. Este tipo de hidrogeles pueden ofrecer propiedades deseables pero la biocompatibilidad de muchos entrecruzantes son desconocidas y otros han sido considerados relativamente tóxicos⁵⁴.

En contraste, el entrecruzamiento físico se debe a interacciones secundarias no covalentes como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas o interacciones dipolo-dipolo⁵³. También se puede formar mediante complejos polielectrolíticos los cuales se forman mediante la adición de una disolución polimérica, que lleva incorporado un grupo aniónico en el sustituyente lateral de la cadena principal, sobre otra disolución que posea grupos potencialmente catiónicos. Este proceso provoca la formación de enlaces iónicos entre las cargas de signos opuestos entre el polímero y el de la disolución⁵⁴. Estos hidrogeles enlazados físicamente tienen la ventaja de formar geles sin el uso de entrecruzantes.

Las propiedades de los hidrogeles dependerán principalmente de su densidad de entrecruzamiento y este parámetro determinará la solubilidad, el porcentaje de hinchamiento, el tamaño del poro del material, el área total superficial y la resistencia mecánica del polímero⁵⁷.

1.4.2. Andamios Porosos 3D

Los andamios porosos tridimensionales son materiales que proporcionan a las células el soporte necesario para su proliferación y diferenciación; e idealmente deben poseer una arquitectura similar al tejido a reparar. Las células interactúan con los andamios de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual

induce la liberación de factores de crecimiento mientras se sintetizan una propia matriz extracelular, proporcionando un ambiente (arquitectura específica) que sirve como reservorio de agua, citoquinas y factores de crecimiento, etc.⁵⁸

En función de lo que se requiera reparar (piel) se crea un soporte o andamio, que imite la forma de ese tejido u órgano y se pone en contacto con las células que van a formar ese tejido (en nuestro caso fibroblastos) y las moléculas necesarias para que se lleve a cabo el proceso (denominados factores de crecimiento, que son específicos para cada tejido y activan la división de las células).

Mientras el soporte aporta consistencia al tejido a reparar, las células empiezan a multiplicarse dentro por la acción de las señales químicas que favorecen su crecimiento. En poco tiempo, la masa de las células va aumentando y llenando el espacio libre. Las células a la vez se van organizando y adquiriendo la forma del armazón. Estos andamios deben ser biodegradables y ser reabsorbidos una vez que han desarrollado su función. Cuando llega este momento, las células del interior del soporte entran en contacto con las del órgano *in vivo* regenerándolo.

Los andamios tridimensionales para la IT deben satisfacer ciertos criterios⁵⁹:

1.4.2.1. Porosidad.

Debe poseer poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes y gases, así como para la remoción de desechos metabólicos derivados de la actividad celular.

1.4.2.2. Tamaño de poro

El tamaño y la estructura del poro en un soporte biodegradable pueden influir dramáticamente el comportamiento celular, por lo que este efecto podría ser explotado en la fabricación y caracterización de este tipo de material en la IT. Para los soportes porosos, un macroporo apropiado da paso a la proliferación celular requiriendo muchas veces para ello tamaños de poro de 100-200 μm ; aunque esponjas microcelulares con diámetros de poro de 10-100 μm demuestran óptimos crecimientos de fibroblastos en la regeneración de tejidos⁶⁰.

1.4.2.3. Biocompatibilidad y biofuncionalidad

Las características más importantes que deben presentar los biomateriales son su biofuncionalidad y biocompatibilidad. Generalmente, la funcionalidad se cubre satisfactoriamente con las características que poseen los materiales utilizados. Sin embargo, lo primordial es que un material sea compatible, es decir, que desencadene una respuesta adecuada en el organismo.

1.4.2.3.1. Inmunogenicidad.

Es la potencia o capacidad que tiene una molécula para generar una respuesta inmune y depende tanto de su naturaleza, como de la inherente al individuo en el que actúa (receptor). Esta puede ser de manera celular, porque se estimulan los linfocitos T, o bien humoral, cuando además de estimular los linfocitos b se generan anticuerpos⁶¹.

1.4.2.3.2. Antigenicidad.

Capacidad de producir una respuesta inmune específica. El grado de antigenicidad depende de la cantidad y la clase de una sustancia determinada, de la sensibilidad del receptor al antígeno y de su capacidad de producir anticuerpos. Todo inmunógeno es antígeno pero todo antígeno no es inmunógeno⁶².

1.4.2.4. Propiedades de la superficie

Tanto las propiedades químicas como las topográficas pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular; las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material.

1.4.2.5. Propiedades mecánicas

Los valores de las propiedades mecánicas van a depender del tejido u órgano a reemplazar, así como también dependerá de las fuerzas mecánicas a las que se verá expuesto el soporte. La bio-estabilidad de muchos implantes dependen de factores como la elasticidad. Los tejidos existentes en el ser humano tienen propiedades mecánicas que les permiten cumplir una función específica⁶³.

1.4.2.6. Biodegradabilidad

En la mayoría de los polímeros biodegradables, la hidrólisis es uno de los mecanismos de degradación. Existen varios factores que pueden influir en la velocidad de degradación: el tipo de enlace químico, el pH, la composición de los materiales y su carácter hidrófilo o hidrófobo. Los cambios físicos y químicos que ocurren durante la degradación de los polímeros biodegradables, así como la cristalización de los oligómeros y los monómeros, o bien, los cambios de pH, también pueden repercutir en la velocidad de proceso. El peso molecular es el parámetro más ampliamente utilizado para evaluar la degradación. La velocidad de degradación de los polímeros biodegradables depende de su hidrofiliidad y accesibilidad de sus enlaces hidrolíticamente inestables a los fluidos corporales. También dependerá del acceso que tengan las enzimas u otras moléculas capaces de romper los enlaces químicos. Por lo tanto, la higroscopicidad del material, su morfología, cristalinidad y peso molecular serán parámetros clave en la cinética de degradación del polímero y en la pérdida de sus propiedades mecánicas y de peso durante el tiempo de implantación.

1.5 Tecnologías para obtener andamios o soportes 3D

Una gran variedad de tecnologías han sido desarrolladas para la obtención de andamios porosos; entre las más utilizadas están el hilado y tejido de fibras, lixiviación de partículas, espumado con gas, extrusión, electro-hilado, secado en condiciones supercríticas con CO₂, liofilización, etc. Cada técnica le confiere al andamio final características estructurales distintivas, por lo que es importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio⁶⁴. La mayoría de las técnicas de procesamiento convencional para producir soportes porosos, resultan poco adecuadas para producir materiales para aplicaciones biomédicas ya que en general utilizan aditivos como surfactante. Entre las técnicas que no utilizan aditivos para la obtención de andamios 3D para aplicaciones en la IT epitelial se tiene a la liofilización.

1.5.1 Liofilización

Esta técnica se basa en la utilización de soluciones homogéneas de un sistema polimérico en un disolvente de punto de congelación relativamente elevado (agua, dioxano, etc.). La solución se enfría hasta temperaturas inferiores a la de solidificación del sistema y el disolvente se elimina por sublimación a vacío manteniendo el sistema congelado. La morfología del material poroso está controlada por la transición de fase que tiene lugar durante el proceso de enfriamiento. El método es bastante sensible a variaciones como: la velocidad de enfriamiento, o bien, concentración del sistema polimérico⁶⁵.

La formación de los poros está dada por la nucleación o formación de cristales. El fenómeno de cristalización incluye dos etapas: nucleación o formación del cristal y el crecimiento del cristal.

Nucleación: es el comienzo de la congelación, involucra la presencia o formación de pequeños núcleos que son los centros de los cristales que se forman. Estos comienzan a formarse a partir de impurezas que se encuentran en la sustancia que se congela. Existen dos tipos de nucleación: la homogénea y la heterogénea. La homogénea sólo ocurre en sistemas tales como agua altamente purificada y, la heterogénea presenta pequeñas partículas existentes en la solución que actúan como núcleo para comenzar la formación de cristales. La importancia de la nucleación radica en el tipo de estructura de cristales que se forman, esto trae como consecuencia la morfología del poro⁶⁶.

La segunda etapa en la formación de cristales es el crecimiento de éstos. Los factores que influyen en la rapidez de crecimiento de los cristales son los siguientes:

- 1) La rapidez a la cual las moléculas reaccionan con la superficie de contacto.
- 2) La rapidez de difusión de las moléculas del líquido desde la solución no congelada a la superficie del cristal.
- 3) La rapidez a la cual se remueve el calor.

Todos los factores anteriores se ven afectados por uno adicional: la temperatura.

Con respecto a lo anterior, se puede afirmar que el crecimiento de cristales disminuye a medida que la temperatura desciende⁶⁷.

ANTECEDENTES

En las últimas dos décadas, hemos sido testigos de la incorporación al mercado de muchos apósitos para la regeneración de piel, debido a que se ha demostrado que tener un entorno húmedo aumenta la rapidez de cicatrización. Estos soportes se basan en el concepto de crear un ambiente óptimo para el crecimiento celular. En la Tabla 1.2 se muestran algunos andamios para la regeneración de piel que se encuentran en el mercado⁶⁸.

Tabla 1.2. Andamios para la regeneración de piel.

Nombre	Material	Compañía
Integra™	Colágeno/condroitin-6 sulfato en silicona	Integra LifeScience (Plainsborough, NJ)
Biobrane™	Polisiloxano, nylon y colágeno	Dow Hickham/Bertek Pharmaceuticals (Sugar Land, TX)
Alloderm™	Dermis Humano	Lifecell Corporation (Branchberg, NJ)
Epicel™	Polisiloxano	Genzyme Biosurgery (Cambridge, MA)
Myskin™	Poliácido glicólico/ poliácido láctico	Celltran Limited (University of Sheffield, Sheffield, UK)
Apligraf™	Colágeno tipo I	Organogenesis (Canton, MA)
Hyalograft 3-D™	Bencil hialuronato	Fidia Advanced Biopolymers (Padua, Italy)
Laserskin™	Bencil hialuronato	Fidia Advanced Biopolymers
Bioseed™	Fibrina	BioTissue Technologies (Freiburg, Germany)
Dermagraft™	Poliácido glicólico	Advanced Tissue Sciences (LaJolla, CA)

Sin embargo, las investigaciones siguen a la orden del día para satisfacer las necesidades del paciente y así tener un mejor desempeño del material, como por ejemplo:

-Recientemente, Fernandes y col. (2011) fabricaron andamios porosos de quitosano-colágeno mediante el método de liofilización para su posible uso como sustituto de piel. La morfología estructural mostró heterogeneidad en el tamaño de poro con valores de 10-300 μm . Esto pudo reflejarse en los resultados de uno de los ensayos de citotoxicidad, al no mostrar diferencias significativas entre los andamios de QS y los de QS-Co.

-Ramos y col. (2012) elaboraron andamiajes porosos 3D a partir de quitosano-colágeno con una morfología similar a una esponja, para aplicaciones en la IT. Estos se obtuvieron por la técnica de liofilización utilizando diferentes formadores de poro (sacarosa, glucosa y cloruro de sodio) obteniéndose diámetros promedio de poro de 226, 264 y 272 μm respectivamente. Sin embargo, no se evaluaron las propiedades bioactivas del soporte. Además en dicho estudio no se utilizó un entrecruzante químico que contribuya a tener una mejor distribución de las cadenas de los polímeros en la estructura del andamio¹³.

-Ma y col. (2003) obtuvieron andamios porosos para la IT de la piel mediante el proceso de liofilización de la mezcla de soluciones de colágeno y quitosano. Se usó GA para entrecruzar los andamios y así mejorar su bioestabilidad, pero observaron por microscópica de láser confocal que el GA tienen un ligero efecto sobre la morfología de la sección transversal del andamio.

-Shanmugasundaram y col. (2001) diseñaron un andamio de quitosano-colágeno entrecruzado con GA. Los resultados de microscopía óptica del cultivo celular mostraron un cambio en la morfología de las células durante el ensayo; algunas células presentaron una morfología redondeada lo que conducen a la muerte. Esta muerte de células puede deberse a que se liberó algún componente tóxico que pudo ser minimizado con la agregación de más medio con suero fetal bovino. Además, se percibe una proliferación superficial y no hacía el interior del andamio en las fotografías que presentan viabilidad celular.

-De igual modo Wang y col. (2011) desarrollaron un soporte de quitosano-colágeno y observaron agregados de QS sobre las fibras de colágeno. Para disminuir este efecto, algunos estudios han empleado agentes entrecruzantes como el

glutaraldehído, la genipina, el oxaldehído, etc., aunque éstos han sido considerados parcialmente tóxicos o de biocompatibilidad desconocida¹⁴.

Para disminuir el efecto citotóxico de los andamios se pretende utilizar el hidróxido de amonio como inductor de la gelificación de la mezcla QS-Co y, una vez obtenido el hidrogel estable, se llevaría a liofilizar para tener un soporte poroso 3D. Los hidrogeles obtenidos mediante este procedimiento son llamados geles físicos ya que la concentración del polímero en solución da lugar a uniones físicas responsables de la formación de una red tridimensional de las cadenas del polímero. Las uniones físicas son del tipo hidrófilas e hidrófobas y llegan al equilibrio para permitir la gelificación. Este valor puede deberse a una disminución de la ionización del polímero (disminución de la densidad de carga). El hecho de utilizar vapores de NH₄OH (ver ecuación 2) hace posible una transición sol-gel con una distribución de las cadenas del polímero más uniforme y así disminuir aglomeraciones (gránulos o agregados) de la cadena de QS (para dar una mayor exposición de los grupos funcionales) y no utilizar compuestos tóxicos que afecten la biocompatibilidad y la funcionalidad de los biomateriales. El exceso de hidróxido de amonio, o bien el acetato de amonio generado durante el proceso de gelificación de la mezcla polimérica QS-Co, pueden eliminarse fácilmente con lavados de H₂O.



JUSTIFICACIÓN

Una de las técnicas para la elaboración de andamios 3D para ingeniería de tejidos es partir de un hidrogel y luego someter éste a un proceso de secado por congelación^{73,74}. De esta forma, el producto final tendrá tamaños de poro con valores por arriba de las 10 µm de diámetro, dimensiones apropiadas para la proliferación de células epiteliales.

Los hidrogeles se pueden clasificar en hidrogeles químicos y físicos según su mecanismo de entrecruzamiento. El entrecruzamiento químico es un método altamente versátil para producir hidrogeles, pero los agentes de entrecruzamiento utilizados no solo pueden afectar la integridad de las sustancias que se incorporarán al material (proteínas, células), sino que también suelen ser compuestos tóxicos. Además, los agentes de entrecruzamiento químico pueden dar reacciones no deseadas con ciertas sustancias bioactivas presentes en la matriz de hidrogel.

El efecto adverso del entrecruzamiento químico se puede evitar con el uso de técnicas de entrecruzamiento físico; en éstas, la formación del hidrogel se lleva a cabo en ausencia de disolventes orgánicos y agentes de entrecruzamiento tóxicos. Los entrecruzamientos físicos están constituidos por cadenas enredadas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, entre otras, y aunque transitorias, sus características pueden ser suficientes para hacer que los hidrogeles sean insolubles en un medio acuoso⁷⁴⁻⁷⁶.

Los hidrogeles de quitosano químicamente entrecruzados son mucho más estables que los hidrogeles entrecruzados físicamente, ya que la gelificación es irreversible debido a la formación de enlaces covalentes entre diferentes cadenas; sin embargo, este enfoque requiere la modificación química de la estructura primaria del quitosano, lo que podría afectar sus propiedades iniciales fisicoquímicas y bioactivas, particularmente si los grupos amino están involucrados en la reacción de entrecruzamiento⁷⁷.

El glutaraldehído es un compuesto muy utilizado para generar hidrogeles de quitosano químicamente entrecruzados; éste reacciona con los grupos amino del quitosano para producir enlaces imina⁷⁸. De esta manera, la concentración de

grupos amino libres disminuye, lo cual afectará su desempeño biológico ya que este grupo es el responsable de la interacción del quitosano con proteínas, células y organismos vivos ^{77,79}.

Un procedimiento interesante para obtener hidrogeles entrecruzados físicamente es el reportado por Montembault y col., (2005) quienes prepararon materiales al poner en contacto con una solución de quitosano con una atmósfera de hidróxido de amonio. Este procedimiento genera un hidrogel físico que mantiene disponibles los grupos amino de la estructura del quitosano y, por lo tanto, sus excelentes propiedades biológicas.

HIPÓTESIS

Los soportes de quitosano-colágeno obtenidos a partir de hidrogeles entrecruzados físicamente con hidróxido de amonio presentan una mayor biocompatibilidad y viabilidad de fibroblastos comparado con aquellos que utilizan glutaraldehído como entrecruzante.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de distintos métodos de entrecruzamiento sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de un andamio de quitosano-colágeno tipo I.

2.2 Objetivos particulares

- Caracterizar fisicoquímicamente los QS para conocer su grado de acetilación y peso molecular.
- Obtener soportes de QS-Co, utilizando hidróxido de amonio como inductor de la gelificación, variando características (GA y PM) del QS.
- Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los andamios generados (MEB, EDX, área superficial, FTIR, TGA, absorción de humedad y degradación *in vitro*).
- Evaluación de las propiedades biológicas (biocompatibilidad y viabilidad de fibroblastos L929) de los soportes de QS-Co.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

En la elaboración de los andamios se utilizó colágeno tipo I (Co, piel de ternera con catálogo No. C9791) y dos tipos de quitosano, ambos de la marca Sigma-Aldrich; el primero, con No. de catálogo 417963, tenía un peso molecular de 192,068 (QPP) y un grado de deacetilación (GD) de 88 %; el segundo, con No. de catálogo 448877, tenía un peso molecular de 223,332 (QPM) g/mol y un GD de 86 %. El peso molecular fue determinado por viscosimetría capilar, utilizando como disolvente ácido acético 0.3 M y acetato de sodio 0.2 M, con un pH de 4.6 a 25 °C siguiendo la metodología de Sionkowska y col. (2004)⁸¹ y el grado de deacetilación determinado por ¹³C RMN y FTIR según la metodología reportada por Heux y col. (2000)⁸². Para la elaboración de los hidrogeles se utilizó hidróxido de amonio (HA, solución al 28 %), glutaraldehído (GA, solución al 25 %), ácido acético glacial (AA, ≥99.5 % de pureza) y acetona (AC 99.5 % de pureza). En la degradación enzimática se utilizó lisozima (LZ, ≥90 % de pureza con catálogo No. L6876) y buffer salino de fosfatos (PBS, con catálogo No. P4417). Todos los disolventes y reactivos fueron de la marca Sigma-Aldrich.

2.2 Caracterización fisicoquímica del Quitosano

2.2.1 *Peso Molecular*

Para determinar el peso molecular promedio viscoso (M_v) se utilizó un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde No. 75, equipado con un baño termostático controlado por un recirculador de agua a 25.0 ± 1 °C. Las muestras de quitosano se prepararon utilizando un sistema disolvente ácido acético 0.3 M y acetato de sodio 0.2 M (pH 4.5). Las concentraciones del polímero fueron 1.00 x 10⁻³, 8.69 x 10⁻⁴, 8.00 x 10⁻⁴, 7.40 x 10⁻⁴ y 6.66 x 10⁻⁴ g/mL. La viscosidad intrínseca fue determinada gráficamente empleando la ecuación de Huggins que relaciona la viscosidad reducida con la concentración, así como la ecuación de Kraemer y de Punto Único $[(2(\eta_{sp}-\ln\eta_{rel}))^{0.5}/c]$ ⁸³. Una vez calculada la viscosidad intrínseca, ésta se utilizó

para determinar el peso molecular promedio viscoso, M_v , a partir de la ecuación de Mark–Houwink–Sakurada: donde K y a son dos constantes que dependen del sistema tampón. Los valores reportados de K y a para el quitosano en el disolvente utilizado fueron $7.40 \times 10^{-2} \text{ dL g}^{-1}$ y 0.76, respectivamente⁹.

