



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE DERIVADOS DE QUITOSANO PARA ELABORACIÓN DE HIDROGELES

Autor: **Miguel Rey Marfil**

Villaviciosa de Odón, *Julio 2022*

Título del Trabajo: Síntesis, caracterización y análisis de biocompatibilidad de derivados de quitosano para elaboración de hidrogeles

Este trabajo ha sido realizado en: **El Instituto Madrileño De Estudios Avanzados (IMDEA) en Materiales, reconocido como Unidad de Excelencia María de Maeztu. Calle Eric Kandel, 2, 28906 Getafe, Madrid. Grupo de Biomateriales y Medicina Regenerativa.**



EXCELENCIA
MARÍA
DE MAEZTU

Tutores:

Jennifer Patterson (IMDEA materiales)

Sonia Moreno Pérez (Universidad Europea de Madrid)

Índice de contenidos

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Preparación de soluciones stock de quitosano	6
Síntesis del hidrogel derivado de GPTMS	6
Síntesis del hidrogel derivado de p-BQ.....	6
Síntesis del hidrogel derivado de genipín	7
Preparación de las muestras para FTIR.....	8
Evaluación de la microestructura por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	8
Pruebas de solubilidad y gelificación del derivado de p-BQ	9
Estudio de citotoxicidad.....	9
Estudio de adhesión celular.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
Resultados de la síntesis.....	11
Resultados de espectroscopía infrarroja (FTIR).....	15
Resultados de la evaluación de la microestructura por SEM	18
Resultados del estudio de citotoxicidad	21
Resultados del estudio de adhesión.....	23
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27
ANEXO I	34
ANEXO II.....	35
ANEXO III.....	36

Índice de figuras

Figura 1. Clasificaciones más habituales de hidrogeles y tipos de los mismos	3
Figura 2. Hidrogeles de quitosano-GPTMS en placa multipocillo y detalle ampliado.....	6
Figura 3. Producto final del hidrogel derivado de p-BQ.....	7
Figura 4. Hidrogeles de quitosano-genipín en placa multipocillo.....	8
Figura 5. Soporte para portamuestras SEM. Comparativa visual	9
Figura 6. Esquema de síntesis del derivado quitosano-GPTMS	13
Figura 7. Esquema de síntesis del derivado p-Benzoquinona diimina-quitosano.....	14
Figura 8. Esquema de síntesis del derivado genipín-quitosano.....	15
Figura 9. Fotografía comparativa de hidrogeles entrecruzados con genipín a distintos tiempos de gelación	15
Figura 10. Espectro de infrarrojo medio de polvo de quitosano de exoesqueleto de gambas desacetilado al 75%	16
Figura 11. Espectro de infrarrojo medio de las membranas de quitosano-GPTMS a ambas concentraciones de fabricación	17
Figura 12. Espectro de infrarrojo medio de las membranas de quitosano-pBQ a la única concentración de fabricación.....	18
Figura 13. Espectro de infrarrojo medio de las membranas de quitosano-genipín a ambas concentraciones de fabricación	19
Figura 14. Micrografías SEM para muestras de quitosano puro.....	20
Figura 15. Micrografías SEM de quitosano modificado con GPTMS y genipín.....	21
Figura 16. Resultados del test de viabilidad para los test directos e indirectos.....	23
Figura 17. Resultados del test viabilidad para las células sembradas sobre los distintos hidrogeles	25
Figura 18. Micrografías SEM del ensayo de adhesión.....	25

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución esquemática de la placa multipocillo empleada para los test de contacto directo e indirecto.....	10
Tabla 2. Resultados de la prueba ANOVA de 1 factor para los test de contacto	23
Tabla 3. Resultados de la prueba ANOVA de 1 factor para el ensayo de adhesión.....	23
Tabla 4. Resultados del análisis post-hoc de Bonferroni para los grupos del ensayo de adhesión	24
Tabla S1. Recopilación de ecuaciones para el cálculo de reactivos.....	34
Tabla S2. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los test directo e indirecto.....	36
Tabla S3. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el ensayo de adhesión.....	36

RESUMEN

La fabricación de hidrogeles está comprendida dentro de la medicina regenerativa con el objeto de crear nuevos productos sanitarios aptos para ingeniería de tejidos e investigación biomédica. Son estas aplicaciones las que han condicionado la búsqueda de matrices de alta biocompatibilidad. Para garantizar un producto sostenible, se están estudiando polímeros de origen natural, entre ellos destaca el quitosano por su ausencia citotóxica, buena solubilidad en medio acuoso y fácil entrecruzamiento con distintos agentes químicos. En este trabajo, se ha llevado a cabo la síntesis química de derivados del mismo mediante su entrecruzamiento con dietoxi(3-glicidiloxipropil)metilsilano (GPTMS), 1,4-benzoquinona o *para*-benzoquinona (p-BQ) y genipín siendo exitosa para GPTMS y genipín, pero no para p-BQ por un proceso de *downstream* demasiado agresivo. Dichos derivados han sido caracterizados mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y solo los modificados con GPTMS y genipín por microscopía electrónica de barrido (SEM) y posterior evaluación de citotoxicidad y adhesión en un cultivo de fibroblastos de ratón L929 (ATCC CCL-1). Los estudios celulares constataron de acuerdo a la literatura la biocompatibilidad de ambos materiales a distintas concentraciones (viabilidad >80% en todos los casos) sin encontrar diferencias significativas ($p > 0,05$). No obstante, el derivado de GPTMS presentó una mejor adhesión celular que el de genipín ($p < 0,001$) lo que inclina el empleo de uno u otro de acuerdo a alcanzar una densidad celular específica. Esto es de especial interés a la hora de elaborar matrices implantables. Estos descubrimientos, junto a la mejora en su proceso de obtención, pueden dar lugar a un material biosostenible de aplicaciones biomédicas.

ABSTRACT

Hydrogel fabrication is comprehended inside Regenerative Medicine with a view to create new Medical Devices apt for Tissue Engineering or other products for Biomedical research. These applications have conditioned the search for high-biocompatibility matrixes. To guarantee a sustainable product, natural-derived polymers are being studied. Among them, chitosan outstands for its lack of cytotoxicity, good solubility in aqueous media and easy cross-linking with diverse chemical compounds. In this work, chemical synthesis of chitosan derivatives has been carried out by its crosslink with Diethoxy(3-glycidyloxypropyl)methylsilane (GPTMS), 1,4-benzoquinone or *para*-benzoquinone (p-BQ) and genipin succeeding for GPTMS and genipin, but not for p-BQ due to aggressive downstream conditions. Such derivatives have been characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and only the ones of GPTMS and genipin by Scanning Electron Microscopy (SEM) and later cytotoxicity and adhesion evaluation by mouse fibroblast L929 (ATCC CCL-1) culture. Cellular studies corroborated both material's biocompatibility enacted by literature at different concentrations (viability >80% in all cases) without significant differences ($p > 0,05$). However, GPTMS-derivative presented better cell adhesion than genipin's ($p < 0,001$) which inclines one or other's usage according to reaching a specific cell density. This is of special interest at times of developing implantable matrixes. These findings, alongside obtention procedure improvement can yield a sustainable material for biomedical applications.