2.2.2 Grado de acetilación

Para determinar el grado de acetilación del QS se realizó un estudio cuantitativo a partir del área bajo las curvas de los espectros de infrarrojo obtenidos en un equipo Nicolet 8700, en modo de absorbancia con un intervalo de número de onda comprendido entre 4000 y 650 cm^{-1} , siguiendo el método propuesto por Brugnerotto³⁸. Para esto se tomó como banda característica la amida III localizada a 1318 cm^{-1} y como referencia la banda de grupos metilos a 1380 cm^{-1} en la Ecuación 3. La desacetilación fue calculada según la Ecuación 4.

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = 31.92 \left(\frac{A_{1318}}{A_{1380}} \right) - 12.2 \quad (3)$$

$$\text{Grado de DA (\%)} = 100 - \text{grado de N acetilación} \quad (4)$$

Para corroborar el resultado del grado de acetilación del QS se realizó un estudio en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN VARIAN de 600 MHz) a una temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Para la obtención del espectro de resonancia de carbono 13 (^{13}C RMN) del QS se disolvieron 12 mg de muestra en agua deuterada (D_2O) y se agregó una gota de ácido clorhídrico deuterado (DCI) para lograr su completa disolución. La determinación del DA por ^{13}C RMN se evaluó a partir de las integrales relativas de los grupos metilo, en comparación con las integrales de los carbonos del anillo del QS. Además, se afirma que si se considera el pico del carbonilo se puede tener un error de $\pm 4 \%$, por ello es más preciso considerar únicamente la integración de las señales del grupo metilo. Según Heux y col. (2000) el grado de acetilación es determinado entre la intensidad de la resonancia del carbono del grupo metilo ($I_{[\text{CH}_3]}$) y la suma de todas las intensidades de resonancia de los carbonos del anillo glucosídico ($I_{[\text{C}1]} + I_{[\text{C}2]} + I_{[\text{C}3]} + I_{[\text{C}4]} + I_{[\text{C}5]} + I_{[\text{C}6]}$) con la siguiente expresión (Ecuación 5)⁸².

$$GA(\%) = \left(\frac{100 \times I[\text{CH}_3]}{I[\text{C}_1] + I[\text{C}_2] + I[\text{C}_3] + I[\text{C}_4] + I[\text{C}_5] + I[\text{C}_6]} \right) (0.10) \quad (5)$$

2.3 Obtención de andamios 3D

Se preparó una solución de quitosano al 3 % (p/p) en ácido acético al 0.3 M. En todos los casos, la muestra se disolvió a temperatura ambiente con agitación constante por 24 h; posteriormente las soluciones se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta la desaparición de burbujas visibles.

2.3.1 QS-HA

Se vertió 1.5 g de solución de QS en vasos de precipitado de 10 mL. Después, en un vaso precipitado de 100 mL se puso hidróxido de amonio y ambos vasos fueron colocados en un recipiente cerrado herméticamente. La reticulación física (gelificación) se indujo simplemente por la difusión de amoniaco gaseoso en una atmósfera controlada durante 24 h, según lo propuesto por Montembault y col. (2005)⁸⁰. Después, los hidrogeles se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de NH₄OH y el acetato de amonio (CH₃COONH₄) generado, hasta alcanzar un pH 7 en al agua destilada.

2.3.2 QS-AC

Los hidrogeles CS-AH se sometieron a un cambio de fase fluida pasando la muestra a través de una serie de concentraciones de agua/acetona decreciente (80/20, 50/50, 20/80, 0/100) y luego inversamente acetona/agua (80/20, 50/50, 20/80, 0/100) durante una hora por gradiente de concentración. Esto se hizo ya que está documentado que las cadenas de quitosano sufren un reordenamiento, dentro de la red formada, a una configuración más estable como resultado de la interacción con la acetona⁸⁴.

2.3.3 QS-GA

Los hidrogeles de la sección 2.3.1. se indujeron a entrecruzamiento químico, donde se sumergieron los materiales en una solución acuosa de glutaraldehído al 0.1 % por 24 h. Después se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de GA

2.3.4 QS-Co-AH, QS-Co-AC y QS-Co-GA

Los hidrogeles de quitosano-colágeno (QS-Co), se prepararon dispersando Co (2 % en peso) en ácido acético 0.1 M (bajo agitación constante por 24 h a temperatura ambiente) y luego agregando a esta suspensión una solución de QS (3 % en peso). Se empleó una proporción 80/20 (p/p) (solución de quitosano/suspensión de colágeno).

La suspensión resultante se llevó al tratamiento con hidróxido de amonio, con el cambio de fase fluida de acetona y con el de glutaraldehído para generar los hidrogeles que contiene colágeno.

Para obtener los andamios 3D, se secaron los hidrogeles (resumidos en la tabla 2.1) en una liofilizadora LABCONCO modelo 4.5 FreeZone a -53°C, a una presión de 0.016 mBar durante 48 h.

Tabla 2.1. Diferentes tipos de entrecruzamientos utilizados en la obtención de los andamios 3D

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
QS-HA	Hidrogel de quitosano físicamente entrecruzado por medio de hidróxido de amonio.
QS-AC	Hidrogel de quitosano tratado con acetona.
QS-GA	Hidrogel de quitosano entrecruzado con Glutaraldehído
QS-Co-HA	Hidrogel de colágeno/quitosano reticulado físicamente por medio de hidróxido de amonio.
QS-Co-AC	Hidrogel de colágeno/quitosano tratado con acetona.
QS-Co-GA	Hidrogel de colágeno/quitosano entrecruzado con Glutaraldehído

2.4 Caracterización fisicoquímica de andamios 3D

2.4.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La morfología de la superficie de los andamios se observó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) utilizando un JEOL 6360LV a 20-25 kV. Las muestras se montaron sobre una cinta de aluminio y se recubrieron con oro utilizando un LLC modelo Desk II a alto vacío. Las micrografías también se utilizaron para medir el diámetro aparente de los poros con un software Image Pro Plus.

2.4.2 Mapeo de Nitrógeno por análisis EDX

El microanálisis se realizó mediante Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) utilizando un sistema Oxford Inca Energy 200 acoplado a un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 6360 LV, a 20 kV durante 20 min, para cada análisis. El mapeo EDX para nitrógeno se realizó para observar la distribución de este elemento que está contenido tanto en el colágeno como en el quitosano.

2.4.3 Área superficial

Se llevaron a cabo experimentos de adsorción de nitrógeno a 77 K para determinar el área superficial específica de los andamios, utilizando un equipo NOVA 2200e de Quentachome Instruments. Las muestras se desgasificaron durante 6 horas, a 95 °C, antes de las mediciones con la finalidad de eliminar el aire y la humedad presente en las muestras. El modelo de Brunauer-Emmett-Teller (BET) ⁸⁵ se aplicó para ajustar las isothermas y calcular el área de superficie específica de los andamios.

2.4.4 Estructura (FTIR)

Los espectros de infrarrojo de los andamios se obtuvieron usando un equipo Thermo Scientific Nicolet 8700; se utilizó la técnica de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) utilizando un cristal de germanio. Las muestras se analizaron en el intervalo de 4000-650 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 100 barridos.

2.4.5 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se realizó en un equipo Perkin Elmer TGA-7, en atmósfera de nitrógeno. 7 mg de las muestras se analizaron de 50 °C a 600 °C con una tasa de calentamiento de 10 °C/min.

2.4.6 Absorción de humedad

Los especímenes de cada tipo de andamio se secaron a presión reducida durante 2 días. Posteriormente, los andamios se almacenaron bajo dos porcentajes de humedad relativa (H. R.): $50 \pm 1\%$ y $91 \pm 1\%$, usando nitrato de magnesio hexahidratado y sulfato de sodio decahidratado, respectivamente. Se tomó la masa de cada una de las muestras al inicio del estudio y hasta que éstas alcanzaron el equilibrio. El porcentaje de absorción de humedad (A. H.) está dado por la Ecuación 6:

$$A(t) = \left(\frac{m_t - m_0}{m_0} \right) 100 \quad (6)$$

Donde m_0 es la masa de la muestra al inicio de la exposición a la humedad y m_t es la masa de la muestra después de un tiempo t en horas. Se reportó el promedio y la desviación estándar de un triplicado por cada andamio.

2.4.7 Degradación *In vitro*

La degradación *in vitro* de los andamios se estudió a 37 °C en buffer salino de fosfatos (PBS, pH 7.4) que contenía 1.5 mg/mL de lisozima⁷⁹. Esta concentración fue elegida ya que es la misma que se reporta para el suero humano^{86,87}. La solución de lisozima se cambió diariamente para asegurar la actividad enzimática⁸⁸. Se colocaron andamios con una masa aproximada de 7 mg en viales que contenían 1 mL de solución de lisozima y se incubaron durante 28 días. Después de 7, 14, 21 y 28 días, las muestras se retiraron del medio y se enjuagaron con agua destilada. Luego, los andamios se secaron (liofilizaron) durante 24 h y se pesaron. La degradación se expresó como pérdida de masa de los andamios mediante la Ecuación 7.

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) 100 \quad (7)$$

Donde m_i es el peso inicial del andamio y m_f es el peso del andamio después de la degradación.

2.5 Evaluación de las propiedades bioactivas de los andamios 3D

2.5.1 Esterilización de muestras

Las muestras se esterilizaron mediante exposición a rayos UV, durante 20 min (para cada lado del andamio), utilizando una campana de flujo laminar (LABGARD, clase II, tipo A2 de NUAIRE®).

2.5.2 Biocompatibilidad

La prueba de citotoxicidad se evaluó mediante métodos directos e indirectos de acuerdo a la norma internacional ISO10993-5⁸⁹. Se cultivaron fibroblastos de ratón L929 en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), L- glutamina (2mM), penicilina (200 IU/mL), estreptomycin (100 µg/mL), 2-mercaptoetanol (5×10^{-5} M) y 2.5 mg/L de anfotericina B. El cultivo se colocó en cajas de cultivo de 25 cm² (Corning Inc., Cell BIND, NY, EE.UU.) y se incubó en una atmósfera del 5% con CO₂ a 37 °C para el método indirecto y directo.

2.5.2.1 Método indirecto

Los fibroblastos se sembraron por triplicado en placas de 48 pozos (Corning Inc.) a una densidad de 1×10^4 células/pozo y se incubaron como se describió anteriormente. El medio de cultivo se reemplazó con 1 mL de extracto obtenido de $35 \pm$ mg de peso de andamios incubados por un tiempo de 24 h en una atmósfera del 5% con CO₂ a 37 °C con el mismo medio⁹⁰. La viabilidad celular se determinó mediante el método de exclusión del colorante Azul de Tripán y el ensayo espectrofotométrico MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio).

2.5.2.2 Método directo

Las células de fibroblastos se cultivaron por triplicado en contacto con los andamios, en placas de 48 pozos, a una densidad de 1×10^4 células/pozo y se incubaron durante 24 h; los pozos que contenían solo la suspensión de fibroblastos, es decir, sin andamios, se utilizaron a la misma densidad como control. La viabilidad de las células se determinó después de 24 h de incubación mediante el recuento de células utilizando la exclusión del colorante azul de tripán y el ensayo MTT.

Después de que los fibroblastos alcanzaron una confluencia del 80 %, se separaron mediante digestión enzimática con 500 μ L de tripsina durante 15 min y se recogieron con PBS. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm (Centrifuge 5424, Eppendorf), el sobrenadante se descartó y las células se re-suspendieron en 100 μ L de SFB. Se homogeneizó una mezcla de suspensión celular y solución de azul tripán (1/1 del volumen de cada una) y se contó en un hemocitómetro (Hausser Scientific, 0.100 mm, EE. UU.), utilizando un microscopio óptico (Zeiss Axio Vert. A1). Sólo se contaron las células que estaban en las cuatro zonas del hemocitómetro. El número de células por mililitro se determinó usando las Ecuaciones 8 y 9.

$$\text{Células/mL} = \text{Recuento promedio por cuadro} \times \text{factor de dilución} \times 10^4 \quad (8)$$

$$\text{Células totales} = \text{Células/mL} \times \text{volumen total original de suspensión celular} \quad (9)$$

Donde 10^4 es el factor de correlación del hemocitómetro, cuyo volumen es 1 mm \times 1 mm y 0.1 mm de profundidad.

El ensayo de MTT se realizó siguiendo la metodología reportada por Zhang y col. (2008). En resumen, se agregaron a las células 100 μ L de la solución madre de MTT 2 mM (1/10 del volumen del medio de cultivo) y la suspensión resultante se incubó en una atmósfera del 5% con CO₂ a 37 °C durante 4 h. Posteriormente, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) 1/10 con respecto al volumen del medio. La absorbancia se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro de microplacas BIO-RAD

Modelo 550. Se tomó una suspensión celular en medio de cultivo RPMI 1640 como control positivo mientras que una suspensión celular con 50 μ L de DMSO se utilizó como control negativo, ya que este reactivo es un agente tóxico para la célula.

2.5.3 Proliferación Celular

La proliferación de las células y su localización en el andamio se determinó mediante microscopía confocal y de fluorescencia. Las células se colocaron en placas a una concentración celular de 0.5×10^4 células/pozo junto con el andamio. Después, se incubó en una atmósfera del 5% con CO_2 a 37 °C durante 14 días (se cambió el medio cada 48 h para eliminar compuestos tóxicos que se producen en un cultivo celular). Luego del período de incubación, se retiró el medio y las células se fijaron con formaldehído al 3.7 % en PBS, se permeabilizaron adicionalmente con Tritón X-100 al 0.2 % en PBS durante 15 minutos. Posteriormente, las células se tiñeron con DAPI (en inglés, 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro, Sigma-Aldrich, ID 28718903), el cual es un fluorocromo que tiñe las secuencias de ADN nuclear de color azul mediante su unión a los pares de bases adenina-timina lo que permite visualizar el material nuclear a través del ADN. Las microplacas se montaron en un microscopio de epifluorescencia invertida (Leica DMI8).

2.6 Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímica del QS

3.1.1 *Peso Molecular*

Los resultados obtenidos en la aplicación de la técnica de viscosimetría capilar para la determinación de la masa molecular de los dos tipos de quitosano: QPP y QPM, se muestran en la Tabla 3.1 y 3.2, respectivamente. En las mismas se resumen los tiempos de elución (t) para las diluciones del biopolímero en el sistema de disolventes seleccionados, a 25°C. Estos tiempos son el promedio de 3 mediciones. Los parámetros viscosimétricos calculados, a partir de estos resultados, se pueden observar en la Tabla 3.3 y 3.4 (QPP y QPM respectivamente).

Tabla 3.1. Tiempos de elución para las disoluciones de QPP.

Disolución	Concentración (g/mL)	Tiempo de elución (s)	Desviación estándar
1	1.00×10^{-3}	210.32	0.77
2	8.69×10^{-4}	195.88	0.08
3	8.00×10^{-4}	187.67	0.13
4	7.40×10^{-4}	180.32	0.05
5	6.66×10^{-4}	172.30	0.09
Disolvente	-	107.19	0.73

Tabla 3.2. Tiempos de elución para las disoluciones de QPM.

Disolución	Concentración (g/mL)	Tiempo de elución (s)	Desviación estándar
1	1.00×10^{-3}	228.54	0.12
2	8.69×10^{-4}	208.85	0.11
3	8.00×10^{-4}	198.86	0.72
4	7.40×10^{-4}	190.22	0.09
5	6.66×10^{-4}	180.56	0.36
Disolvente	-	107.19	0.73

Tabla 3.3. Parámetros viscosimétrico del QPP a 25°C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.

Parámetros viscosimétricos							
Disolución	η_{rel}	η_{sp}	η_{sp}/c (dL/g)	$\ln \eta_{rel}$	$\ln \eta_{rel}/c$ (dL/g)	Pto único (dL/g)	$[\eta]$ (dL/g)
1	1.96	0.96	962.03	0.67	673.98	759.01	767.24
2	1.82	0.82	951.53	0.60	693.35	770.62	
3	1.75	0.75	938.46	0.56	700.06	771.99	
4	1.68	0.68	921.02	0.52	702.18	768.71	
5	1.60	0.60	911.90	0.47	712.57	773.68	

Tabla 3.4. Parámetros viscosimétrico del QPM, a 25°C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.

Parámetros viscosimétricos							
Disolución	η_{rel}	η_{sp}	η_{sp}/c (dL/g)	$\ln \eta_{rel}$	$\ln \eta_{rel}/c$ (dL/g)	Pto único (dL/g)	$[\eta]$ (dL/g)
1	2.13	1.13	1132.00	0.75	757.06	865.95	860.42
2	1.94	0.94	1090.68	0.66	767.08	862.74	
3	1.85	0.85	1068.86	0.61	772.41	860.88	
4	1.77	0.77	1045.71	0.57	774.33	856.00	
5	1.68	0.68	1026.72	0.52	782.20	856.51	

Se observó una disminución de la viscosidad reducida (η_{sp}/c) para los dos tipos de quitosano a medida que la concentración del polímero disminuye. Lo anterior indica que se cumple la expresión de Huggins para el polímero en estudio con las condiciones de trabajo utilizadas. En cambio, la viscosidad inherente ($\ln \eta_{rel}/c$) muestra un incremento para los dos tipos de QS a medida que la concentración del polímero disminuye, cumpliéndose la ecuación de Kraemer. También la viscosidad obtenida por la expresión del punto único se mantiene muy similar en las distintas concentraciones. Según las ecuaciones de Huggins y Kraemer la viscosidad intrínseca es el valor de las viscosidades reducida e inherente, extrapoladas a una concentración cero. Para ver el comportamiento se construyó el gráfico de viscosidad reducida (η_{sp}/c), inherente ($\ln \eta_{rel}/c$) y punto único $[2(\eta_{sp}-\ln \eta_{rel})]^{0.5}/c$ en función de la concentración para QPP y QPM (Figura 3.1 y 3.2 respectivamente).

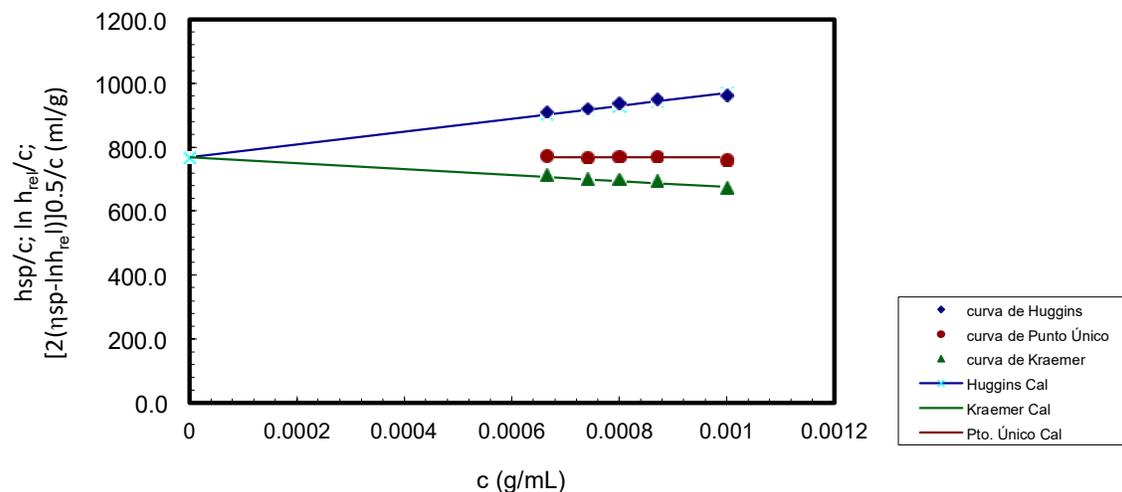


Figura 3.1. Representación de Huggins, Kraemer y Punto único, a 25°C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para QPP.

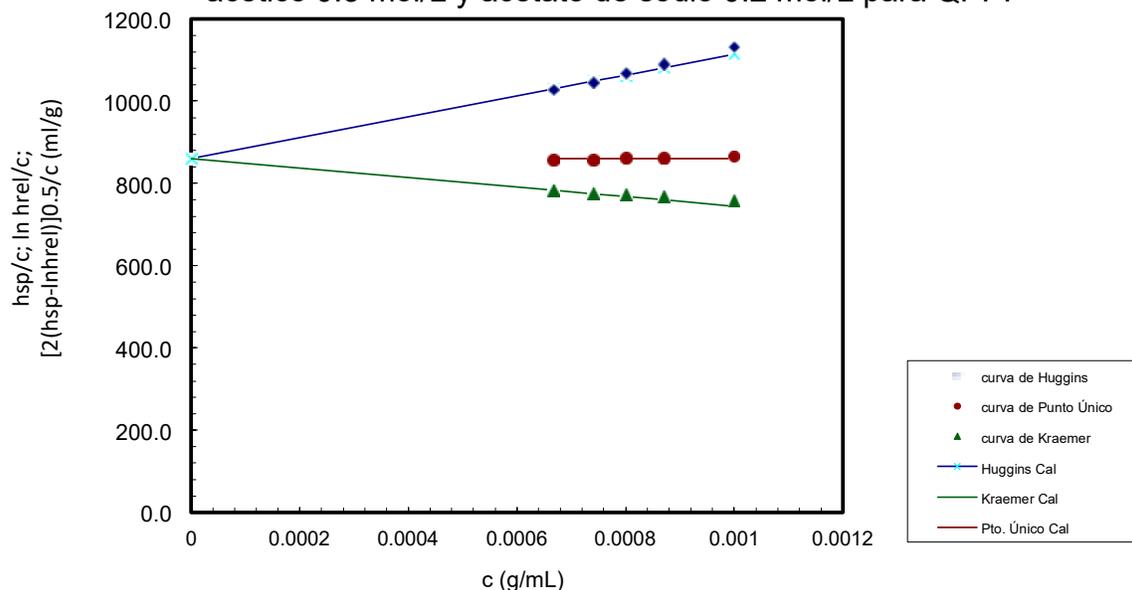


Figura 3.2. Representación de Huggins, Kraemer y Punto único, a 25°C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para QPM.

A partir de la ordenada en el origen de la línea recta obtenida, se determinó la viscosidad intrínseca, $[\eta]=767.2440$ y 860.4224 mL/g para QPP y QPM respectivamente. La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado. Su valor depende del tamaño y forma de la molécula (soluta), así como de su interacción con el disolvente y temperatura de trabajo. Para un sistema polímero-disolvente a una temperatura determinada, la expresión de Mark-

Houwink-Sakurada puede utilizarse para determinar el peso molecular promedio viscoso de un polímero. Para el quitosano en el sistema de disolventes: 0.3 mol/L ácido acético-0.2 mol/L acetato de sodio a 25°C se utilizó la Ecuación 10:

$$Mv = \left(\frac{[\eta]}{7.40 \times 10^{-2}} \right)^{1/0.76} \quad (10)$$

Hay que mencionar que las constantes K (dL/g) y α reportadas en la literatura no tienen valores únicos como los tendría otro polímero para un sistema polímero-disolvente-temperatura dados, ya que se ha comprobado que la composición del QS en términos de proporción de las unidades N-acetiladas en sus cadenas, influye en su comportamiento reológico en solución y, por lo tanto, en los valores K y α para un mismo sistema quitosano-disolvente-temperatura. Por lo que en el presente trabajo se utilizaron los valores reportados por Rinaudo y col. (1999).

El peso molecular calculado para los quitosanos QPP y QPM fueron de 192,068.37 y 223,332.54 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente. Estos valores son similares con los determinados previamente por Costa y col. (2015).

3.1.2 Grado de acetilación

Para determinar el GA de los quitosanos se realizó un estudio cuantitativo a partir de las áreas bajo las curvas de los espectros de infrarrojo (Figura 3.3) para QPP y QPM con uso de la Ecuación 3. Se tomó la banda característica de la amida III (1318 cm^{-1}) y la de los grupos metilos (1380 cm^{-1}) como referencia y, se calculó la desacetilación según la Ecuación 4.

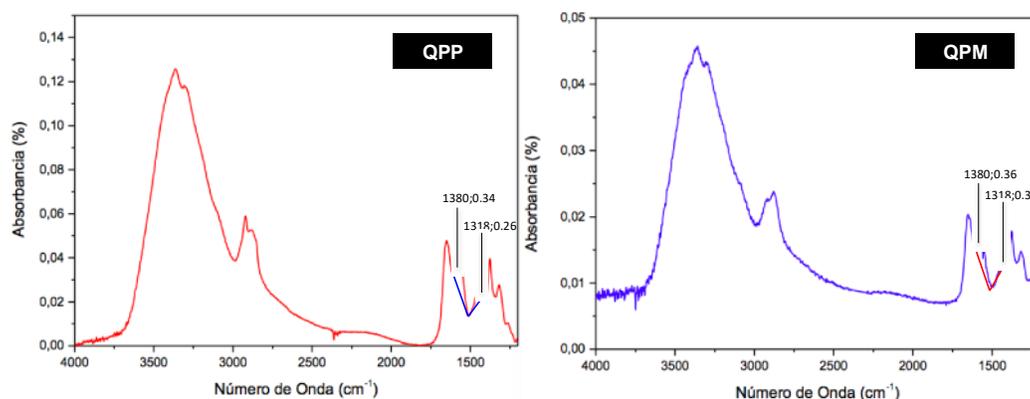


Figura 3.3. Espectros de FTIR de quitosanos QPP y QPM.

Los porcentajes de N-acetilación y de desacetilación calculados para el QPP son:

$$\mathbf{GA\ (\%) = 31.92(0.34/0.26) - 12.2 = 12.209\%}$$

$$\mathbf{GD\ (\%) = 87.79\%}$$

Los porcentajes de N-acetilación y de desacetilación calculados para el QPM son:

$$\mathbf{GA\ (\%) = 31.92(0.36/0.31) - 12.2 = 15.280\%}$$

$$\mathbf{GD\ (\%) = 84.72\%}$$

Para corroborar el GA obtenido por FTIR, se realizó un estudio por ^{13}C RMN donde el espectro muestra las señales de los carbonos a analizar (Figura 3.4). Dichas señales aparecen en los siguientes valores de desplazamiento químico (ppm) tanto para QPP y QPM. $\delta = 97.3$ (C1), 76.1 (C4), 75.6 (C5), 69.8 (C3), 59.9 (C6), 55.6 (C2) y 22,03 (CH3).

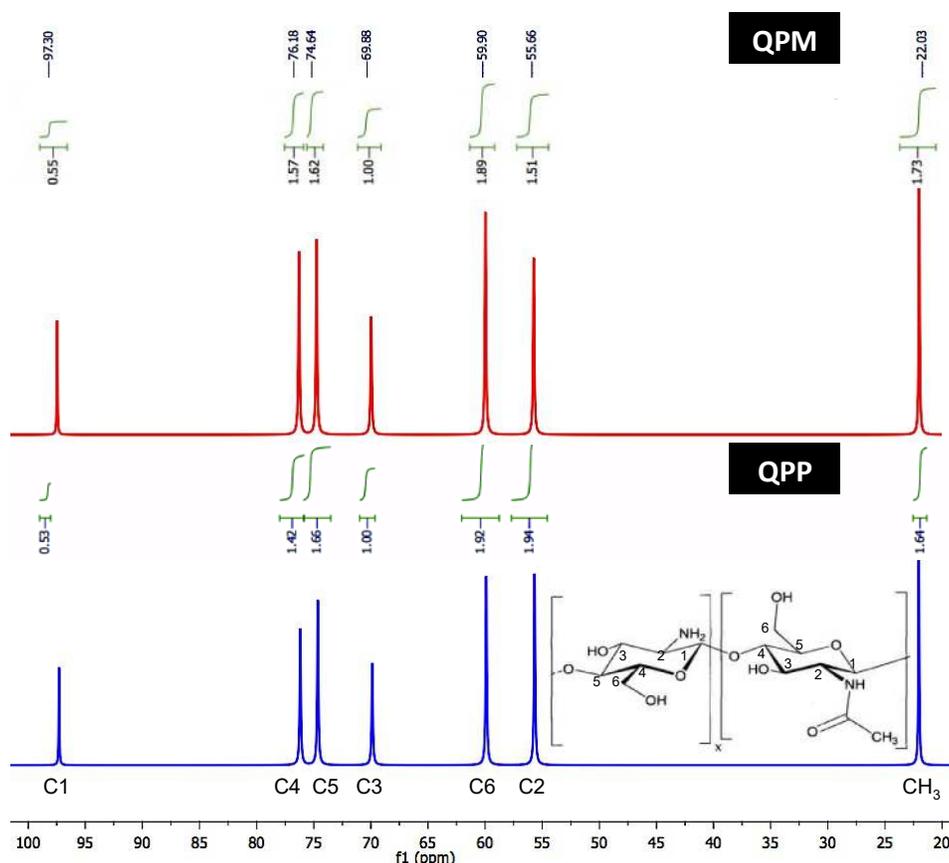


Figura 3.4. Espectros de ^{13}C RMN de A) QPM y B) QPP.

Los porcentajes de N-acetilación y desacetilación calculados para el QPP son:

$$GA(\%) = \left(\frac{100 \times [1.64]}{[0.53] + [1.94] + [1.00] + [1.42] + [1.66] + [1.92]} \right) (0.10) = \mathbf{11.61\%}$$

$$GD(\%) = \mathbf{88.38\%}$$

Los porcentajes de N-acetilación y desacetilación calculados para el QPM son:

$$GA(\%) = \left(\frac{100 \times [1.73]}{[0.55] + [1.51] + [1.00] + [1.57] + [1.62] + [1.89]} \right) (0.10) = \mathbf{12.75\%}$$

$$GD(\%) = \mathbf{87.24\%}$$

Los resultados anteriores y los obtenidos por FTIR son presentados en la Tabla 3.5; como se puede apreciar, los valores de GD de los quitosanos utilizados en este trabajo se encuentran en el intervalo reportado por la empresa comercial Sigma-Aldrich y también caen dentro del intervalo de valores reportados por Brugnerotto y col. (2001) para quitosanos que son extraídos de caparazones de crustáceos. La diferencia de los resultados entre las dos técnicas fue de un 0.5 % y 2.5 % para el QPP y QPM, respectivamente. Lo anterior está dentro del porcentaje de error de los procedimientos utilizados para su medición.

Tabla 3.5. Porcentajes de N-acetilación y de desacetilación calculados para QPP y QPM por técnicas de ATR-FTIR y ¹³C RMN.

Técnica	QUITOSANO	
	QPP	QPM
ATR-FTIR	GA=12.20 GD=87.69	GA=15.28 GD=84.7
¹³ C RMN	GA=11.61 GD=88.38	GA=12.75 GD=87.25
Promedio:	GA=12 GD=88	GA=14 GD=86

3.2 Obtención de andamios 3D

3.2.1 Aspecto físico de los hidrogeles

Tanto los hidrogeles preparados, como los andamios liofilizados (con y sin colágeno) mostraron un color blanco lechoso, excepto los entrecruzados con glutaraldehído, que mostraron un color amarillo o color marfil. Curiosamente, los

hidrogeles entrecruzados físicamente fueron solubles en una solución acuosa de ácido acético, mientras que los hidrogeles entrecruzados químicamente fueron insolubles en esta solución. Este hecho era esperado ya que el entrecruzamiento físico genera un hidrogel reversible, mientras que el entrecruzamiento químico produce hidrogeles permanentes⁷⁶. En todos los casos el hidrogel podía ser manipulado con espátula sin que se presentara rompimiento alguno.

Los andamios tridimensionales (Figura 3.5) fueron obtenidos cuando se eliminó el agua del hidrogel mediante la técnica de liofilización. Los hidrogeles presentaron dimensiones de $4.8 \pm 0.2\text{mm}$ de altura x $20.2 \pm 0.1\text{mm}$ de diámetro (\emptyset) antes de someterlos al proceso de secado. Después del proceso de liofilizado se obtuvieron andamios 3D con dimensiones de $4.7 \pm 0.2\text{mm}$ de altura x $20.1 \pm 0.1\text{mm}$ de \emptyset ; es decir, no se observaron diferencias significativas. Los valores anteriores fueron obtenidos para los distintos tratamientos, tanto para el quitosano QPP y QPM. Así, se concluye que la técnica de obtención de andamios 3D era adecuada para los sistemas de trabajo ya que no se observó un colapso significativo en la estructura.

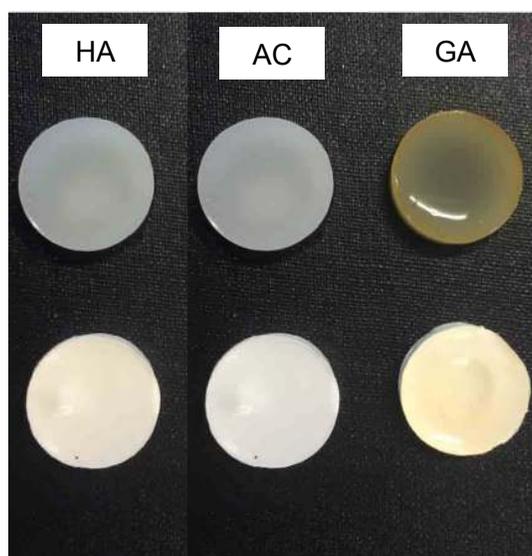


Figura 3.5. Hidrogeles de quitosano (parte superior) y andamios 3D (parte inferior) para HA, AC y GA.

3.2.2 Morfología

Las Figuras 3.6 y 3.7 muestran las micrografías MEB de los andamios de quitosano QPP a 500x y 2500x, respectivamente. También se presentan las micrografías a 500x y 2500x para los andamios de quitosano QPM, en las Figuras 3.8 y 3.9 respectivamente. Las muestras que contienen colágeno se presentan en la fila inferior de las figuras, mientras que las preparadas sin esta proteína se muestran en la fila superior. Para todos los casos, las micrografías fueron obtenidas de cortes transversales en cada uno de los materiales de estudio. En la figura 3.6 se puede observar que el material QPP-HA presenta no solo una morfología homogénea sino también exhibe una buena interconectividad entre los poros del material. En contraste, el andamio QPP-AC muestra una morfología heterogénea. En el caso del andamio QPP-GA es aún más clara la estructura heterogénea. También se puede observar que los materiales sin Co presentan un tamaño de poro más pequeño comparado con los materiales que sí presentan esta proteína. Lo anterior se debe a que el colágeno presente en la red tridimensional del andamio induce reacomodos de las fibras del quitosano, propiciando una estructura con poros de mayor dimensión. Esto es más evidente en la Figura 3.7, ya que las micrografías están a una mayor resolución (2500x).

Los andamios QPP-HA presentan poros interconectados que sería beneficioso para la IT. Del mismo modo, el andamio QPP-AC muestra poros interconectados que se observan en la figura (ver círculo azul). Por el contrario, cuando se utilizó glutaraldehído como agente entrecruzante, el andamio QPP-GA presenta baja interconectividad en la morfología.

La figura 3.7 muestra que los materiales que contienen Co exhiben una estructura heterogénea, con presencia de poros grandes, aunque la muestra QPP-Co-AH mantuvo un cierto grado de homogeneidad en su estructura. Esto indica que las fibras de colágeno tienen una fuerte influencia en la morfología de los andamios, ya que induce reordenamientos de las cadenas poliméricas de quitosano generando estructuras tridimensionales con poros más grandes. También se puede apreciar la presencia de zonas densas (flecha roja) de lo que parece ser quitosano, mientras que, por el contrario, las fibrillas de colágeno no se distinguen claramente.

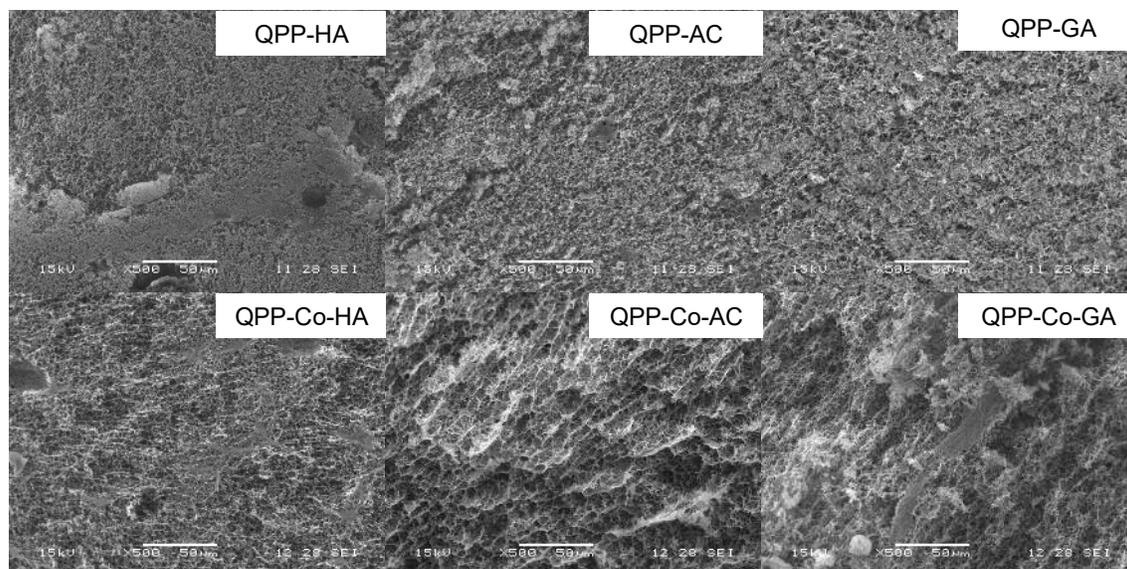


Figura 3.6. Micrográficas de MEB de andamios QPP obtenidos a una magnificación de 500x.

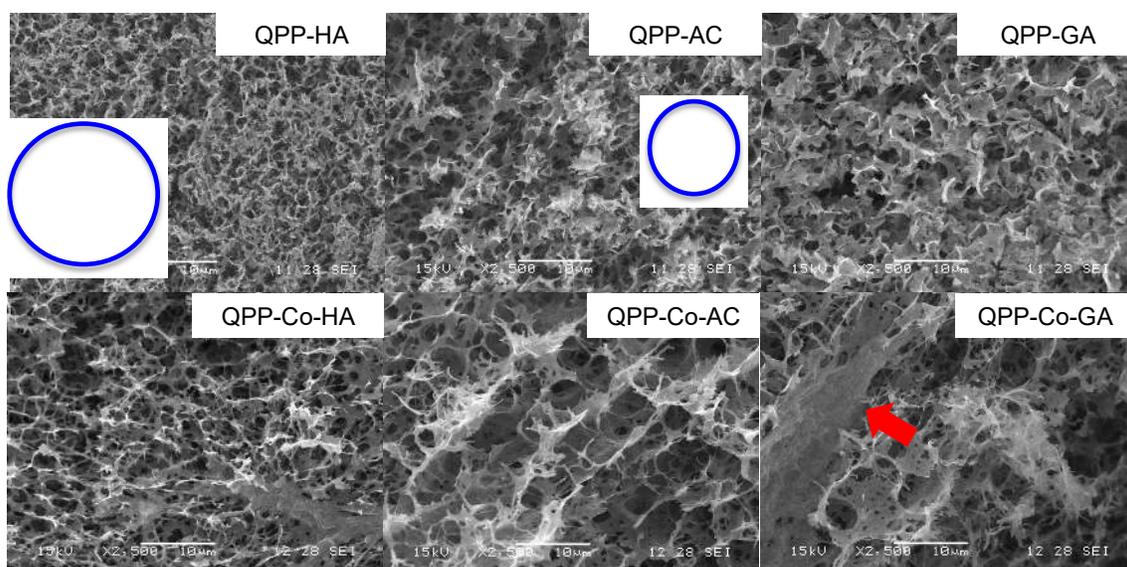


Figura 3.7. Micrográficas de MEB de andamios QPP obtenidos a una magnificación de 2500x. Círculo azul: poros interconectados; Flecha Roja: Zona densa.