INTRODUCCIÓN

La definición clásica de hidrogel es la de un entramado polimérico afín al solvente con la capacidad de acumular agua en su estructura hinchándose en el proceso [1]. Esta propiedad característica ha sido el motivo de su uso en distintos ámbitos.

En el campo de la biomedicina se han planteado para el transporte de moléculas de interés (fármacos, genes o ARNi) o *drug delivery* sirviendo de vectores no virales, lo que ha dado pie a la concepción de nuevas vacunas basadas en ADN encapsulado [2], potenciadores de la respuesta inmune frente a infecciones crónicas como la causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [3], secreción de agentes terapéuticos para el tratamiento tumores sólidos [4] y en la creación de modelos reconstructivos de tumores para fines diagnósticos por la buena reproducción de la matriz extracelular (MEC) tumoral [5]. Han probado ser una herramienta útil en la ingeniería de tejidos por su labor en regeneración de lesiones epidérmicas [6], cartilaginosas, óseas [7] y de músculo liso mediante administración *in situ*, actuando como un agente aglutinante y de relleno, capaz de ir liberando moléculas retenidas en su seno que promueven procesos de reparación como cicatrización o angiogénesis [8]. Su macroestructura consiste en una matriz porosa o lisa (dependiendo del material, método de síntesis y finalidad) que actúa a modo de soporte o *scaffold*. El recurso a incorporar en esta matriz ha sido motivo de cambio a lo largo del tiempo. En la década de los ochenta comenzó y predominó la inclusión de células madre de alta proliferación que pudieran regenerar el tejido dañado [9], no obstante, a partir del 2000 y con el crecimiento de la industria farmacéutica y biotecnológica, comenzó la búsqueda de nuevas formulaciones con moléculas bioactivas (nutrientes y factores de crecimiento) que ofrecieran una alternativa al auto y alotrasplante [10].

El principal problema de este campo es lo invasivo que puede resultar el tratamiento según la ubicación del órgano o tejido a tratar; para limitarlo, se están estudiando nuevas vías de administración para que los hidrogeles mantengan su actividad terapéutica a pesar de no encontrarse cerca del área de la lesión [11].

En investigación básica los usos más frecuentes de estos geles son el cultivo bacteriano y electroforesis en distintos soportes. Los polímeros más empleados son la agarosa y la acrilamida ya que son fáciles de entrecruzar, preparar y ofrecen un tiempo de gelificación breve [12]. Los geles de agarosa o agar poseen una alta citocompatibilidad por lo que la adición de nutrientes los convierte en medios aptos para cultivos celulares y la capacidad de los monómeros de su matriz de formar microporos los posiciona como materiales aptos para la separación de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas principalmente) por tamaño. Se trata de una característica que comparte con los geles de poliacrilamida, aunque estos poseen un mayor poder resolutivo al formar microporos más pequeños, y en segunda instancia no son válidos para cultivos celulares por su actividad carcinogénica y proapoptótica [13].

La remediación del medio ambiente es otro campo predominante de las aplicaciones de los hidrogeles, siendo mayormente empleados como medios filtrantes para la potabilización *de novo* de agua o en el tratamiento de aguas residuales. Sobre ello, Van Tran *et al.* (2018) [14] concluyeron que las morfologías más habituales de uso en

biorremediación eran esferas, películas y resinas y que los principales contaminantes de mayor toxicidad que eran capaces de retener eran metales pesados (Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , entre otros), tintes industriales halogenados como el cristal violeta y radionúclidos como el ^{60}Co o el ^{137}Cs .

Existen distintas formas de clasificar los hidrogeles. Según Thakur, Thakur y Arotiba (2018) [1] las catalogaciones más extendidas son según su origen, composición, carga iónica, estructura física y entrecruzamiento. La **Figura 1** ilustra estas clasificaciones e indica los tipos más habituales de hidrogel para cada una.



Figura 1. Clasificaciones más habituales de hidrogeles y tipos de los mismos. Adaptado de Thakur, Thakur y Arotiba (2018) [1]

La pertenencia a un grupo u otro de un hidrogel está condicionada por su aplicación final. Idealmente, los hidrogeles destinados al tratamiento de lesiones por implante deberían presentar una alta biocompatibilidad, degradación lenta (de semanas a meses) y un método de fabricación sencillo y poco costoso [15]. Sin embargo, ningún hidrogel presenta tal conglomerado de propiedades y es por eso por lo que se recurre a mezclas de ellos [16] o a la modificación de composiciones ya existentes [17] para conseguir propiedades a la carta. Ligado a todo ello, resulta de especial interés y ha sido objeto de investigación el hallar una fuente sostenible para la obtención de las materias primas de fabricación [18], por lo que los hidrogeles más investigados han sido aquellos de origen natural (quitosano, alginato, agarosa, etc.).

Buscando un material que satisfaga los criterios anteriores y que pueda usarse como soporte celular en ingeniería de tejidos o base biocompatible de cremas o lociones tópicas de regeneración celular en medicina regenerativa, en este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis química de derivados del quitosano para hallar un nuevo polímero que presente distintas propiedades al original.

El quitosano es un polisacárido estructural de glucosamina de enlaces $\beta(1-4)$ lineal sin ramificaciones. Procede de la desacetilación de la quitina, un polímero de N-acetilglucosamina de idéntica estructura presente en el exoesqueleto de muchos artrópodos (cangrejos, langostas, gambas), insectos y hongos [19] cuya biosíntesis natural se debe a las enzimas de la familia quitina sintasa, presente en estos animales [20]. Se trata de un polímero natural, biocompatible, biodegradable, con propiedades antimicrobianas [21], apto para aplicaciones biomédicas como ingeniería de tejidos o *drug delivery*.

El método de obtención de quitosano más empleado consiste en la desacetilación de quitina natural de artrópodos. Dicha modificación puede obtenerse por dos métodos distintos: químico y enzimático.

En el método químico, las conchas de artrópodos se someten a un tratamiento ácido de desmineralización con ácido clorhídrico (HCl) de 1-24 horas, un lavado en agua destilada (dH₂O) hasta alcanzar la neutralidad y un fuerte paso alcalino con hidróxido de sodio (NaOH) al 40% a 120°C durante 1-3 horas para la desproteización del polímero y su desacetilación [19]. Con este método el grado de desacetilación, abreviado comúnmente como DD (*deacetylation degree*) oscila entre el 70 y 90% [22]. A pesar de ser el proceso industrial estandarizado porque es el que ofrece el mejor rendimiento, el tratamiento con ácidos y bases fuertes hidroliza los enlaces O-glucosídicos y causan fragmentación interna en las cadenas, lo que supone un descenso en la masa molecular del compuesto, además el desecho de elevados volúmenes de bases fuertes puede suponer un problema medioambiental [22].

En el método enzimático, el micelio fúngico un amplio abanico de especies es fermentado en biorreactores en presencia de proteasas y quitina deacetilasas (CDAs) provenientes de hongos y bacterias como *Mucor rouxii* [23], *Colletotrichum lindemuthianum* [24] o *Streptomyces kurssanovii* [25]. En contraposición a ser un método sostenible, ofrece un rendimiento más bajo que el método químico de producción (un DD entre 60-80%) y unos costes de producción más altos [22].