En la Figura 3.8 y 3.9 se puede observar que los materiales del quitosano QPM-HA exhiben una morfología homogénea con mayor porosidad e interconectividad. En contraste, las micrográficas MEB para la muestra de QPM-AC mostraron una morfología heterogénea, que incluye zonas porosas (círculo verde) y no porosas (flechas verdes). Es probable que las áreas no porosas, es decir, las superficies

lisas se deban a los poros cerrados producidos por la contracción de la estructura del hidrogel como se verá más adelante. Finalmente, aunque el andamio QPM-GA también tenía una alta porosidad, su morfología no fue homogénea.

Por otro lado, la adición de colágeno al quitosano dio como resultado, materiales con una morfología muy diferente; en general, se observaron poros grandes y una estructura heterogénea, aunque la muestra de QPM-Co-AH mantuvo un cierto grado de homogeneidad en su estructura. Esto indica que las fibras de colágeno tienen una fuerte influencia en la morfología de los andamios. También se puede apreciar que hay algunas estructuras densas (láminas) de lo que parece ser quitosano (flechas rojas), comportamiento muy similar al quitosano QPP, mientras que las fibrillas de colágeno no se distinguen claramente (Figura 3.10, corresponde a micrografías de la morfología del colágeno). La presencia de este tipo de estructuras densas fue menor en el andamio de QPM y QPP/Co con HA y AC.

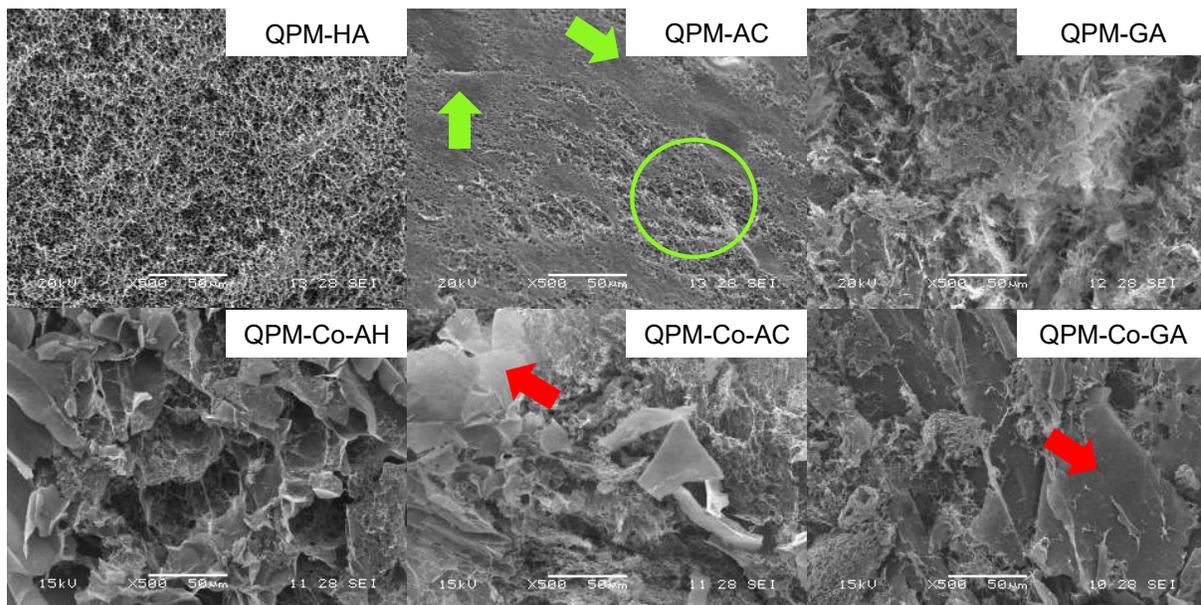


Figura 3.8. Micrografías de MEB de andamios QPM obtenidos a una magnificación de 500x. Flecha verde: zona no porosa; círculo verde: zona porosa; flechas rojas: estructura densa.

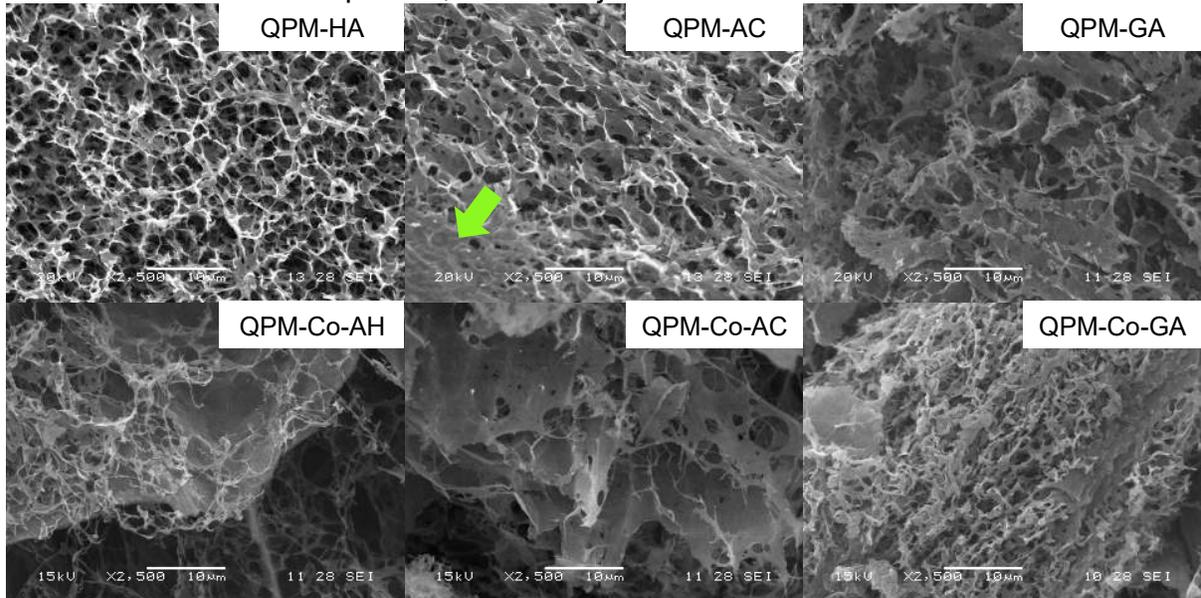


Figura 3.9. Micrografías de MEB de andamios QPM obtenidos a una magnificación de 2500x. Flecha verde: zona no porosa.

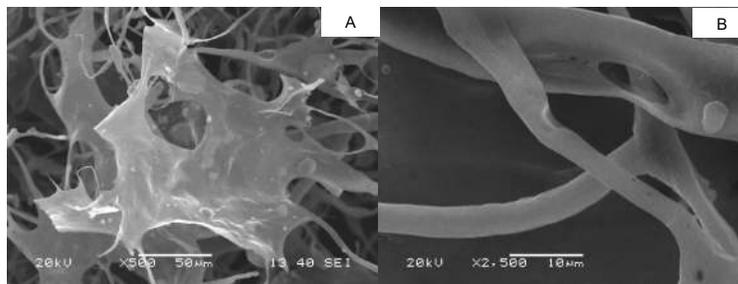


Figura 3.10. Micrografías MEB de fibras de colágeno a una magnificación de 500x (A) y 2500x (B).

3.2.3 Mapeo de Nitrógeno por análisis EDX

Para poder ver cómo está la distribución del QS y el Co en la estructura 3D de los andamios, se realizó un microanálisis elemental y los resultados obtenidos en el QPP y QPM son presentados en las Figuras 3.11 y 3.12, respectivamente; las muestras que contienen colágeno se presentan en la fila inferior de las figuras, mientras que las que se prepararon sin esta proteína se exhiben en la fila superior. El elemento de estudio fue el Nitrógeno (representado por puntos en color rojo en

las micrografías) ya que este elemento no solo está formando parte del grupo $-NH_2$ de la molécula del quitosano, sino que también forma parte de la estructura del colágeno, por lo que nos servirá para ver la distribución de estos compuestos en el andamio.

En las figuras de QPP y QPM se observó que el nitrógeno se distribuye uniformemente en los andamios sin colágeno, mientras que en las muestras que lo contienen, se detectaron áreas ricas en nitrógeno y zonas oscuras (huecos). Esta distribución desigual refleja claramente la presencia de poros grandes en los últimos materiales.

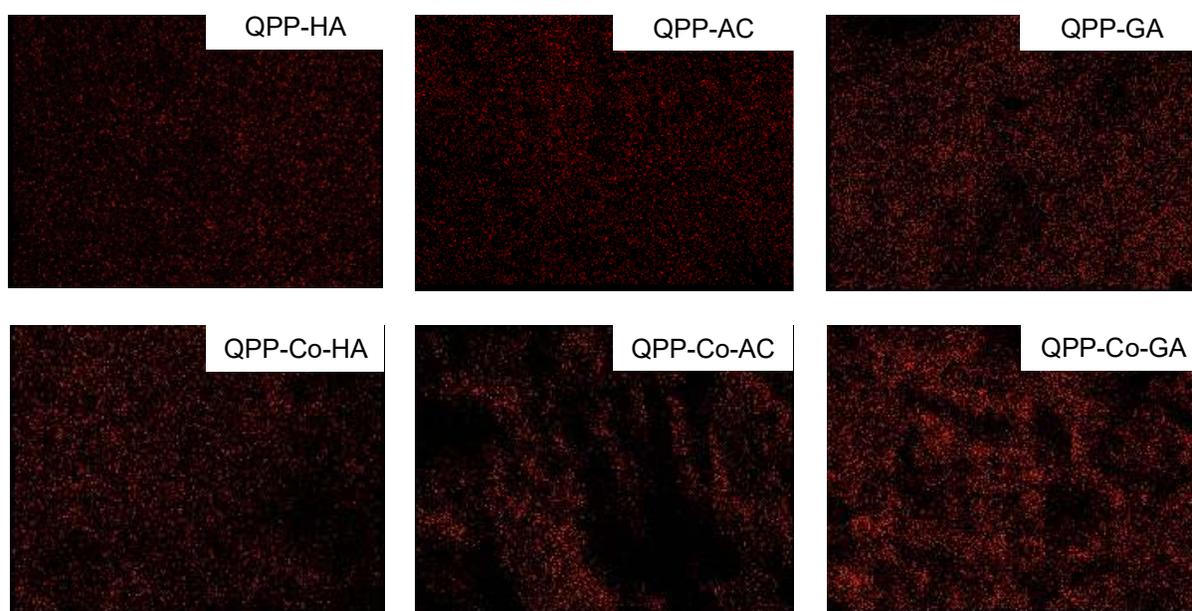


Figura 3.11. Mapeo de nitrógeno MEB-EDX para muestras de QPP que contienen colágeno (fila inferior) y sin colágeno (fila superior).

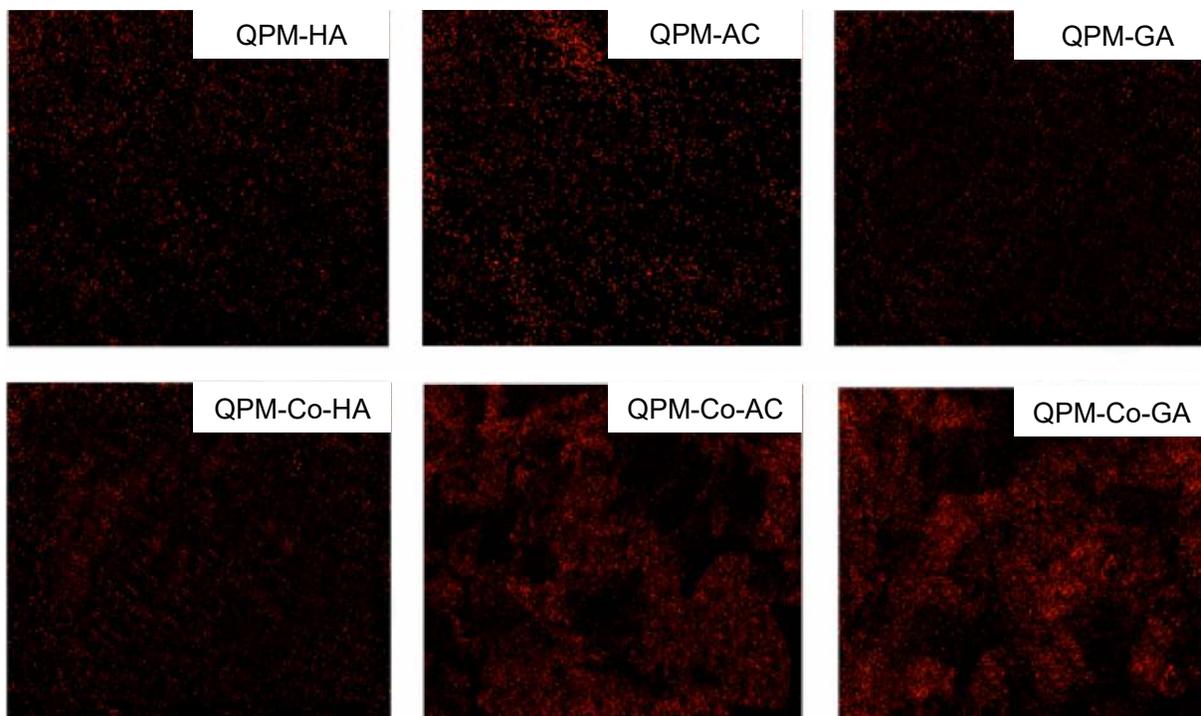


Figura 3.12. Mapeo de nitrógeno MEB-EDX para muestras de QPM que contienen colágeno (fila inferior) y sin colágeno (fila superior).

3.2.4 Distribución de tamaño de poro y área superficial

Las Figuras 3.13 y 3.14 muestran la distribución del tamaño de poros obtenidos para los andamios con quitosano QPP y QPM respectivamente; en las filas inferiores se presentan los materiales que contienen colágeno, mientras que las preparadas sin esta proteína se presentan en la fila superior. En general, se observó que todas las muestras exhiben una distribución unimodal, sin la aparición de picos adicionales relacionados con distribuciones adicionales con poros grandes o pequeños. A pesar de lo anterior, las distribuciones para los andamios elaborados con el QPP no fueron simétricas ya que hubo presencia de sesgos.

Para los materiales hechos con QPM, las muestras sin Co mostraron una distribución sesgada hacia la derecha, mientras que las que contienen colágeno tienden a ser una distribución normal más simétrica. El tamaño de poro promedio obtenido (Tabla 3.6) en los andamios fue similar al reportado por otros autores^{93,94}. Los resultados también indican que el método de obtención de los materiales parece

desempeñar un papel importante en el tamaño de los poros de los andamios. Tanto para QPP y QPM, los andamios derivados de hidrogeles tratados con acetona mostraron tamaño de poros más pequeños (5.24 μm y 7.71 μm respectivamente) y una distribución más estrecha que las obtenidas a partir de hidrogeles tratados con HA y GA. Santos-López y col. (2017) señalaron que este hecho podría estar relacionado con un reordenamiento de las cadenas de quitosano durante el reemplazo de la fase líquida, esto con el fin de producir una estructura más estable. Las reorganizaciones se deben a la contracción de la estructura del hidrogel, como lo ha informado Quignard y col. (2008) para disolventes como el etanol. También se señala que los andamios de quitosano (QPP y QPM) con colágeno presentaron tamaños de poros promedios más alto y distribuciones de tamaño de poro más amplias que las exhibidas para las muestras sin colágeno. Esto se puede explicar si se considera que las fibras de colágeno interfieren durante la formación de la estructura del hidrogel, lo que conduce a una distribución de poros más amplia¹³. Del mismo modo, los andamios QPP muestran tamaños de poro promedio menor que los materiales con QPM, lo cual podría estar relacionado a que el QPP presenta menor peso molecular, lo que propicia un mejor arreglo estructural. Si se toman de manera conjunta todos los resultados, se puede mencionar que los andamios de quitosano QPP y QPM presentan distribuciones de tamaño de poro muy cercanos a las dimensiones a las líneas celulares.

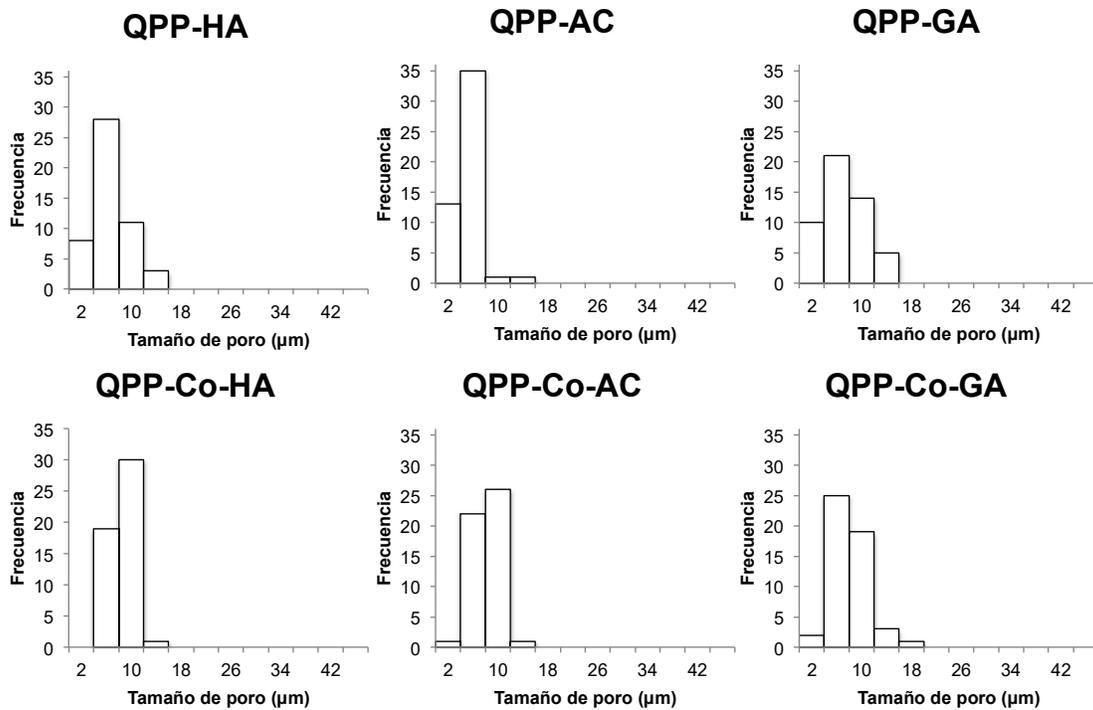


Figura 3.13. Distribuciones de tamaños de poro de los andamios 3D obtenidos por liofilización de hidrogeles de quitosano QPP.