El principal parámetro afectado por el método de obtención es el DD ya que de él dependerán otras características químicas del material como su solubilidad, punto de ebullición, velocidad de degradación u oxidación. Cobra especial importancia la primera ya que la solubilidad del quitosano en medios acuosos es esencial para asegurar la biocompatibilidad del material. Generalmente, se considera quitosano aquella quitina cuyo grado de desacetilación es igual o superior a la mitad del material total (DD \geq 50%) [26].

Este trabajo pues, trata de sintetizar derivados del quitosano mediante modificación química de la estructura del polímero con agentes entrecruzantes que le aporten al material nuevas propiedades o refuercen las ya existentes para su uso en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Para ello se ha entrecruzado el compuesto con GPTMS, p-BQ y genipín.

- **GPTMS**: Se trata de un epóxido unido a un grupo siloxano. Se supuso que la adición de un grupo funcional con silicio en su composición supondría un cambio en la elasticidad, viscosidad y adherencia del material. Bajo la premisa de obtener

un material de consistencia similar al de una silicona y con resultados positivos de citocompatibilidad [27], se aprobó este reactivo para su uso.

- p-BQ: También llamado *para*-benzoquinona. Se trata de un grupo areno con dos carbonilos unidos en posición *para*. Posee interesantes propiedades de óxido-reducción al ser capaz de captar hidrogeniones (H^+) por las cetonas de su estructura, estabilizar la carga por resonancia y cederlos de nuevo al medio. No se ha encontrado literatura específica de su uso como agente entrecruzante de quitosano, no obstante, la suposición inicial barajó que su reactividad sería similar a la de algunos dialdehídos [28] como el glutaraldehído o glioxal, por este carácter novedoso del posible producto se aprobó el reactivo para su utilización.
- Genipín: Es un compuesto aislado de *Gardenia Jasminoides* [29]. Químicamente es la fracción no glucídica o aglicona del alcaloide genipósido. Se trata de una molécula entrecruzante de grupos amino apta para su empleo con cualquier estructura aminoacídica o de quitosano. Por contraparte, presenta una baja citotoxicidad necesaria a tener en cuenta antes de postular su uso para aplicaciones biomédicas. A pesar de ello, es un agente entrecruzante ampliamente extendido para la gelificación de quitosano y documentado. La cantidad de información al respecto en la literatura sirvió como motivo para aprobar su uso.

Estos procesos de modificación son acoplables a la obtención industrial del polímero, por lo que es posible producir hidrogeles con distinto DD acorde a su método de obtención (químico o enzimático) y aplicación.

OBJETIVOS

1. Síntesis de derivados modificados de quitosano por reacciones de entrecruzamiento.
2. Caracterización de la estructura de los hidrogeles sintetizados por FTIR y SEM.
3. Evaluación de citotoxicidad y adhesión de los materiales mediante ensayos celulares con fibroblastos de ratón L929.
4. Realización de un balance de la sostenibilidad de los materiales obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A menos que se especifique lo contrario, todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Se emplearon los protocolos extraídos de Li, Weng, & Huang (2020) [30] para el derivado de GPTMS, Ding *et al* (2021) [31], para el derivado de p-BQ y Gao *et al* (2014) [32] para el derivado de genipín. Se hicieron modificaciones pertinentes en las concentraciones de los reactivos o elección de los solventes. En el **Anexo I** se presentan las fórmulas (**Tabla S1**) para la determinación de las cantidades de cada reactivo, así como la determinación de la masa molecular del quitosano empleado (**Ecuación S1**).

Preparación de soluciones stock de quitosano

Se realizaron dos diluciones del polímero distintas. Se disolvió 1,0 g de quitosano de exoesqueleto de gambas (DD $\geq 75\%$) en 100 mL de ácido acético 5% (v/v) obteniendo una concentración de 1% (m/v), la disolución se repitió con 2,0 g de quitosano en el mismo volumen de solvente consiguiendo una segunda solución al 2% (m/v). Para garantizar la máxima solubilidad del quitosano se dejaron ambas en agitación magnética a 700 rpm durante 12 horas a temperatura ambiente.

Síntesis del hidrogel derivado de GPTMS

Se realizaron dos reacciones paralelas de síntesis del derivado de GPTMS empleando las disoluciones stock al 1% y al 2% de quitosano anteriores. Cada una de ellas fue trasvasada a un matraz de reacción de dos cuellos y puesta en agitación a 600 rpm. Se administraron 972 μL y 1940 μL de GPTMS por goteo con una jeringuilla de 1 mL.

La reacción se dejó trascorrir durante 1 hora a 700 rpm a temperatura ambiente y después a 60°C durante 12 horas a la misma velocidad de agitación.

Una vez terminada la síntesis, se vertió el producto de reacción en una placa estéril de 6 pocillos (VWR®) a 3 pocillos por concentración. La placa se mantuvo a 40°C durante 72 horas (3 días) como proceso de curación, en el cual el gel adquiere su consistencia final, que generalmente es más sólida por eliminación de líquidos por evaporación, en este caso agua y ácido acético del disolvente. Pasado ese periodo se obtuvieron unas membranas de consistencia similar al plástico adheridas al fondo de los pocillos (**Figura 2A**). Para desmoldarlas se emplearon pinzas de acero inoxidable y se les recortaron los bordes con unas tijeras del mismo material (**2B**).

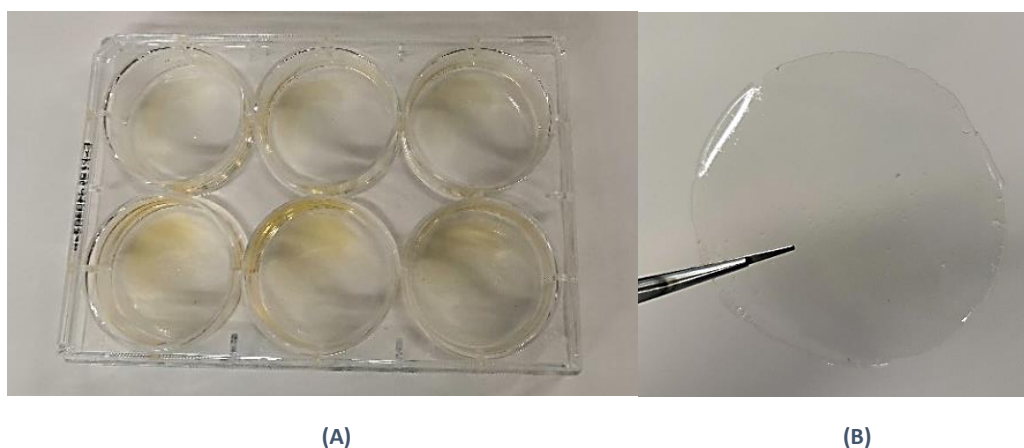


Figura 2. A Hidrogeles de quitosano-GPTMS en placa multipocillo. La fila de arriba se corresponde con una concentración de quitosano al 1% y la de abajo al 2%. B Detalle ampliado de un hidrogel de quitosano-GPTMS al 1% desmoldado y con los bordes ya recortados. Fuente propia.

Síntesis del hidrogel derivado de p-BQ

En vez de repetir las mismas disoluciones stock al 1 y 2% con el mismo volumen de 100 mL, se realizó una disolución preliminar al 1,43% añadiendo 1 g de quitosano en 70 mL de ácido acético 5% (v/v) y se trasvasó a un matraz de reacción de doble cuello al que se le añadió metanol en una proporción 2:1, donde el volumen de quitosano es el doble que el del alcohol. El fin de añadirlo es disminuir la viscosidad de la disolución y facilitar la

reacción de adición de la quinona. Paralelamente, se disolvieron 0,238 g de p-BQ en metanol durante 1 hora a 700 rpm a temperatura ambiente hasta alcanzar una concentración final de 1,19 % (m/v). La solución de p-BQ fue vertida por goteo sobre la de quitosano. Al terminar la mezcla se dejó la solución en agitación a 740 rpm a 60°C durante 12 horas. Tras ese plazo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se elevó a pH 9 por adición de NaOH 2M lo que provocó la aparición de un precipitado gelatinoso de coloración oscura. El producto de reacción fue lavado en 150 mL de etanol durante 3 horas, filtrado a vacío y resuspendido en el mismo volumen de etanol. Se realizaron 5 ciclos de lavado. Posteriormente, se dejó el producto de lavado en el horno calefactor a 60°C durante 12 horas. El producto final de secado es un polvo negro azabache (**Figura 3**).



Figura 3. Producto final del hidrogel derivado de p-BQ tras los lavados en etanol y su secado a 60°C. Fuente propia.

Síntesis del hidrogel derivado de genipín

Se repitieron las mismas disoluciones de quitosano al 1% y 2% y se trasvasaron 10 mL a un matraz de polietileno. El matraz se puso en agitación a 700 rpm a temperatura ambiente. Se pesaron y adicionaron 10 mg de genipín (*Challenge Bioproducts Co. Ltd.*) para conseguir una concentración de 0,1% (m/v) para ambas concentraciones de quitosano. Se dejaron ambos matraces en agitación durante 2 horas y después se trasladaron a una placa multipocillo de 12 pocillos (**Figura 4A**) donde la reacción de entrecruzamiento trascurrió durante 48 horas (2 días). Trascurrido ese tiempo, se desmoldaron los geles con unas pinzas de acero inoxidable y se cortaron en láminas de 2 mm de grosor (**Figura 4B**).

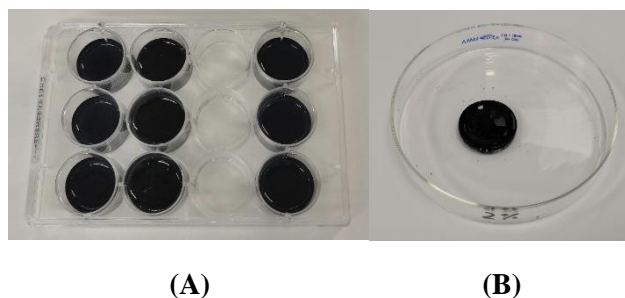


Figura 4. A Hidrogeles de quitosano-genipín en placa multipocillo. La columna de la izquierda se corresponde con una concentración de 1% de quitosano, la del centro-izquierda con quitosano al 2% y la de la derecha de nuevo al 1%. Todas ellas contienen genipín al 0,1%. B Fotografía de un hidrogel al 2% cortado con un grosor de 2 mm. Fuente propia.

Preparación de las muestras para FTIR

El equipo empleado fue un Nicolet iS50 FT-IR (*Thermo Fisher*) donde los parámetros de ajuste empleados para todos los geles fueron: 64 escaneos de muestra, resolución de 4 cm^{-1} y la frecuencia del láser de 15798 cm^{-1} . Se realizó un escaneo de infrarrojo medio de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . Los espectros se obtuvieron y corrigieron con el software OMNIC (*Thermo Fisher*) y graficados con Origin2021 (*OriginLab*[®]).

Para la caracterización del gel derivado de GPTMS se despegaron dos membranas preparadas con las distintas concentraciones de quitosano y se mantuvieron en el horno calefactor a 40°C durante 48 horas (2 días). Se lavaron en NaOH 0,1 M durante 10 minutos para neutralizarlas y se sumergieron en nitrógeno líquido 3 minutos. Después se liofilizaron en un equipo FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dryers (*Labconco*) durante 24 horas a -50°C y 0,05 mbar. Por último, se analizó cada membrana por Reflectancia Total Atenuada (ATR, en inglés).

El proceso para el hidrogel derivado de p-BQ fue directo. Se pudo emplear el polvo que quedó como producto de secado, para ello se hizo un pretratamiento de deshidratación a 100°C durante 72 horas en un horno calefactor. Posteriormente se analizó el polvo final por ATR.

Para caracterizar el gel derivado de genipín se sumergieron los geles en nitrógeno líquido 3 minutos y se liofilizaron con el mismo equipo y condiciones de operación durante 24 horas. Finalmente, se analizaron ambas membranas por ATR.

Para obtener un espectro base de referencia, se caracterizó por ATR el reactivo de quitosano de exoesqueleto de gambas (DD $\geq 75\%$) puro sin pretratar.

Evaluación de la microestructura por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la caracterización por microscopía de barrido (SEM, en inglés) se empleó un equipo Apreo 2 SEM (*Thermo Fisher*) con un voltaje de 2 kV, una corriente de 13 pA y un detector Everhart-Thornley (ETD).

En el tratamiento del hidrogel derivado de GPTMS para SEM se repitió la síntesis con el protocolo indicado y el producto de reacción se depositó en una placa de 12 pocillos, correspondiendo 6 a cada concentración (1 y 2%). La placa se dejó secar en un horno calefactor a 40°C durante 72 horas hasta obtener unas membranas desmoldables. Se tomaron 2 en total, una de quitosano al 1% y otra al 2% y se sumergieron en nitrógeno líquido 2 minutos hasta que se perdiera la elasticidad. A continuación, se llevaron a liofilizar con las mismas condiciones que para el análisis por FTIR para extraer la humedad remanente. Se repitió esta operación para el gel derivado de genipín.

Las muestras se cortaron de tal forma que se obtuvieran 2 láminas de cada concentración (1 y 2%) para cada tipo de gel (derivado del GPTMS y del genipín) y se pudieran observar la superficie formal del material y la de corte. Las muestras se dispusieron encima de una cinta conductora de carbono en los portaobjetos de aluminio SEM (**Figura 5**). Por último y como pretratamiento, se sometieron a una etapa de recubrimiento o *sputter coating* en un equipo Q150T ES (*Quorum*). Se realizó un recubrimiento de 5 nm con oro (Au) durante 2 minutos a una corriente de 25 mA.