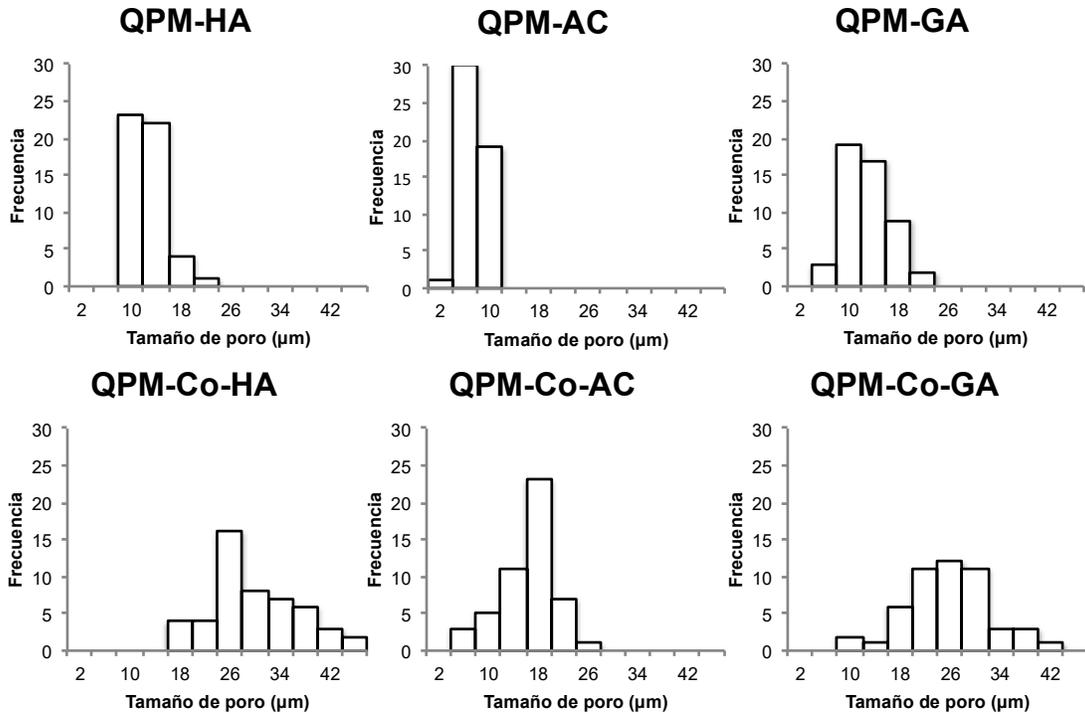


Figura 3.14. Distribuciones de tamaños de poro de los andamios 3D obtenidos por liofilización de hidrogeles de quitosano QPM.

El área superficial específica (S_{BET}) de los andamios se muestran en la Tabla 3.6. Las S_{BET} de los andamios obtenidos fueron en general, mayores a los valores reportados para otros hidrogeles a base de quitosano, que fueron secados por liofilización. Por ejemplo Kuo y col. (2006) reportaron un área superficial de 10, 15 y 20 m^2/g para matrices liofilizadas de QS con un pre-congelamiento de -4, -20 y -80 °C respectivamente, previo al proceso de liofilización; otros estudios encontraron áreas superficiales de 2 m^2/g para andamios de CS congelados a -80 °C⁹⁷. Esta diferencia podría deberse a que nuestros hidrogeles no se sometieron a un proceso de congelación previo, sino que se colocaron directamente en el sistema de enfriamiento incluido en el equipo de liofilización. De esta manera, los hidrogeles se sometieron a procesos de congelación rápida lo que permite una mejor conservación de la estructura fina del gel, según lo informado por Quignard y col., (2008). En este sentido, es bien sabido que una congelación previa antes de la liofilización mejora las características morfológicas y de composición local de los cristales de hielo, pero también debe considerarse que una congelación más rápida (producida por la reducción de la presión) produce una velocidad de nucleación más rápida de hielo, dando lugar a cristales más pequeños⁹⁸. Esto podría explicar los valores más altos de S_{BET} en los andamios de QS obtenidos en este trabajo.

Una clasificación de las isothermas de adsorción y desorción de Nitrógeno ha sido propuesta por la IUPAC⁹⁹⁻¹⁰¹, y con base a dicha clasificación, los andamios elaborados en este trabajo (sin y con colágeno) para QPP y QPM muestran una isoterma tipo V, tanto en el estudio de adsorción y desorción de Nitrógeno (ver Figuras 3.15 y 3.16 para QPP-QPM sin colágeno y QPP-QPM con colágeno respectivamente). Algunos autores documentan isothermas de Tipo IV para los aerogeles de QS^{10,84}; sin embargo, en nuestro caso, la curva de adsorción no mostró una parte cóncava a presiones relativas bajas P/P_0 . Además de esto, se sabe que las isothermas tipo IV y V presentan un fenómeno de histéresis (se produce cuando la curva de desorción no sigue la misma trayectoria de la curva de adsorción) la cual también ha sido clasificada por la IUPAC.

Debido a que los andamios de quitosano mostraron isoterma tipo V, se analizó la forma del bucle de histéresis obteniendo una histéresis tipo H_3 para todas las

muestras. En este sentido, las curvas de desorción de los andamios de quitosano siguieron una trayectoria muy cercana a las mostradas por las curvas de adsorción, excepto la muestra QPM-GA. También se puede observar que las muestras QPM exhiben isothermas con una mayor histéresis comparadas con QPP; esto se relaciona con el quitosano utilizado.

Tabla 3.6. Área superficial (S_{BET}) y promedio del tamaño de poro (T_{pMEB}) de los andamios-3D.

Material	S_{BET} (m^2/g)	T_p (μm) *
QPP-HA	106.45 \pm 4	6.38 \pm 2.79
QPP-AC	48.62 \pm 2	5.24 \pm 1.66
QPP-GA	27.14 \pm 1	6.95 \pm 3.05
QPP-Co-HA	81.01 \pm 3	8.66 \pm 1.65
QPP-Co-AC	25.42 \pm 2	8.02 \pm 1.76
QPP-Co-GA	71.53 \pm 3	7.87 \pm 2.74
QPM-HA	39.88 \pm 2	12.73 \pm 2.68
QPM-AC	44.77 \pm 2	7.71 \pm 2.41
QPM-GA	16.27 \pm 1	13.02 \pm 3.72
QPM-Co-HA	15.99 \pm 1	30.06 \pm 6.95
QPM-Co-AC	17.81 \pm 1	16.40 \pm 4.11
QPM-Co-GA	15.01 \pm 1	29.67 \pm 6.67

*Valor promedio de 50 mediciones.

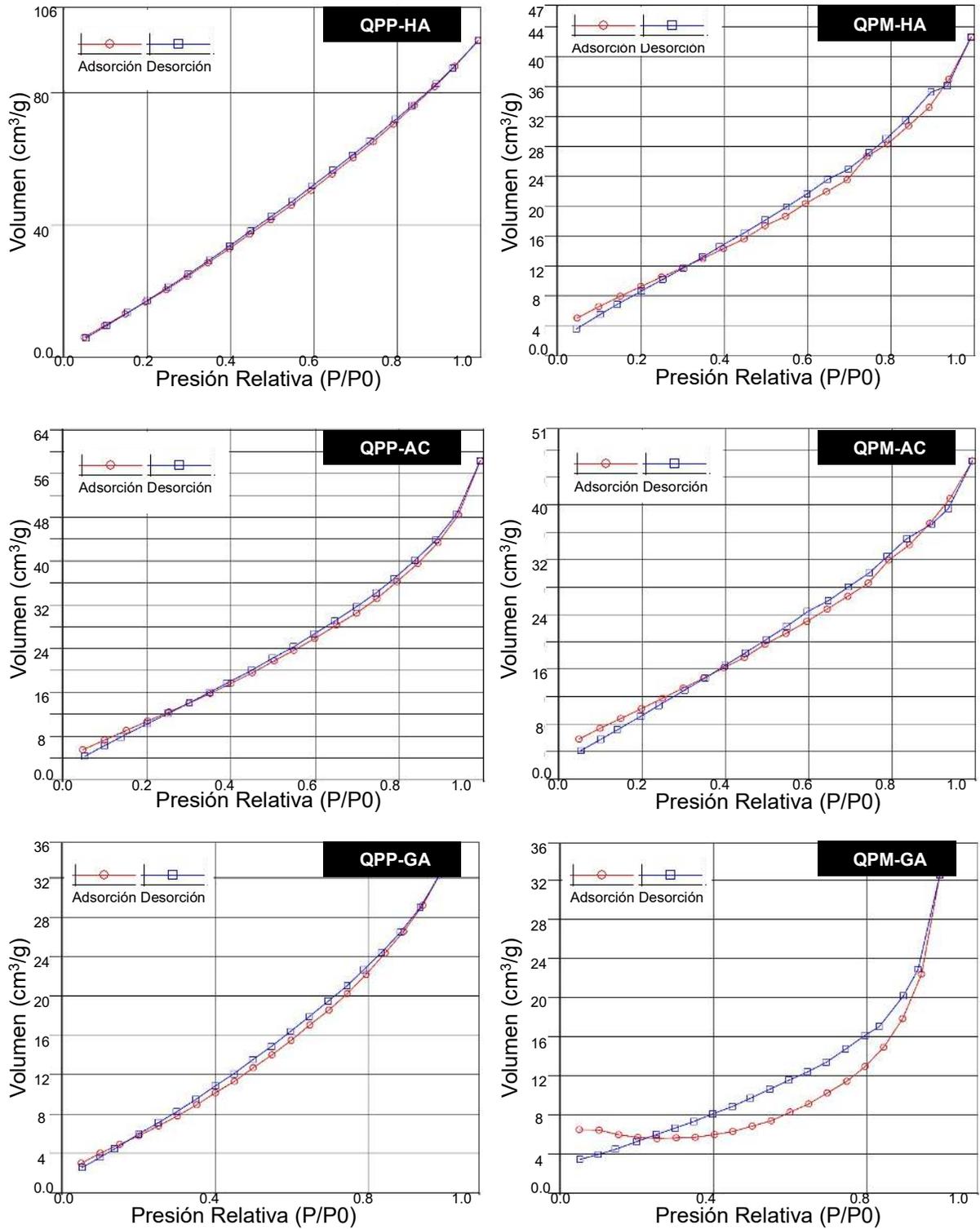


Figura 3.15. Isothermas BET de adsorción y desorción de Nitrógeno de andamios sin colágeno para los quitosanos QPP y QPM.

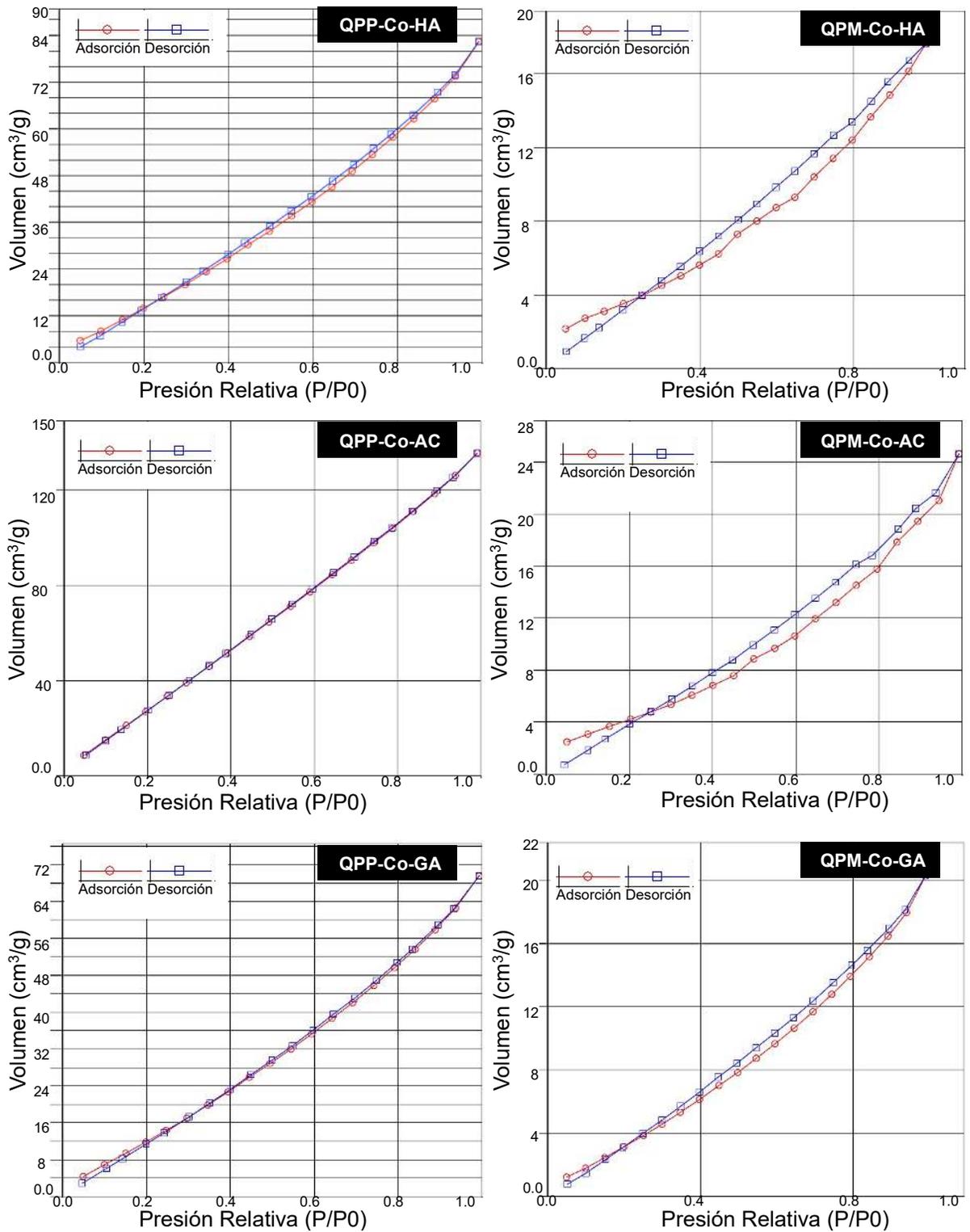


Figura 3.16. Isothermas BET de adsorción y desorción de Nitrógeno de andamios con colágeno para los quitosanos QPP y QPM.

3.2.5 Estructura (FTIR)

Las Figuras 3.17 y 3.18 presentan los espectros de infrarrojo de los andamios de quitosano QPP y QPM, respectivamente. En los incisos A, se muestran los materiales sin colágeno y en los incisos B, los tratamientos con Co. Como se puede ver en la figura 3.17-A y 3.18-A (quitosanos QPP y QPM, respectivamente), todos los espectros fueron similares entre sí, mostrando las bandas características de absorción de este polímero; en el intervalo de número de onda de $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$, se observó una banda amplia e intensa, asignándose a las vibraciones de estiramiento O-H y N-H. Además, se observaron bandas a 1653 cm^{-1} , que se asocia con el estiramiento C=O de la amida I y, a 1580 cm^{-1} relacionada con la deformación de la amida II^{84,102,103}. También se detectaron picos en 2923 cm^{-1} y 2880 cm^{-1} , asociados a los grupos metileno y, finalmente, en el intervalo de $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, señales características de su estructura de sacárido¹⁰⁴.

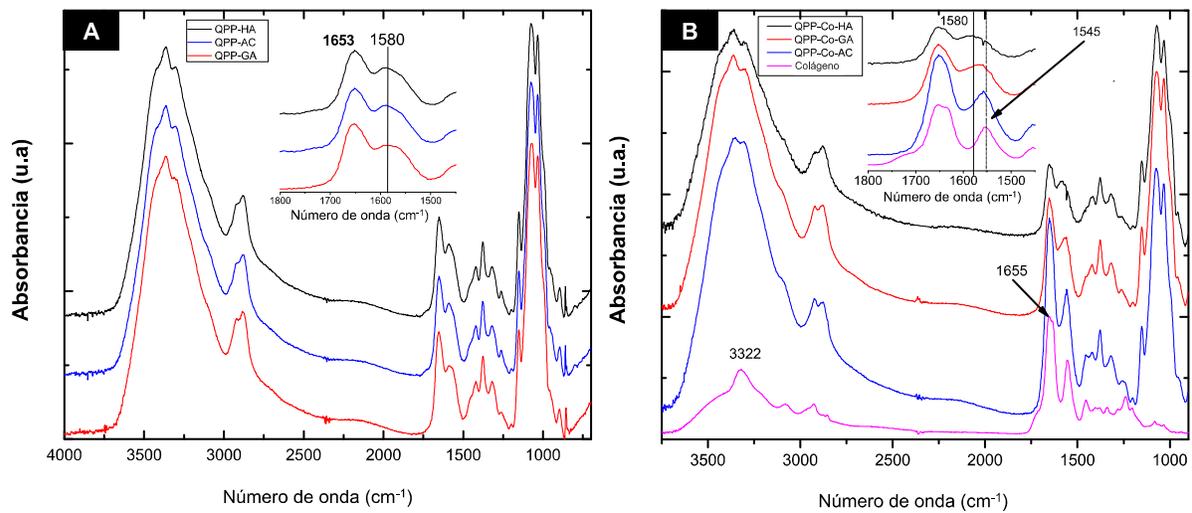
Monteiro y col., (1999), así como Beppu y col., (2007) informaron que la reacción de entrecruzamiento entre el GA y los grupos amino del quitosano produce una banda de absorción a 1655 cm^{-1} que pertenece al enlace imina (N = C) formado durante la reacción {Hoffman y col., (2009) postularon su ubicación en 1635 cm^{-1} }. En cualquier caso, esta banda se solaparía con las de 1653 cm^{-1} obtenida en el espectro del QS sin entrecruzar, por lo que la reacción de entrecruzamiento no podría demostrarse completamente. Sin embargo, la banda de 1580 cm^{-1} se desplazó a 1565 cm^{-1} en la muestra de QPM-GA (ver recuadro Figura 3.18-A) y en QPP-GA (ver recuadro Figura 3.17-A) la banda se hace más ancha, lo que podría estar asociado con los enlaces del grupo etileno de la estructura química de GA como lo sugieren Beppu y col., (2007) y Monteiro y col., (1999).

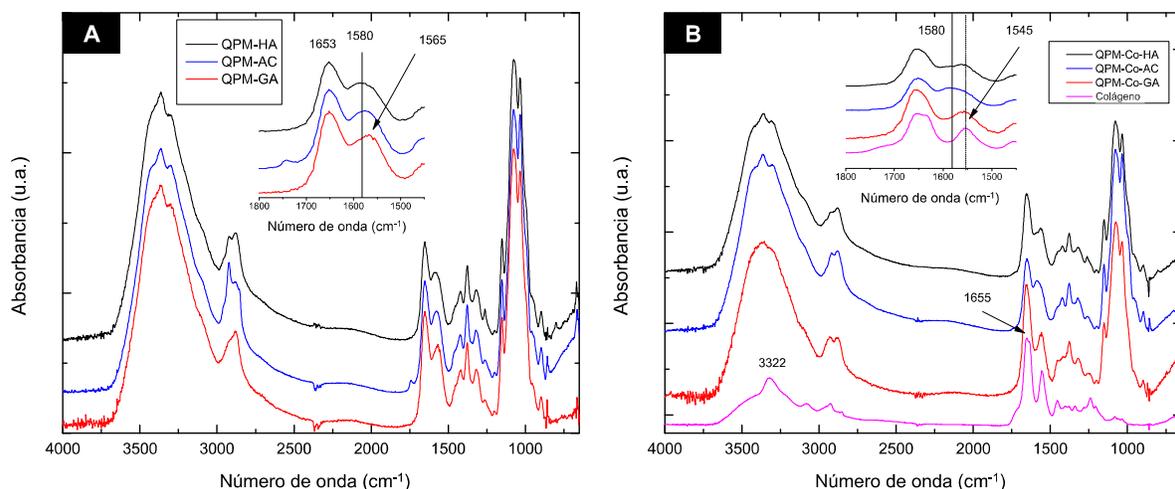
Los espectros de los andamios con Co (Figuras 3.17-B y 3.18-B) fueron similares a los que no contienen esta proteína, aunque se observaron diferencias sutiles principalmente en el intervalo de número de onda de $1700\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$.