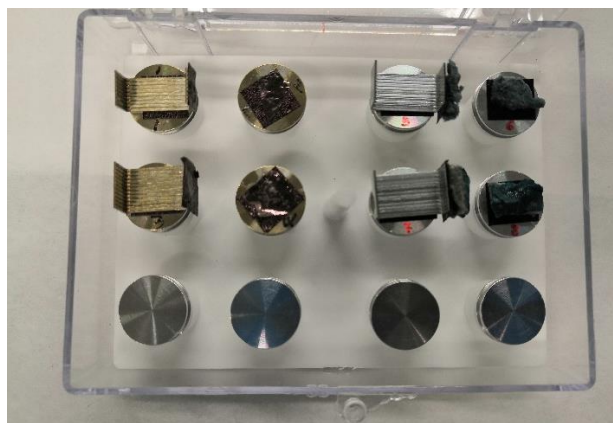


Figura 5. Soporte para portamuestras SEM. Comparativa visual de muestras recubiertas 1-4 con muestras por recubrir 5-8. Distribución: Muestra 1. Corte lateral de gel quitosano-GPTMS para quitosano al 1%, Muestra 2. Corte de superficie de gel quitosano-GPTMS para quitosano al 1%, Muestra 3. Corte lateral de gel quitosano-GPTMS para quitosano al 2%, Muestra 4. Corte de superficie de gel quitosano-GPTMS para quitosano al 2%, Muestras 5-8 sin recubrir siguen el mismo patrón con el gel de genipín. Fuente propia.

Este último paso es necesario ya que el quitosano al no ser un material conductor acumularía los electrones empleados para su visualización sobre su superficie cargando, degradándose y generando áreas de blanqueamiento por la carga acumulada que impedirían la visualización de la superficie afectada.

Pruebas de solubilidad y gelificación del derivado de p-BQ

Se realizaron las siguientes soluciones con el polvo negro producto de reacción p-BQ:

- 10 mg de polvo p-BQ en 100 μ L de dH₂O .
- 100 mg de polvo p-BQ en 10 mL de dH₂O.
- 25 mg de polvo p-BQ en ácido acético al 5%.

Todas ellas se mantuvieron en agitación a 700 rpm durante 12 horas. Solo la segunda solución pudo disolverse por lo que se empleó dH₂O como solvente para los estudios de gelificación.

Para estudiar la gelificación se empleó genipín como agente entrecruzante a las siguientes concentraciones:

- A una disolución de p-BQ al 1% (m/v) se le añadió 1 mg de genipín para alcanzar una concentración de 1% respecto a la masa de p-BQ (m genipín/m p-BQ).
- A una disolución de p-BQ al 1% (m/v) se le añadieron 100 mg de genipín alcanzando una concentración de 1% respecto al volumen total de disolución (m genipín/v total de disolución).

Ambas soluciones se mantuvieron 12 horas en agitación a 700 rpm.

Estudio de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad de los geles se efectuó siguiendo la norma ISO 10993-5:2001 [33], para su testado en dispositivos médicos. Se dividieron los ensayos en dos tipos: test de contacto directo e indirecto. En un primer paso, se repitió la síntesis de los materiales entrecruzados con GPTMS y genipín a ambas concentraciones de quitosano y se cortaron en discos de 8x2 mm. Los discos se esterilizaron en etanol al 70% haciendo 2

lavados de 20 minutos y después se acondicionaron en tampón PBS destilado (dPBS) 2 veces durante 10 minutos. Se prepararon extractos de cada gel incubándolos con dPBS durante 24 horas a 37°C y recolectando el sobrenadante, estos conformarían las muestras para el test de contacto indirecto. Los materiales incubados fueron preservados para incluirse en los test de contacto directo como muestras posextracción, mientras que un segundo set los mismos materiales no incubados como preextracción.

Se cultivaron fibroblastos de ratón L929 (*Thermo Fisher*) en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco*) suplementado al 10% con FBS (*Fetal Bovine Serum, Gibco*), penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100µg/mL. El cultivo se mantuvo a 37°C con CO₂ al 5% en atmósfera húmeda. Cuando las células llegaron al 80% de confluencia se despegaron con una solución de tripsina al 0,25% (*Thermo Fisher*) y EDTA 1 mM y se sembraron en una placa de 48 pocillos a una densidad de 1,8 x 10⁴ células/pocillo, se volvieron a acondicionar con medio fresco y se cultivaron 24 horas a las mismas condiciones hasta la formación de una monocapa. El **Anexo II** presenta los cálculos pertinentes.

Se descartó el sobrenadante, se adicionaron los discos de gel pre y posextraídos encima de la capa de células y los extractos de cada gel con diluciones 1:2 y 1:4. Se preparó un control positivo para los test directos con DMEM suplementado y dPBS para los extractos, teniendo cada dilución su propio control. Se readicionó medio y se incubaron las muestras a las mismas condiciones. Todas las muestras se analizaron por triplicados. La distribución se detalla en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Distribución esquemática de la placa multipocillo empleada para los test realizados. Cada grupo fue realizado por triplicado. No se analizó el gel de quitosano1%-GPTMS (test directos e indirectos) por no disponer de más espacio en la placa. Elaboración propia.

TEST DIRECTOS							
Control +	Muestras preextracción				Muestras posextracción		
DMEM	Quitosano 1% - Genipín	Quitosano 2% - Genipín	Quitosano 2% - GPTMS	Quitosano 1% - GPTMS	Quitosano 1% - Genipín	Quitosano 2% - Genipín	Quitosano 2% - GPTMS
TEST INDIRECTOS							
Control -	Extractos al 50% (Dilución 1:2)			Control -	Extractos al 25% (Dilución 1:4)		
dPBS	Quitosano 1% - Genipín	Quitosano 2% - Genipín	Quitosano 2% - GPTMS	dPBS	Quitosano 1% - Genipín	Quitosano 2% - Genipín	Quitosano 2% - GPTMS

Los mismos geles y extractos se cultivaron en otra placa en paralelo sin células, por lo que servía como control negativo. Tras la incubación se retiró el medio y llevó a cabo un análisis de viabilidad con el reactivo PrestoBlue™ (*Invitrogen*) siguiendo el protocolo del fabricante. Después de 1 hora de incubación a 37°C se retiró el medio de cada pocillo y midió su fluorescencia en un lector de microplacas Infinite M Plex (*Tecan*) a 560 nm.

Estudio de adhesión celular

En una segunda placa de 48 pocillos se incubaron discos de quitosano-GPTMS y quitosano-genipín solo para la concentración de 2%, previamente esterilizados con el

mismo procedimiento. Los discos se depositaron en el fondo del pocillo y sobre ellos se sembraron los fibroblastos a la misma densidad que el estudio anterior ($1,8 \times 10^4$ células/pocillo). Tras 24 horas de incubación a las mismas condiciones que el anterior ensayo se llevó a cabo una evaluación de viabilidad con el reactivo PrestoBlue™ y se prepararon las muestras para SEM. Se empleó para esto el mismo protocolo descrito por Gibney, Patterson & Ferraris (2021) [34].