El espectro de colágeno mostró una banda ancha centrada en 3322 cm^{-1} , que viene de la vibración de estiramiento del enlace N-H y una banda intensa a 1655 cm^{-1} , con un hombro a 1633 cm^{-1} , que se originan de la vibración del estiramiento C=O de la

absorción de la amida I. Un pico a 1545 cm^{-1} también fue detectado y atribuido tanto a la vibración de flexión N-H como a la vibración del estiramiento C-N^{81,108}. La banda de absorción a 1580 cm^{-1} , mostrada por el espectro FTIR de los andamios de quitosano (ver resultados 3.17-A y 3.17-B) se desplazó hacia números de onda más bajos en los andamios de quitosano/colágeno (QPP-Co y QPM-Co) en dirección de una banda exhibida por el espectro IR del colágeno a 1545 cm^{-1} . Este hecho confirma no solo la existencia de colágeno en los andamios sino también la interacción entre el QS y el Co.

También se puede observar que la relación entre la intensidad de las bandas a 3372 cm^{-1} en QPP-Co y QPM-Co (relacionada con la vibración de estiramiento N-H) y

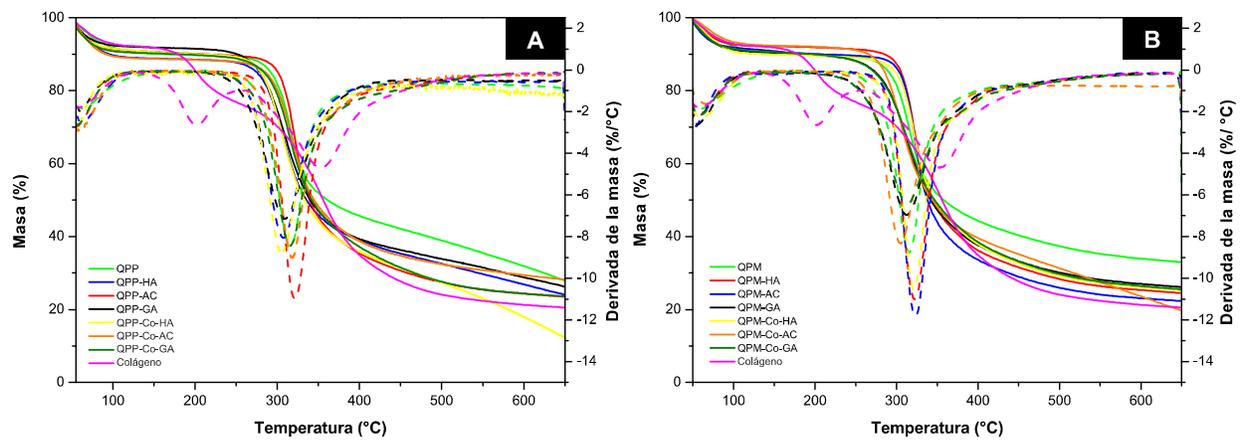




La Figura 3.19 presenta los análisis TGA para las muestras de quitosano (QPP y QPM) y colágeno en estado puro, así como para todos los andamios preparados en este trabajo. Se puede apreciar que el colágeno tiene una estabilidad térmica inferior al quitosano.

Los andamios de QPP y QPM entrecruzados físicamente (HA) y tratados con acetona (AC) no exhibieron cambios relevantes en la temperatura de descomposición con respecto a las muestras de QS en estado puro, ya que en los dos tratamientos no generaron cambios en la estructura química del quitosano. Sin embargo, en los andamios de quitosano tratados con GA (tanto QPP como QPM) se observó que la temperatura de descomposición es menor respecto de aquellos que no fueron entrecruzados por este método.

En contraste, los andamios de quitosano (QPP o QPM) que contienen colágeno presentan una estabilidad térmica mayor, en comparación con la temperatura de descomposición de los elementos constituyentes del material, ya que la Td de los andamios de QS-Co oscila los 320 °C, mientras que la del quitosano es 309°C y la del colágeno es 200°C. Esta conducta es similar a la obtenida por Shanmugasundaram y col. (2001), donde observan que una red semi-



3.2.1 Absorción de humedad

Se midió la absorción de agua bajo condiciones controladas de humedad relativa (H. R.). Se realizaron dos experimentos; en el primero, la humedad relativa fue del $50 \pm 1 \%$ y en el segundo caso fue del $91 \pm 1 \%$.

Durante el experimento a 50 % de H. R. (Figura 3.20), la absorción en los andamios resultó de 6-13 % para QPP y de 6-10 % para QPM. En contraste, cuando los materiales se expusieron a 91 % de H. R. (Figura 3.21), se obtuvieron absorciones en el intervalo de 40-50 % tanto para el QPP y QPM. Por lo que se demuestra que el quitosano presenta carácter hidrófilo y tendrá gran capacidad de absorción de H₂O y/o medio de crecimiento durante los ensayos de proliferación celular. En ambos experimentos, QPP-HA mostró mayor Absorción de humedad, lo cual puede relacionarse con la disponibilidad del grupo amino en la molécula del QS, haciéndolo más hidrófilo; en contraste, en los andamios en donde el grupo amino reaccionó con el agente entrecruzante, la absorción del material disminuyó.

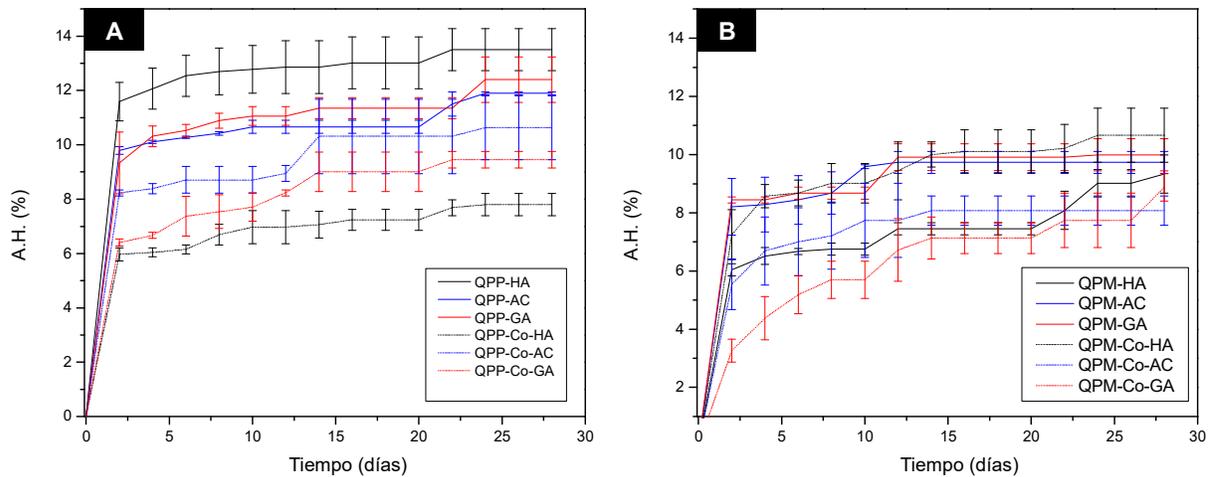


Figura 3.20. Porcentaje de absorción de humedad del 50 ± 1 % de andamios 3D: A) QPP y B) QPM

Los ensayos de absorción llevados a cabo en los andamios de quitosano QPM, a 50 ± 1 % y 91 ± 1 % de humedad relativa, no mostraron la tendencia exhibida por los andamios hechos de QPP. Esto podría deberse a que el QPM es de mayor peso molecular y los grupos hidrofílicos prefieren interactuar entre ellos que con el agua. También, este comportamiento puede estar relacionado con las zonas hidrófilas de dos mezclas de polímeros en un andamio, donde las zonas hidrofílicas ya fueron ocupadas por moléculas de agua ¹⁰⁹.

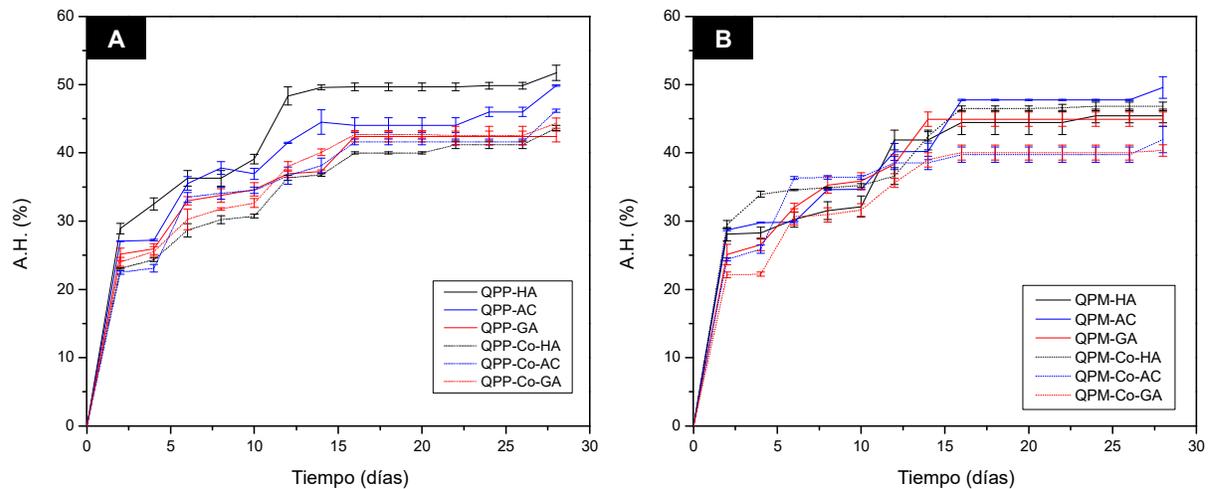


Figura 3.21. Porcentaje de absorción de humedad del 91 ± 1 % de andamios 3D: A) QPP y B) QPM

3.2.8 Degradación *in vitro*

La degradación del QS ha sido estudiada en un sin número de investigaciones *in vitro*^{79,110,111}. Sin embargo, las condiciones utilizadas en dichos estudios son aceleradas, debido a condiciones como una alta concentración de lisozima, o bien un pH ácido (normalmente por debajo de pH 6.2, que es donde se observa la actividad máxima de lisozima). En contraste, en nuestro estudio se utilizó una concentración de lisozima similar a la encontrada en el suero del cuerpo humano (1.5 µg/mL), un pH fisiológico de 7.4 y, una temperatura de 37 °C, para tratar de simular una degradación *in vivo*⁷⁹. Fue interesante observar que las muestras de QPP y QPM (Figura 3.22), que fueron entrecruzadas con glutaraldehído fueron las que mostraron las menores pérdidas de masa, por lo que resultaron más estables. Por otro lado, los materiales hechos de QPP y QPM, tratados con acetona, presentaron la mayor degradación (sin diferencias significativas); a pesar de lo anterior, QPM-AC presentó una mayor pérdida de masa que QPP-AC. Esto puede ser debido a que el QPM presenta ligeramente un mayor grado de acetilación que el QPP. Freier y col., (2005) estudiaron la degradación de materiales con QS y sugirieron que la falta de residuos consecutivos de N-acetil glucosamina (que contienen principalmente 3-4 o más unidades acetiladas) podría afectar la degradación de andamios de quitosano. Liu y col., (2012) prepararon un andamio poroso de colágeno/quitosano para IT de piel y estudiaron su degradación obteniendo resultados similares a los nuestros.

En contraste, los andamios de quitosano que contienen colágeno siempre mostraron mayores pérdidas de masa que los que no tenían esta proteína. Huang y col., (2005) señalaron que la presencia de otro polímero afectaría el comportamiento de degradación de los andamios de quitosano.

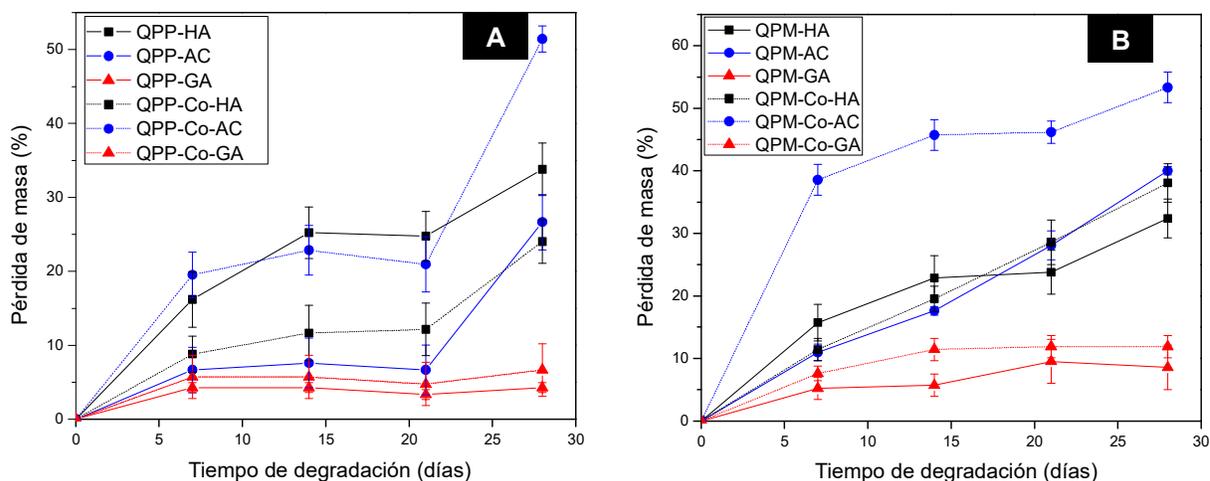


Figura 3.22. Pérdida de masa progresiva de los andamios con A) QPP y B) QPM después del almacenamiento en PBS a 37 °C con 1.5 µg/mL de lisozima. Los datos que se observan son el valor promedio \pm la desviación estándar (n=3).

3.3 Evaluación de las propiedades biológicas

3.3.1 Biocompatibilidad

Existen muchos métodos para evaluar el efecto citotóxico de los biomateriales sobre células cultivadas. Generalmente, estos métodos llevan a cabo un monitoreo de alteraciones no específicas de la actividad celular básica, en organelos como las mitocondrias, o la integridad de la membrana plasmática, entre otras.¹¹³. Independientemente del ensayo elegido, un material se considera no citotóxico cuando produce resultados de viabilidad celular por encima del 70 %⁸⁹. Los resultados de las pruebas de citotoxicidad para los andamios de QPP (con y sin colágeno) en el ensayo azul de tripán y la viabilidad en MTT para el método de contacto indirecto se muestran en la Figura 3.23; mientras que para el método de contacto directo se observa en la Figura 3.24. Del mismo modo, se presentan los resultados para los andamios de quitosano QPM (con y sin colágeno) para contacto indirecto en la Figura 3.25, y para contacto directo en la Figura 3.26.

Se puede observar que para el método de contacto indirecto, los andamios hechos con los quitosanos QPP y QPM no fueron citotóxicos, a excepción de las muestras que contenían glutaraldehído (QPP-GA y QPM-GA), los cuales mostraron una caída

de la viabilidad celular a valores de 60% y 50%, respectivamente. En primera instancia, esto era esperado ya que es bien sabido que el glutaraldehído residual es la razón principal de la citotoxicidad de los andamios químicamente entrecruzados^{55,113,114}. De manera interesante, todos los andamios que contenían colágeno fueron no citotóxicos, incluidos aquellos andamios entrecruzados químicamente (QPP-Co-GA y QPM-Co-GA) ya que éstos alcanzaron el valor mínimo para ser considerado no citotóxico (un valor de viabilidad del 70%). Estudios previos reportan que el colágeno podría aumentar la citocompatibilidad de los andamios de quitosano⁶⁹, por lo tanto, los resultados obtenidos confirman que la adición de colágeno a los andamios de quitosano mejora su rendimiento biológico. También resultaron valores muy similares en el método de contacto directo a partir de extractos (Figura 3.24 y 3.26).

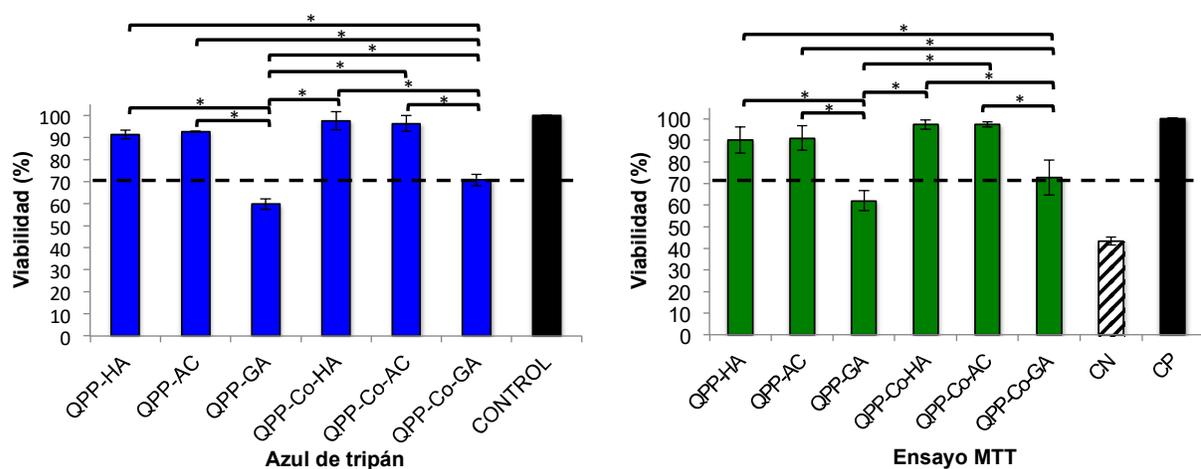


Figura 3.23. Biocompatibilidad de andamios 3D de QPP con fibroblastos L929 por contacto indirecto. Azul de tripán y ensayo MTT. CN: control negativo (DMSO), CP: control positivo (Medio RPMI 1640), * $p < 0.05$, prueba de Tukey.

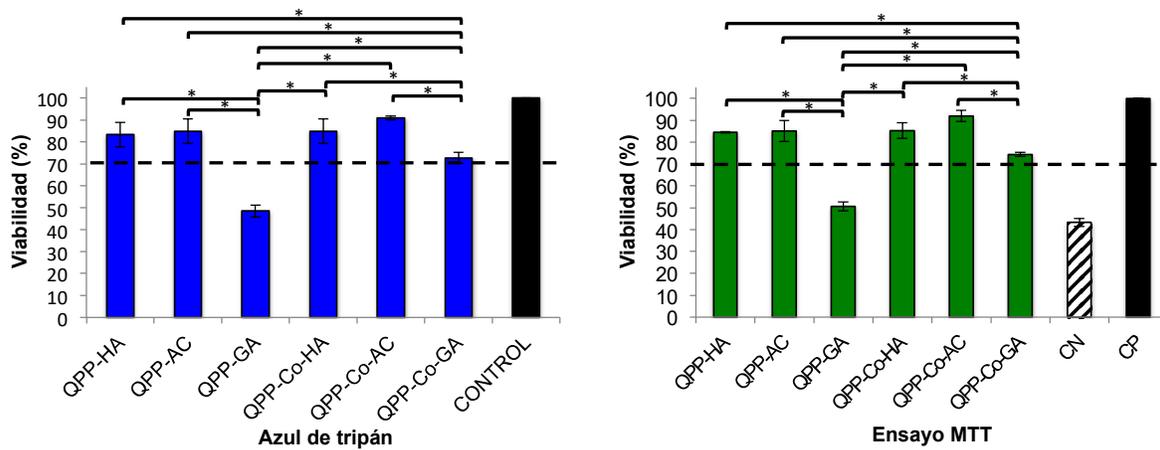


Figura 3.24. Biocompatibilidad de andamios 3D de QPP con fibroblastos L929 por contacto directo. Azul de tripán y ensayo MTT. CN: control negativo (DMSO), CP: control positivo (Medio RPMI 1640), * $p < 0.05$, prueba de Tukey.