Las muestras fueron fijadas con formaldehído al 4% disuelto en dPBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces en dPBS durante 7 minutos y dos veces en dH₂O el mismo tiempo. Después, se deshidrataron sumergiéndolas en concentraciones crecientes de etanol disuelto en dH₂O (30%, 50%, 70%, 90% y 100% v/v) durante 10 minutos por concentración y dos veces en etanol al 100%. Para lograr una mayor desecación las muestras se sumergieron en concentraciones crecientes de hexametildisilazano (HMDS) disuelto en etanol (33%, 50%, 66% y 100% v/v) durante 15 minutos por concentración y dos veces en HMDS al 100%. Posteriormente, los discos fueron troceados con pinzas de acero inoxidable y se dejaron secar en papel de aluminio 12 horas. Las muestras secas se colocaron en portaobjetos SEM con cinta de carbono y se les dio un recubrimiento de 5 nm con Au a una corriente de 20 mA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de la síntesis

La reacción de entrecruzamiento de quitosano con GPTMS dio como resultado una serie de membranas transparentes flexibles con propiedades elásticas de un color amarillento notorio en aquellas que habían sido sintetizadas con una mayor concentración de quitosano. Estas características son similares a las de las membranas obtenidas en otros estudios empleando los mismos reactivos [35, 36]. El producto de reacción esperado habría sido un coloide de tipo gel, en el que la fase continua fueran las cadenas lineales de quitosano y la dispersa el agua y trazas de ácido acético del disolvente (si no hubieran llegado a eliminarse tras la neutralización). Según Liu, Su & Lai (2004) [36] la compactación de gel a membrana puede explicarse por la formación de grupos siloxano durante la reacción de entrecruzamiento, los cuales constituyen el esqueleto de las siliconas y le conceden al polímero unas propiedades físicas similares a las mismas.

Se puede dividir la síntesis (**Figura 6**) en tres reacciones consecutivas. La primera consiste en una reacción similar a una sustitución nucleofílica S_N1 en la que se produce la apertura del epóxido en medio ácido y su adición a la molécula formando un alcohol secundario [30]. La segunda reacción consiste en la hidrólisis ácida reversible del grupo siloxano a silanol lo que provoca la aparición de hidroxilos nucleófilos que pueden atacarse intermolecularmente hasta formar una red de siloxanos, siendo esta la tercera y última reacción de condensación o entrecruzamiento [30]. El máximo número de puentes Si-O-Si que puede establecer una molécula es 3, no obstante, Shirotsaki *et al.* (2009) [35] ya reportó en un mismo estudio que el número medio de estos enlaces es de 2,6 independientemente de la concentración de GPTMS. Para intentar justificarlo, Meyers (2001) [37] propone que la sustitución completa del grupo silanol se ve desfavorecida ya

que un mayor número de enlaces Si-O-Si reduce la basicidad de los oxígenos adyacentes a ambos átomos de silicio, lo que dificulta su protonación para la reacción de condensación. Este fenómeno explica que un pH menor durante la síntesis garantizará un mayor grado de entrecruzamiento y un material más similar a una silicona, esto es, mayor elasticidad y flexibilidad.

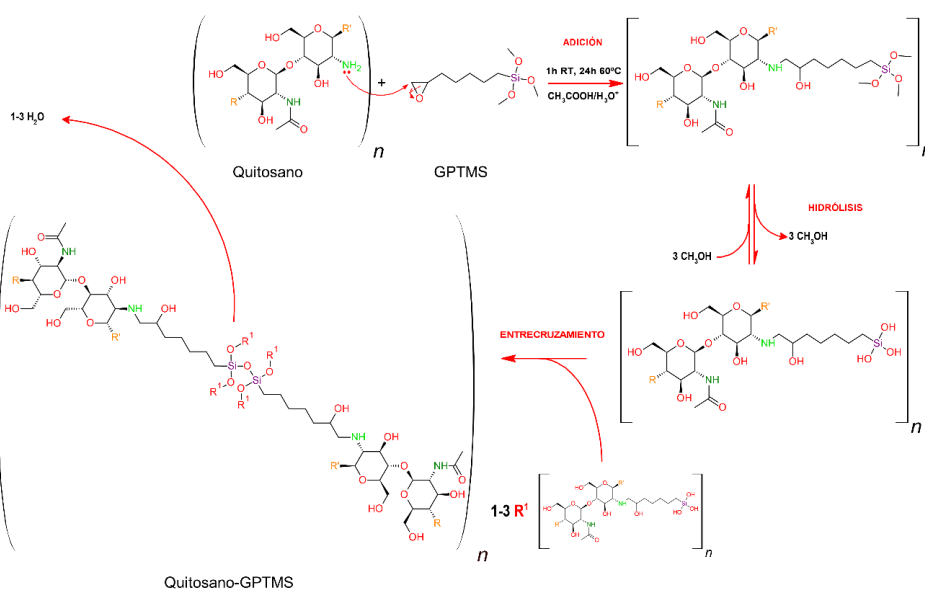


Figura 6. Esquema de síntesis del derivado quitosano-GPTMS. Se han denotado los intermedios de reacción entre corchetes cuadrados y los reactivos iniciales y productos finales entre paréntesis circulares en caso de tratarse de una unidad polimérica. Reacciones adaptadas de: Li, Weng & Huang [30] y Liu, Su & Lai [36].

La gelación del quitosano con p-benzoquinona es similar a la de otros agentes entrecruzantes dicarbonílicos como el glutaraldehído [38] o el glioxal [39]. Todos ellos tienen en común la condensación de sus dos aldehídos con las aminas primarias de los monómeros de quitosano formando iminas o bases de Schiff (Figura 6), sin embargo, también pueden condensarse con grupos hidroxilo y establecer el entrecruzamiento por la formación de enlaces hemiacetales o hemicetales. Para evitar reacciones con los grupos alcohol del quitosano se ha realizado la síntesis del derivado en medio ácido, que según recopilaciones de estudios previos [40, 41, 42] favorece la reactividad de la amina primaria sobre la de los alcoholes.

En el presente estudio, se consiguió un producto gelatinoso de color negro al lavar el producto de síntesis con NaOH 2M. La falta de literatura sobre el uso de la p-BQ como agente entrecruzante dificultó la confirmación de si este gel se trataba del producto esperado entrecruzado con una doble imina, ya que normalmente se emplean derivados monocarbonílicos del reactivo como grupo protector de aminas primarias [43, 35]. Tras la etapa de lavado el producto se fragmentó en sólidos menos viscosos y tras el tratamiento de secado solo quedó un polvo negro fino y homogéneo. Para recuperar la consistencia de un gel se quiso reacondicionar el material en un disolvente por lo que primero se llevó a cabo un estudio de solubilidad en el que se disolvió el producto en ácido acético 5% (v/v) y dH2O. Tras doce horas en agitación se determinó que el material solo era soluble en el segundo solvente, pero no gelificaba. Para forzar la formación de un sólido, se añadió genipín a dos concentraciones como segundo agente entrecruzante

con el objeto de que uniera cadenas con grupos amino libres. El resultado fue negativo y la disolución con el polvo del derivado de p-BQ se mantuvo líquida.

Por la imposibilidad de formar un gel con este material se discontinuó su uso ya que su estado como polvo no es apto para realizar el análisis celular ni SEM con él, no obstante, el producto sí fue válido para FTIR. Se atribuye la imposibilidad de volver a gelificar a las condiciones de los lavados con etanol que ocasionaron su fragmentación y un secado excesivo del material que aparte de eliminar todo el solvente, provocó rupturas en las cadenas de su estructura.