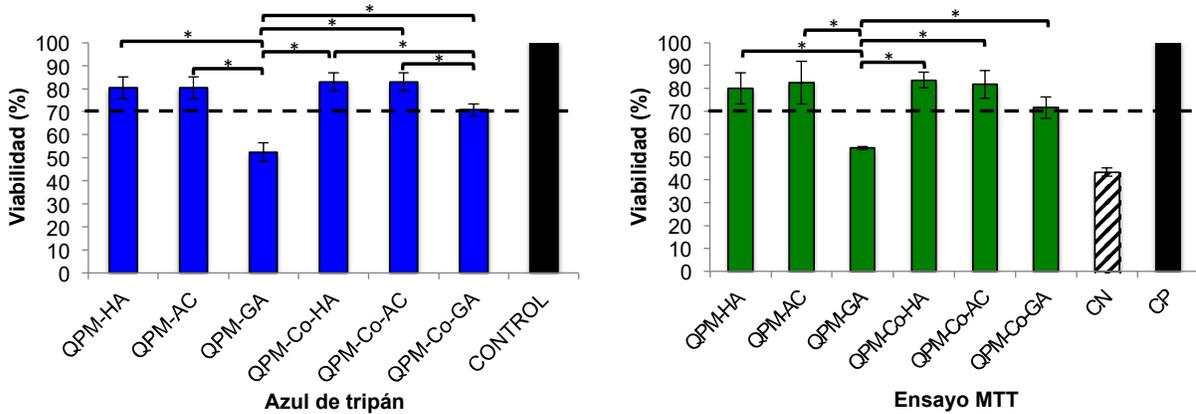


Figura 3.25. Biocompatibilidad de andamios 3D de QPM con fibroblastos L929 por contacto indirecto. Azul de tripán y ensayo MTT. CN: control negativo (DMSO), CP: control positivo (Medio RPMI 1640), * $p < 0.05$, prueba de Tukey.

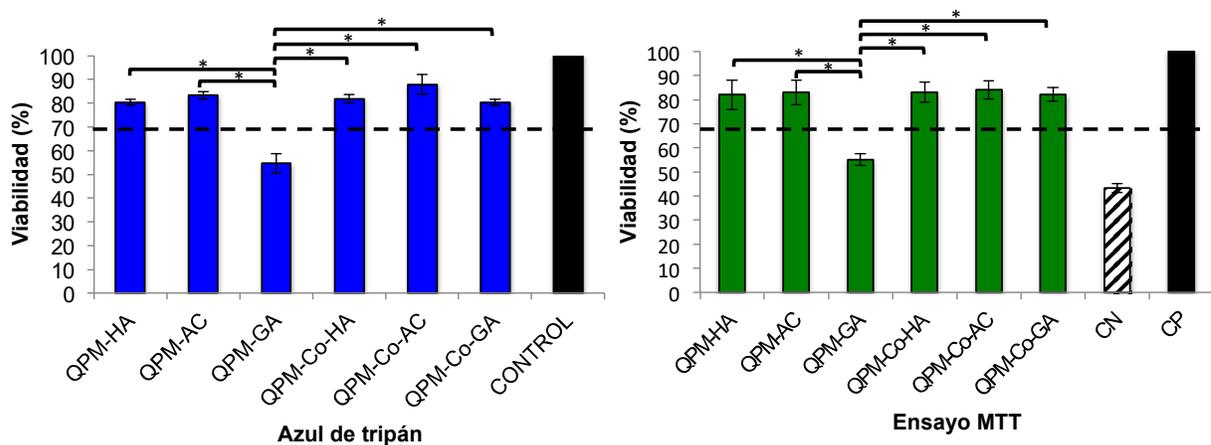


Figura 3.26. Biocompatibilidad de andamios 3D de QPM con fibroblastos L929 por contacto directo. Azul de tripán y ensayo MTT. CN: control negativo (DMSO), CP: control positivo (Medio RPMI 1640), * $p < 0.05$, prueba de Tukey.

3.3.2 Proliferación fibroblastos L929 sobre andamios

La proliferación que presentaron las células L929 sobre los andamios tridimensionales se observó después de 14 días de cultivo mediante microscopía de epifluorescencia a 20X a una longitud de onda de 460-490 nm. Los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes de las Figuras 3.27 y 3.28 permiten observar el núcleo, y por ende a las células L929, sobre los andamios de QPP y QPM, respectivamente. Los núcleos de las células en los andamios 3D exhiben una forma esférica en las distintas micrografías. En las micrografías de los andamios de quitosano QPP-HA, QPP-AC y QPP-Co-HA, se puede apreciar que las células se encuentran formando parte de conglomerados; además, se puede observar que las células se extendieron hacia el interior del andamio debido a que a que en distintos planos se enfocaban otras células. En contraste, en la micrografía del tratamiento QPP-Co-GA se observan muy pocas células, lo que indica baja tasa de proliferación sobre este tipo de sustrato, tal y como se ha observado en otros estudios^{115,116}. Por otra parte, los andamios con tratamiento de QPP-GA, presentan buena proliferación alrededor del andamio, pero no dentro, ni superficialmente (ya que las células cuando se observaban en el microscopio se veían en un solo plano y cuando había proliferación hacia dentro del andamio se percibían células en

distintos planos), se concluye que no hay migración hacia dentro del material. En la micrografía del material QPP-Co-HA es importante destacar las aglomeraciones que se observan, ya que estas conformaciones son adoptadas por algunos fibroblastos de manera normal, y han sido reportadas en otras investigaciones, sobre todo en aquellas en las que se utilizan andamios hechos con polímeros naturales como el colágeno¹¹⁷.

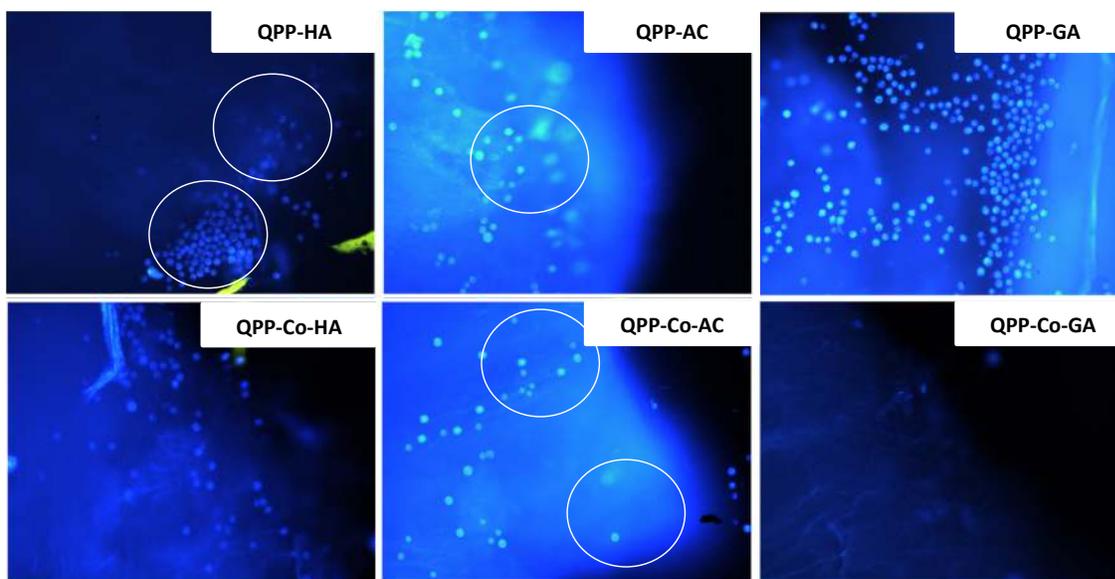


Figura 3.27. Micrografías de microscopía epifluorescencia (20X) del cultivo de células L929 sobre andamios 3D de QPP a los 14 días

En los andamios de quitosano QPM (figura 3.28) se observó menor proliferación celular; esto se pudo deber al tipo de quitosano que se utilizó en la elaboración del andamio 3D, donde este QPM es de mayor peso molecular y presenta menos reactividad para interactuar con la línea celular. Esto pudiera ser a que se propician las interacciones entre los grupos funcionales de la estructura de la molécula del quitosano, disminuyendo su reactividad para entrar en contacto con los fibroblastos. Así mismo, se observó que los andamios QPM-HA y QPM-AC presentaron mejor proliferación en el interior de los andamios en comparación con los que fueron entrecruzados con GA; lo anterior se pudo notar aún en los materiales que contenían colágeno.

De acuerdo a las pruebas de proliferación celular, estos andamios mostraron una buena capacidad de adhesión celular. Por lo tanto, los andamios de las mezclas

hechas a partir de quitosano (QPP) y colágeno presentaron proliferación celular, a excepción de aquellos en los que se utilizó GA como tratamiento en su elaboración.

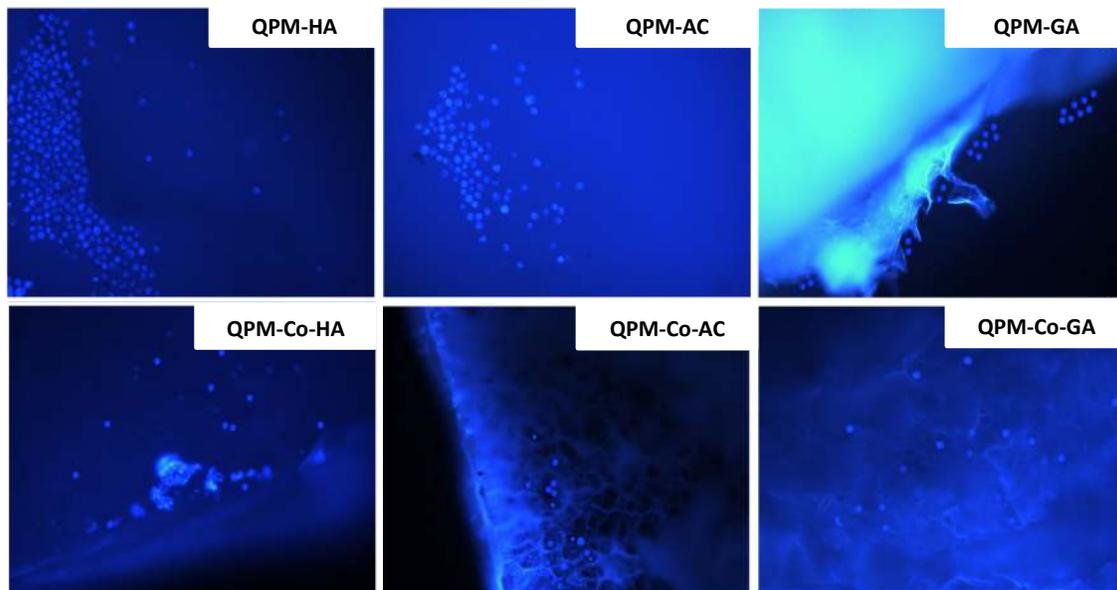


Figura 3.28. Micrografías de microscopía epifluorescencia (20X) del cultivo de células L929 sobre andamios 3D de QPM a los 14 días.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron andamios 3D de QS y QS-Co entrecruzados por métodos físicos y químicos. Las micrográficas de MEB de los andamios mostraron materiales con poros constituidos por redes interconectadas de los componentes de los materiales, a excepción de los tratados con GA donde se observó aglomeraciones en la morfología tridimensional del andamio. De igual modo se obtuvieron andamios con valores de área superficial superior a las reportadas por otros autores para materiales obtenidos por liofilización. Esto propicia materiales de quitosano-colágeno con mayor funcionalidad en la estructura del material, que estará disponible para ser aprovechado en la viabilidad celular. En contraste, los materiales tratados con GA presentaron agregados de QS en la estructura del andamio, lo que disminuyó el área superficial. Esto fue comprobado por el mapeo elemental del nitrógeno donde se ven cúmulos de señales de Nitrógeno. Así mismo, se confirmó por FTIR la nula formación de un nuevo enlace en materiales con QPP y QPM cuando eran utilizados los métodos físicos, lo que indica que se conservan los grupos funcionales amino del quitosano. También se analizó la estabilidad térmica de los andamios y se observó que QPP-Co-HA tuvo una mayor estabilidad que el QPM-Co-HA debido al empaquetamiento estructural de las moléculas de QS; esto último está relacionado con el menor peso molecular exhibido por el QPP, así como un mayor grado de acetilación. Además, se puede ver que los andamios que tuvieron un tratamiento con GA presentan una menor estabilidad térmica que con aquellos que no se les dio dicho tratamiento.

Las pruebas biológicas demostraron que los andamios 3D con QPP y QPM no son citotóxicos para las células L929 a excepción de los que se entrecruzaron con GA. Cuando se agregó colágeno a los andamios, los materiales generados presentaron niveles de viabilidad mayores a los encontrados para los andamios sin colágeno; esto se obtuvo incluso en los andamios entrecruzados con GA, los cuales llegaron al límite del 70% de viabilidad, por lo que dejaron de ser citotóxicos. El análisis de proliferación celular en los materiales confirmó la inocuidad de los materiales,

permitiendo la proliferación celular, lo que sugiere que los andamios a base de QS-Co son buenos candidatos para ser usados en ingeniería de tejidos de piel.

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación indican que los andamios elaborados a base de la mezcla de quitosano y colágeno poseen características físicas y de biocompatibilidad aptas para su aplicación en ingeniería de tejidos. Sin embargo, para futuras investigaciones se recomienda lo siguiente:

- Trabajar con otro tipo de células, como los queratinocitos para conocer la viabilidad y proliferación de éstas en el andamio.
- Ensayo de citometría de flujo para conocer si los materiales inducen a apoptosis y por ende los bajos niveles de viabilidad y proliferación celular.
- Establecer una metodología viable para implantar el andamio en ratas normales y con alguna patología, por ejemplo diabetes para saber su efecto de degradación *in vivo*, además de conocer su biocompatibilidad ante alguna respuesta inmune.
- Utilizar un factor de crecimiento de fibroblastos para aumentar el índice de actividad mitótica y síntesis de ADN facilitando la proliferación de varias células precursoras, que formen tejido fibroso, de unión y de soporte antes de ser implantado en ratas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cocolletzi, H. H.; Almanza, E. Á.; Agustin, O. F.; Nava, E. L. V.; Cassellis, E. R. Obtención Y Caracterización de Quitosano a Partir de Exoesqueletos de Camarón. **2009**, 22 (3), 57–60.
- (2) Huang, Y.; Onyeri, S.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, S. V. In Vitro Characterization of Chitosan-Gelatin Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials* **2005**, 26 (36), 7616–7627.
- (3) Hong, P.-Z.; Li, S.-D.; Ou, C.-Y.; Li, C.-P.; Yang, L.; Zhang, C.-H. Thermogravimetric Analysis of Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 105 (2), 547–551.
- (4) Seal, B. Polymeric Biomaterials for Tissue and Organ Regeneration. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2001**, 34 (4-5), 147–230.
- (5) Gomathi, K.; Gopinath, D.; Rafiuddin Ahmed, M.; Jayakumar, R. Quercetin Incorporated Collagen Matrices for Dermal Wound Healing Processes in Rat. *Biomaterials* **2003**, 24 (16), 2767–2772.
- (6) Ky, D.; Liu, C. K.; Marumoto, C.; Castaneda, L.; Slowinska, K. Electrochemical Time-of-Flight in Crosslinked Collagen Matrix Solution: Implications of Structural Changes for Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2006**, 112 (2), 214–222.
- (7) Marois, Y.; Chakfé, N.; Deng, X.; Marois, M.; How, T.; King, M. W.; Guidoin, R. Carbodiimide Cross-Linked Gelatin: A New Coating for Porous Polyester Arterial Prostheses. *Biomaterials* **1995**, 16 (15), 1131–1139.
- (8) Matthews, J. A.; Wnek, G. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules* **2002**, 3 (2), 232–238.
- (9) Rinaudo, M.; Pavlov, G.; Desbrières, J. Influence of Acetic Acid Concentration on the Solubilization of Chitosan. *Polymer (Guildf)*. **1999**, 40 (25), 7029–7032.
- (10) Tsiptsias, C.; Michailof, C.; Stauroopoulos, G.; Panayiotou, C. Chitin and Carbon Aerogels from Chitin Alcohols. *Carbohydr. Polym.* **2009**, 76 (4), 535–540.
- (11) Agulló, Enrique, Mato Roberto, Tapia Cristián, Peniche Carlos, Heras Ángeles, San Román Julio, Argüelles Waldo, Goycoolea Francisco, Mayorga Ada, Nakamatsu Javier, P. A. *Quitina Y Quitosano: Obtención, Caracterización Y Aplicaciones*; Fondo Editorial 2004, Ed.; Pontificia Universidad Católica del Perú: Perú, 2004; p 311.

- (12) Sangsanoh, P.; Suwantong, O.; Neamnark, A.; Cheepsunthorn, P.; Pavasant, P.; Supaphol, P. In Vitro Biocompatibility of Electrospun and Solvent-Cast Chitosan Substrata towards Schwann, Osteoblast, Keratinocyte and Fibroblast Cells. *Eur. Polym. J.* **2010**, *46* (3), 428–440.
- (13) Wang, X.; Sang, L.; Luo, D.; Li, X. From Collagen-Chitosan Blends to Three-Dimensional Scaffolds: The Influences of Chitosan on Collagen Nanofibrillar Structure and Mechanical Property. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2011**, *82* (1), 233–240.
- (14) Arpornmaeklong, P.; Suwatwirote, N.; Pripatnanont, P.; Oungbho, K. Growth and Differentiation of Mouse Osteoblasts on Chitosan-Collagen Sponges. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2007**, *36* (4), 328–337.
- (15) Vats, A.; Tolley, N. S.; Polak, J. M.; Gough, J. E. Scaffolds and Biomaterials for Tissue Engineering: A Review of Clinical Applications. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **2003**, *28* (3), 165–172.
- (16) Kremer, M.; Lang, E.; Berger, A. C. Evaluation of Dermal-Epidermal Skin Equivalents ('composite-Skin') of Human Keratinocytes in a Collagen-Glycosaminoglycan matrix(Integra Artificial Skin). *Br. J. Plast. Surg.* **2000**, *53* (6), 459–465.
- (17) Maquet, V.; Boccaccini, A. R.; Pravata, L.; Notingher, I.; Jérôme, R. Porous Poly(alpha-hydroxyacid)/Bioglass Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. I: Preparation and in Vitro Characterisation. *Biomaterials* **2004**, *25* (18), 4185–4194.
- (18) Wang, X.; Grogan, S. P.; Rieser, F.; Winkelmann, V.; Maquet, V.; Berge, M. La; Mainil-Varlet, P. Tissue Engineering of Biphasic Cartilage Constructs Using Various Biodegradable Scaffolds: An in Vitro Study. *Biomaterials* **2004**, *25* (17), 3681–3688.
- (19) Cho, S.-W.; Kim, I.-K.; Lim, S. H.; Kim, D.-I.; Kang, S.-W.; Kim, S. H.; Kim, Y. H.; Lee, E. Y.; Choi, C. Y.; Kim, B.-S. Smooth Muscle-like Tissues Engineered with Bone Marrow Stromal Cells. *Biomaterials* **2004**, *25* (15), 2979–2986.
- (20) Rashid, S. T.; Salacinski, H. J.; Hamilton, G.; Seifalian, A. M. The Use of Animal Models in Developing the Discipline of Cardiovascular Tissue Engineering: A Review. *Biomaterials* **2004**, *25* (9), 1627–1637.
- (21) Yannas, I. V.; Hill, B. J. Selection of Biomaterials for Peripheral Nerve Regeneration Using Data from the Nerve Chamber Model. *Biomaterials* **2004**, *25* (9), 1593–1600.

- (22) Shwayder, T.; Akland, T. Neonatal Skin Barrier: Structure, Function, and Disorders. *Dermatol. Ther.* **2005**, *18* (2), 87–103.
- (23) Bouwstra, J. A.; Ponc, M. The Skin Barrier in Healthy and Diseased State. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758* (12), 2080–2095.
- (24) Gilchrest, B. A.; Park, H. Y.; Eller, M. S.; Yaar, M. Mechanisms of Ultraviolet Light-Induced Pigmentation. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63* (1), 1–10.
- (25) Proksch, E.; Fölster-Holst, R.; Jensen, J.-M. Skin Barrier Function, Epidermal Proliferation and Differentiation in Eczema. *J. Dermatol. Sci.* **2006**, *43* (3), 159–169.
- (26) Guerrero-Aspizua, S.; García, M.; Murillas, R.; Retamosa, L.; Illera, N.; Duarte, B.; Holguín, A.; Puig, S.; Hernández, M. I.; Meana, A.; et al. Development of a Bioengineered Skin-Humanized Mouse Model for Psoriasis: Dissecting Epidermal-Lymphocyte Interacting Pathways. *Am. J. Pathol.* **2010**, *177* (6), 3112–3124.
- (27) McLafferty, E.; Hendry, C.; Alistair, F. The Integumentary System: Anatomy, Physiology and Function of Skin. *Nurs. Stand.* **2012**, *27* (3), 35–42.
- (28) Dardour, J.-C. [New Anatomical Approach of Adipose Tissue]. *Ann. Chir. Plast. esthétique* **2012**, *57* (5), 454–464.
- (29) Maquet, V.; Jerome, R. Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation. In *Materials Science Forum*; 1997; Vol. 250, pp 15–42.
- (30) Tan, S. C.; Tan, T. K.; Wong, S. M.; Khor, E. The Chitosan Yield of Zygomycetes at Their Optimum Harvesting Time. *Carbohydr. Polym.* **1996**, *30* (4), 239–242.
- (31) Dutta, P. K.; Dutta, J.; Tripathi, V. S. Chitin and Chitosan : Chemistry , Properties and Applications. **2004**, *63* (January), 20–31.
- (32) Braconnot, H. Sur La Nature Des Champiñones. *Ann. Chi Phys* **1811**, *79*, 265–304.
- (33) Rodríguez-Pedroso, A. T.; Ramírez-Arrebato, M. A.; Rivero-González, D.; Bosquez-Molina, E.; Barrera-Necha, L. L.; Bautista-Baños, S. Propiedades Químico-Estructurales Y Actividad Biológica de La Quitosana En Microorganismos Fitopatógenos. *Rev. CHAPINGO Ser. Hortic.* **2009**, *15* (3), 307–317.

- (34) Baldrick, P. The Safety of Chitosan as a Pharmaceutical Excipient. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *56* (3), 290–299.
- (35) Goycoolea, F.; E. A.; Mato, R. *Caracterización de Quitina Y Quitosano*; Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú., Ed.; Perú, 2004.
- (36) El-hefian, E. A.; Yahaya, A. H. Rheological Study of Chitosan and Its Blends: An Overview. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* **2010**, *4* (02), 210–220.
- (37) Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan—A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (8), 981–1014.
- (38) Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F. M.; Argüelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. *Polymer (Guildf)*. **2001**, *42* (8), 3569–3580.
- (39) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R. Structure and Interactions in Chitosan Hydrogels Formed by Complexation or Aggregation for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57* (1), 35–52.
- (40) Okuyama, K.; Noguchi, K.; Kanenari, M.; Egawa, T.; Osawa, K.; Ogawa, K. Structural Diversity of Chitosan and Its Complexes. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *41* (3), 237–247.
- (41) Toan, N. Van. Production of Chitin and Chitosan from Partially Autolyzed Shrimp Shell Materials. *Open Biomater. J.* **2009**, *1* (1).
- (42) Tsaih, M. L.; Chen, R. H. Effect of Degree of Deacetylation of Chitosan on the Kinetics of Ultrasonic Degradation of Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *90* (13), 3526–3531.
- (43) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (7), 603–632.
- (44) Yui, T.; Imada, K.; Okuyama, K.; Obata, Y.; Suzuki, K.; Ogawa, K. Molecular and Crystal Structure of the Anhydrous Form of Chitosan. *Macromolecules* **1994**, *27* (26), 7601–7605.
- (45) Roberts, G. A. F. *Chitin Chemistry*; Macmillan Publishers Limited, 1992; p 350.
- (46) Ramos, V. M.; Rodríguez, N. M.; Díaz, M. F.; Rodríguez, M. S.; Heras, A.; Agulló, E. N-Methylene Phosphonic Chitosan. Effect of Preparation Methods on Its Properties. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *52* (1), 39–46.

- (47) Javier Abadía. Preparación Y Caracterización Mecánica de Hidrogeles de Quitosano Para Soporte de Células de Cartílago., Universidad de Zaragoza, 2010.
- (48) Rinaudc, M.; Pavlov, G.; Desbrières, J. Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **1999**, *5* (3), 267–276.
- (49) Christopher K. Mathews, K. E. van Holde, K. G. A. *Bioquímica*, 3era Edici.; Wesley, E. A., Ed.; 2004; p 1368.
- (50) Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T. Collagens--Structure, Function, and Biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55* (12), 1531–1546.
- (51) Ricard-Blum, S.; Ruggiero, F. The Collagen Superfamily: From the Extracellular Matrix to the Cell Membrane. *Pathol. Biol. (Paris)*. **2005**, *53* (7), 430–442.
- (52) Caló, E.; Khutoryanskiy, V. V. Biomedical Applications of Hydrogels: A Review of Patents and Commercial Products. *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 252–267.
- (53) Künzler, J. F. Hydrogels. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2002.
- (54) Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F. Novel Crosslinking Methods to Design Hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (1), 13–36.
- (55) Yunyun Liu, Lie Ma, C. G. Facile Fabrication of the Glutaraldehyde Cross-Linked Collagen/chitosan Porous Scaffold for Skin Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32* (8), 2361–2366.
- (56) Kildeeva, N. R.; Perminov, P. A.; Vladimirov, L. V.; Novikov, V. V.; Mikhailov, S. N. About Mechanism of Chitosan Cross-Linking with Glutaraldehyde. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2009**, *35* (3), 360–369.
- (57) Macea, R. B.; De Hoyos, C. F.; Montes, Y. G.; Fuentes, E. M.; Ruiz, J. I. R. Síntesis Y Propiedades de Filmes Basados En Quitosano/lactosuero. *Polímeros* **2015**, *25* (1), 58–69.
- (58) Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26* (27), 5474–5491.
- (59) Hutmacher, D. W. Scaffold Design and Fabrication Technologies for Engineering Tissues — State of the Art and Future Perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2001**, *12* (1), 107–124.

- (60) Cao, Y.; Vacanti, J. P.; Paige, K. T.; Upton, J.; Vacanti, C. A. Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear. *Plast. Reconstr. Surg.* **1997**, *100* (2), 297–302; discussion 303–304.
- (61) Rosenbaum, J. T.; Ronick, M. B.; Song, X.; Choi, D.; Planck, S. R. T Cell-Antigen-Presenting Cell Interactions Visualized in Vivo in a Model of Antigen-Specific Inflammation. *Clin. Immunol.* **2008**, *126* (3), 270–276.
- (62) Todd, P. E. E.; East, I. J.; Leach, S. J. The Immunogenicity and Antigenicity of Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1982**, *7* (6), 212–216.
- (63) GORDON, J. E. *Estructuras O Por Que Las Cosas No Se Caen*; Ediciones, C., Ed.; España, 2004; pp 52–54.
- (64) Mikos, A. G.; Temenoff, J. S. Formation of Highly Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering. *Electron. J. Biotechnol.* **2000**, *3* (2), 1–6.
- (65) Hsu, Y. Y.; Gresser, J. D.; Trantolo, D. J.; Lyons, C. M.; Gangadharam, P. R.; Wise, D. L. Effect of Polymer Foam Morphology and Density on Kinetics of in Vitro Controlled Release of Isoniazid from Compressed Foam Matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *35* (1), 107–116.
- (66) Autissier, A.; Le Visage, C.; Pouzet, C.; Chaubet, F.; Letourneur, D. Fabrication of Porous Polysaccharide-Based Scaffolds Using a Combined Freeze-Drying/cross-Linking Process. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (9), 3640–3648.
- (67) Huige, N. J. J. Nucleation and Growth of Ice Crystals from Water and Sugar Solutions in Continuous Stirred Tank Crystallizers. Eindhoven University of Technology 1972, pp 1–20.
- (68) Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97* (8), 2892–2923.
- (69) Fernandes, L. L.; Resende, C. X.; Tavares, D. S.; Soares, G. a.; Castro, L. O.; Granjeiro, J. M. Cytocompatibility of Chitosan and Collagen-Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. *Polímeros* **2011**, *21* (1), 1–6.
- (70) Ramos, M.; Zamora Mora, V.; Rodríguez, G.; Sibaja Ballester, M. del R.; Madrigal Carballo, S.; Lopretti Correa, M. I. Andamiajes Tridimensionales Tipo Esponjas Basados En Bioconjugados Colágeno-Quitano Como Potencial Biomaterial Para Aplicaciones En Ingeniería de Tejidos. *Innotec.* 2012, pp 43–48.

- (71) Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; Zhou, J.; Shen, J.; Hu, X.; Han, C. Collagen/chitosan Porous Scaffolds with Improved Biostability for Skin Tissue Engineering. *Biomaterials* **2003**, *24* (26), 4833–4841.
- (72) Shanmugasundaram, N.; Ravichandran, P.; Neelakanta Reddy, P.; Ramamurty, N.; Pal, S.; Panduranga Rao, K. Collagen–chitosan Polymeric Scaffolds for the in Vitro Culture of Human Epidermoid Carcinoma Cells. *Biomaterials* **2001**, *22* (14), 1943–1951.
- (73) Seda Tiğli, R.; Karakeçili, A.; Gümüşderelioğlu, M. In Vitro Characterization of Chitosan Scaffolds: Influence of Composition and Deacetylation Degree. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18* (9), 1665–1674.
- (74) Zhang, H.; Zhang, F.; Wu, J. Physically Crosslinked Hydrogels from Polysaccharides Prepared by Freeze-Thaw Technique. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (7), 923–928.
- (75) Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F. Novel Crosslinking Methods to Design Hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 223–236.
- (76) Maitra, J.; Shukla, V. K. Cross-Linking in Hydrogels - A Review. *Am. J. Polym. Sci.* **2014**, *4* (2), 25–31.
- (77) Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49* (4), 780–792.
- (78) Monteiro, O. a. C.; Airoidi, C. Some Studies of Crosslinking Chitosan-Glutaraldehyde Interaction in a Homogeneous System. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 119–128.
- (79) Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. Controlling Cell Adhesion and Degradation of Chitosan Films by N-Acetylation. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5872–5878.
- (80) Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution without Cross-Linking Agent. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 653–662.
- (81) Sionkowska, A.; Wisniewski, M.; Skopinska, J.; Kennedy, C. .; Wess, T. . The Photochemical Stability of Collagen–chitosan Blends. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2004**, *162* (2-3), 545–554.
- (82) Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Versali, M. F.; Rinaudo, M. Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (4), 746–751.

- (83) Santos, G. Propiedades Funcionales Básicas de Materiales Porosos Nanoestructurados de Quitosano, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., 2013, p 52.
- (84) Santos-López, G.; Argüelles-Monal, W.; Carvajal-Millan, E.; López-Franco, Y. L.; Recillas-Mota, M. T.; Lizardi-Mendoza, J. Aerogels from Chitosan Solutions in Ionic Liquids. *Polymers (Basel)*. **2017**, *9* (12), 1–13.
- (85) Robitzer, M.; David, L.; Rochas, C.; Di Renzo, F.; Quignard, F. Supercritically-Dried Alginate Aerogels Retain the Fibrillar Structure of the Hydrogels. *Macromol. Symp.* **2008**, *273* (1), 80–84.
- (86) Porstmann, B.; Jung, K.; Schmechta, H.; Evers, U.; Pergande, M.; Porstmann, T.; Kramm, H.-J.; Krause, H. Measurement of Lysozyme in Human Body Fluids: Comparison of Various Enzyme Immunoassay Techniques and Their Diagnostic Application. *Clin. Biochem.* **1989**, *22* (5), 349–355.
- (87) Brouwer, J.; van Leeuwen-Herberts, T.; de Ruit, M. O. Determination of Lysozyme in Serum, Urine, Cerebrospinal Fluid and Feces by Enzyme Immunoassay. *Clin. Chim. Acta* **1984**, *142* (1), 21–30.
- (88) Tetsuya Masuda; Yuki Ueno, A.; Kitabatake*, N. Sweetness and Enzymatic Activity of Lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4937–4941.
- (89) *ISO 10993 Standard Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. Part 12: Sample Preparation and Reference Materials (International Standardization Organization)*; 2009.
- (90) Lin, W.-C.; Lien, C.-C.; Yen, H.-J.; Yu, C.-M.; Hsu, S. hu. Bacterial Cellulose and Bacterial Cellulose–chitosan Membranes for Wound Dressing Applications. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94* (1), 603–611.
- (91) Zhang, X.; Yang, D.; Nie, J. Chitosan/polyethylene Glycol Diacrylate Films as Potential Wound Dressing Material. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43* (5), 456–462.
- (92) Costa, C. N.; Teixeira, V. G.; Delpech, M. C.; Souza, J. V. S.; Costa, M. A. S. Viscometric Study of Chitosan Solutions in Acetic Acid/sodium Acetate and Acetic Acid/sodium Chloride. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *133*, 245–250.
- (93) Kuo, Y.-C.; Lin, C.-Y. Effect of Genipin-Crosslinked Chitin-Chitosan Scaffolds with Hydroxyapatite Modifications on the Cultivation of Bovine Knee Chondrocytes. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95* (1), 132–144.

- (94) Seda Tiğli, R.; Karakeçili, A.; Gumusderelioglu, M. In Vitro Characterization of Chitosan Scaffolds: Influence of Composition and Deacetylation Degree. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1665–1674.
- (95) Quignard, F.; Valentin, R.; Di Renzo, F. Aerogel Materials from Marine Polysaccharides. *New J. Chem.* **2008**, *32* (8), 1300.
- (96) Kuo, Y.-C.; Lin, C.-Y. Effect of Genipin-Crosslinked Chitin-Chitosan Scaffolds with Hydroxyapatite Modifications on the Cultivation of Bovine Knee Chondrocytes. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95* (1), 132–144.
- (97) Reves, B. T.; Bumgardner, J. D.; Cole, J. A.; Yang, Y.; Haggard, W. O. Lyophilization to Improve Drug Delivery for Chitosan-Calcium Phosphate Bone Scaffold Construct: A Preliminary Investigation. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **2009**, *90* (1), 1–10.
- (98) Maretti, E.; Rustichelli, C.; Romagnoli, M.; Balducci, A. G.; Buttini, F.; Sacchetti, F.; Leo, E.; Iannuccelli, V. Solid Lipid Nanoparticle Assemblies (SLNas) for an Anti-TB Inhalation Treatment-A Design of Experiments Approach to Investigate the Influence of Pre-Freezing Conditions on the Powder Respirability. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511* (1), 669–679.
- (99) Sing, K. S. W.; Everett, D. H.; Haul, R. a. W.; Moscou, L.; Pierotti, R. S.; Rouquerol, J.; Siemieniewska, T. Reporting Physisorption Data for Gas/solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57* (4), 603–619.
- (100) Monson, P. a. Understanding Adsorption/desorption Hysteresis for Fluids in Mesoporous Materials Using Simple Molecular Models and Classical Density Functional Theory. *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *160*, 47–66.
- (101) Alothman, Z. a. A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Materials (Basel)*. **2012**, *5*, 2874–2902.
- (102) Malheiro, V. N.; Caridade, S. G.; Alves, N. M.; Mano, J. F. New Poly(ϵ -Caprolactone)/chitosan Blend Fibers for Tissue Engineering Applications. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 418–428.
- (103) Thein-Han, W. W.; Misra, R. D. K. Biomimetic Chitosan-Nanohydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2009**, *5* (4), 1182–1197.
- (104) Bolaina-Lorenzo, E.; Martinez-Ramos, C.; Monleón-Pradas, M.; Herrera-Kao, W.; Cauich-Rodriguez, J. V.; Cervantes-Uc, J. M. Electrospun Polycaprolactone/chitosan Scaffolds for Nerve Tissue Engineering:

Physicochemical Characterization and Schwann Cell Biocompatibility.
Biomed. Mater. **2017**, *12*.

- (105) Monteiro, O. A. C.; Airoidi, C. Some Thermodynamic Data on Copper–Chitin and Copper–Chitosan Biopolymer Interactions. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *212* (2), 212–219.
- (106) Beppu, M. M.; Vieira, R. S.; Aimoli, C. G.; Santana, C. C. Crosslinking of Chitosan Membranes Using Glutaraldehyde: Effect on Ion Permeability and Water Absorption. *J. Memb. Sci.* **2007**, *301*, 126–130.
- (107) Hoffmann, B.; Seitz, D.; Mencke, a.; Kokott, a.; Ziegler, G. Glutaraldehyde and Oxidised Dextran as Crosslinker Reagents for Chitosan-Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20*, 1495–1503.
- (108) Wang, X. H.; Li, D. P.; Wang, W. J.; Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Xu, Y. X.; Song, X. H.; van der Werf, M. Crosslinked Collagen/chitosan Matrix for Artificial Livers. *Biomaterials* **2003**, *24* (19), 3213–3220.
- (109) Yusuke Arima, H. I. Effect of Wettability and Surface Functional Groups on Protein Adsorption and Cell Adhesion Using Well-Defined Mixed Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* **2007**, *28* (20), 3074–3082.
- (110) Tomihata, K.; Ikada, Y. In Vitro and in Vivo Degradation of Films of Chitin and Its Deacetylated Derivatives. *Biomaterials* **1997**, *18* (7), 567–575.
- (111) Huang, Y.; Onyeri, S.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, S. V. In Vitro Characterization of Chitosan-Gelatin Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7616–7627.
- (112) Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. Controlling Cell Adhesion and Degradation of Chitosan Films by N-Acetylation. *Biomaterials* **2005**, *26* (29), 5872–5878.
- (113) Liu, X.; Rodeheaver, D. P.; White, J. C.; Wright, A. M.; Walker, L. M.; Zhang, F.; Shannon, S. A Comparison of in Vitro Cytotoxicity Assays in Medical Device Regulatory Studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *97*, 24–32.
- (114) Chiono, V.; Pulieri, E.; Vozzi, G.; Ciardelli, G.; Ahluwalia, A.; Giusti, P. Genipin-Crosslinked Chitosan/gelatin Blends for Biomedical Applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19* (2), 889–898.
- (115) Zhao, Q. S.; Ji, Q. X.; Xing, K.; Li, X. Y.; Liu, C. S.; Chen, X. G. Preparation and Characteristics of Novel Porous Hydrogel Films Based on Chitosan and Glycerophosphate. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76* (3), 410–416.

- (116) Yang, X.; Yang, K.; Wu, S.; Chen, X.; Yu, F.; Li, J.; Ma, M.; Zhu, Z. Cytotoxicity and Wound Healing Properties of PVA/ws-Chitosan/glycerol Hydrogels Made by Irradiation Followed by Freeze–thawing. *Radiat. Phys. Chem.* **2010**, 79 (5), 606–611.
- (117) Parenteau-Bareil, R.; Gauvin, R.; Cliche, S.; Gariépy, C.; Germain, L.; Berthod, F. Comparative Study of Bovine, Porcine and Avian Collagens for the Production of a Tissue Engineered Dermis. *Acta Biomater.* **2011**, 7 (10), 3757–3765.