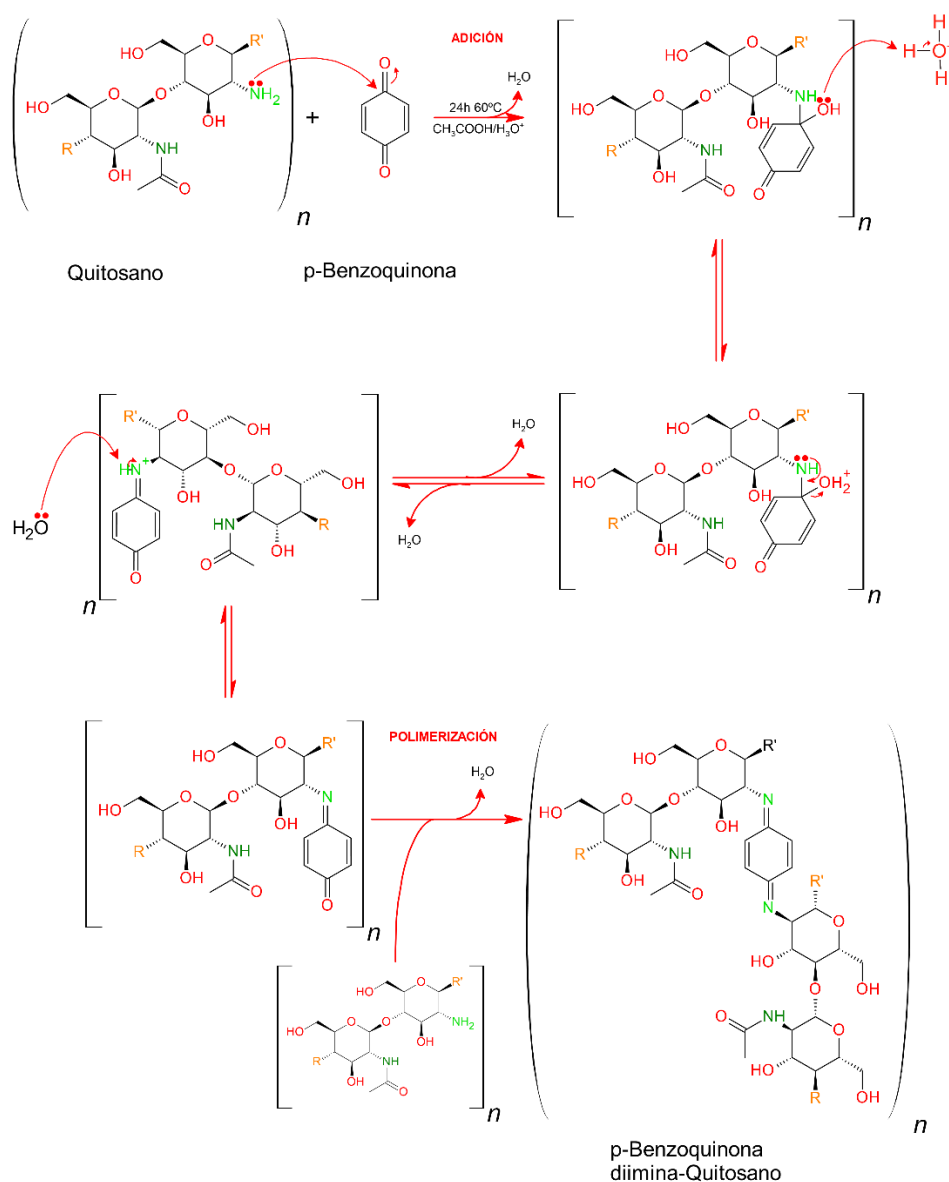


Figura 7. Esquema de síntesis del derivado p-Benzoquinona diimina-quitosano. Reacciones adaptadas de: Abid & Ramadan (2018) [44]

El entrecruzamiento con genipín dio como producto un gel de coloración azul con menos elasticidad que el derivado de GPTMS y que a diferencia de este, presentaba una estructura más voluminosa y menos flexible. El genipín es un agente entrecruzante que une al quitosano por el ataque nucleofílico del grupo amino del polímero al carbono 3 del genipín (Figura 8), lo que provoca su unión, la apertura del anillo de dihidropirano y la

formación de un intermediario aldehídico [45]. Este aldehído será atacado por la amina ahora secundaria del quitosano para formar un nuevo ciclo con una amina terciaria que unirá el genipín al polímero. Este producto puede dar lugar a dos formas de entrecruzamiento distintas [46]. La forma A, que consiste en una sustitución nucleófila SN_2 , en el que el éster del genipín es sustituido por la amina primaria del polímero formando una amida, y la forma B, catalizada por oxígeno que consiste en la unión de dos moléculas de genipín por oxidación de los anillos y formación de un puente conjugado entre moléculas.

Este segundo producto (B) otorga al material su característico color azul oscuro y es producido de manera simultánea al producto A, cuya síntesis es independiente de oxígeno. La conjugación del sistema y el gran número de orbitales π es lo que le dotan de una coloración azul [47]. El producto B y su catálisis dependiente de oxígeno explican el motivo por el que los geles entrecruzados con genipín se tiñeron de manera gradual de un color azul oscuro, y porqué la capa de hidrogel en contacto con el aire presentaba una coloración ligeramente superior al resto del volumen de los geles (Figura 9).

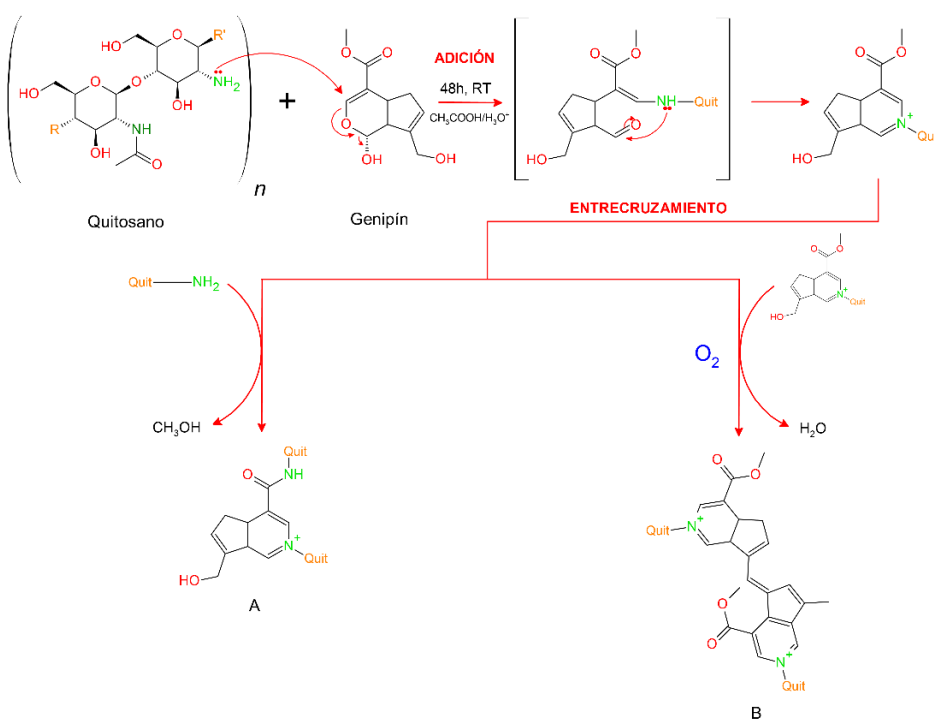


Figura 8. Esquema de síntesis del derivado genipín-quitosano. Reacciones adaptadas de: Butler, Ng & Pudney (2003) [45] y Dimida et al. (2015) [46]

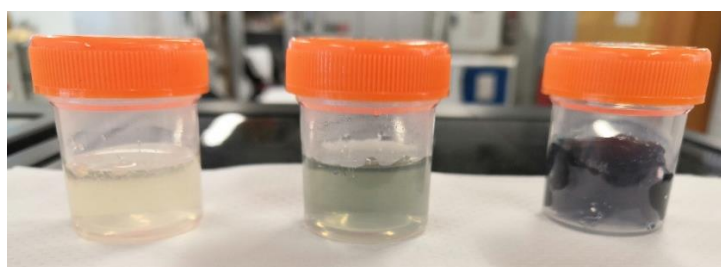


Figura 9. Fotografía comparativa de hidrogel entrecruzados con genipín a distintos tiempos de gelación. Reacción a 2 (izquierda), 12 (centro) y 24 horas (derecha). Fuente propia.

Resultados de espectroscopía infrarroja (FTIR)

Se tomó el espectro obtenido a partir del quitosano sin modificar como referencia (**Figura 10**). De acuerdo a Gregorio-Jauregui *et al.* (2012) [48], el quitosano presenta una serie de picos notorios, estos son: la tensión N-H (3354 cm^{-1}) de la amina primaria, que habitualmente suele encontrarse solapada con la tensión O-H [48] (3293 cm^{-1}) de los alcoholes secundarios del anillo de N-acetilglucosamina. Es una banda de gran intensidad y amplitud por la formación de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares tanto por la amina como los hidroxilos. La tensión C-H asimétrica y simétrica [49, 50] (2917 y 2866 cm^{-1}) del C6 de los monómeros, que es característica de los dextranos. La flexión N-H (1549 cm^{-1}) de la amina primaria, que es un pico confirmatorio del grupo funcional [51]. Y por último, la tensión C-O (1064 y 1026 cm^{-1}), que también son un par de picos propios de dextranos que como indica Shingel (2002) [52] debidos a la vibración del enlace C-O del C4 y C6, respectivamente.

Adicionalmente, se pueden encontrar otros picos no identificativos del compuesto como las tensiones residuales C=O y C-N [53] (1657 y 1304 cm^{-1}) propias de la amida primaria. Estas bandas se deben a una minoría de residuos aun acetilados, como el quitosano de exoesqueleto de gambas de partida presentaba un grado de desacetilación del 75% se trata de una señal esperada que indica la impureza del reactivo. La tensión C-O-C [54] (1153 cm^{-1}) es propia del enlace O-glucosídico y está presente en compuestos glucídicos de más de dos unidades. Finalmente, según la literatura la región entre 2800 y 1700 cm^{-1} no suele contener ninguna banda significativa y es completamente llana por lo que la presencia de picos, especialmente poco intensos y estrechos es indicador de ruido instrumental.

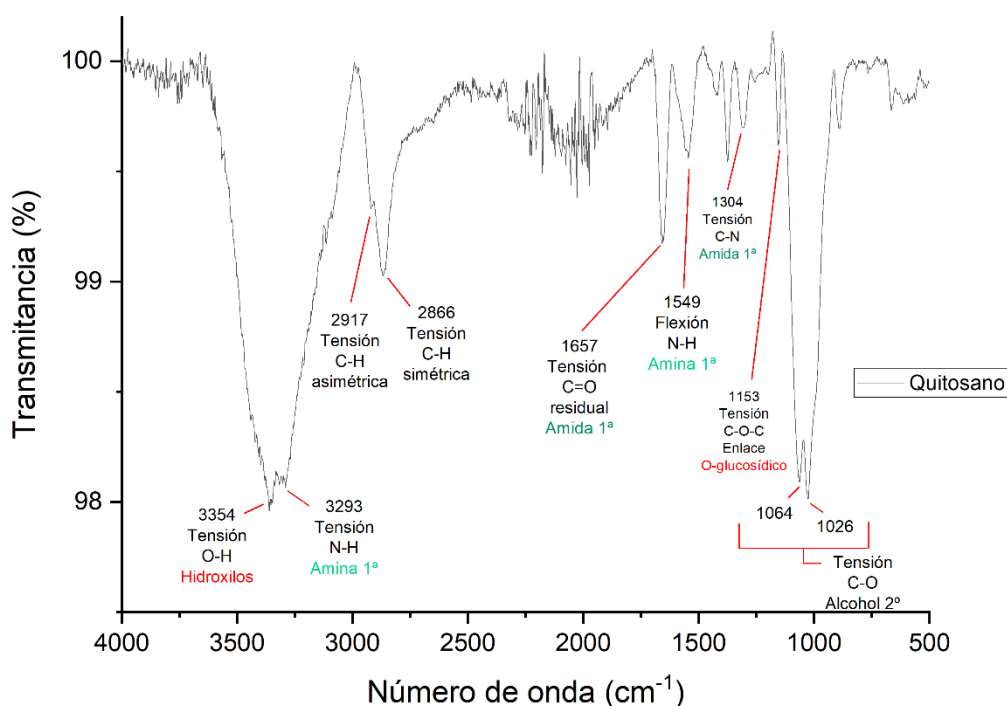


Figura 10. Espectro de infrarrojo medio de polvo de quitosano de exoesqueleto de gambas desacetilado al 75% (Sigma-Aldrich). Elaboración propia.

Para el derivado quitosano-GPTMS (**Figura 11**) se identificaron los picos que confirman las reacciones de adición y polimerización. La apertura del anillo de oxirano y la formación de la amina secundaria se constató observando una disminución en la intensidad de la banda de flexión N-H de la amina primaria (1655 y 1652 cm^{-1}) [36] y su desplazamiento aproximado de 100 cm^{-1} por el cambio en su entorno químico ya documentado [50].

La introducción de átomos de silicio conllevó un aumento en la amplitud de la doble banda situada sobre 1000 cm^{-1} . Esta ampliación se debe a la tensión Si-O-H (921 y 904 cm^{-1}) propia de grupos silanol libres por un entrecruzamiento incompleto [36] y a la tensión Si-O-Si (1070 , 1068 y 1023 , 1020 cm^{-1}) que se ha solapado por completo con las señales de los alcoholes secundarios presentes en el espectro control de quitosano.

Como datos accesorios, en este caso el pico presente a 3368 y 3365 cm^{-1} (tensiones N-H y O-H) comprende dos grupos funcionales capaces de generar puentes de hidrógeno como una amina u alcohol secundario/as y pueden apreciarse bandas propias de dextranos como las mencionadas bandas de tensión C-H simétrica y asimétrica y la tensión del enlace O-glucosídico [54].

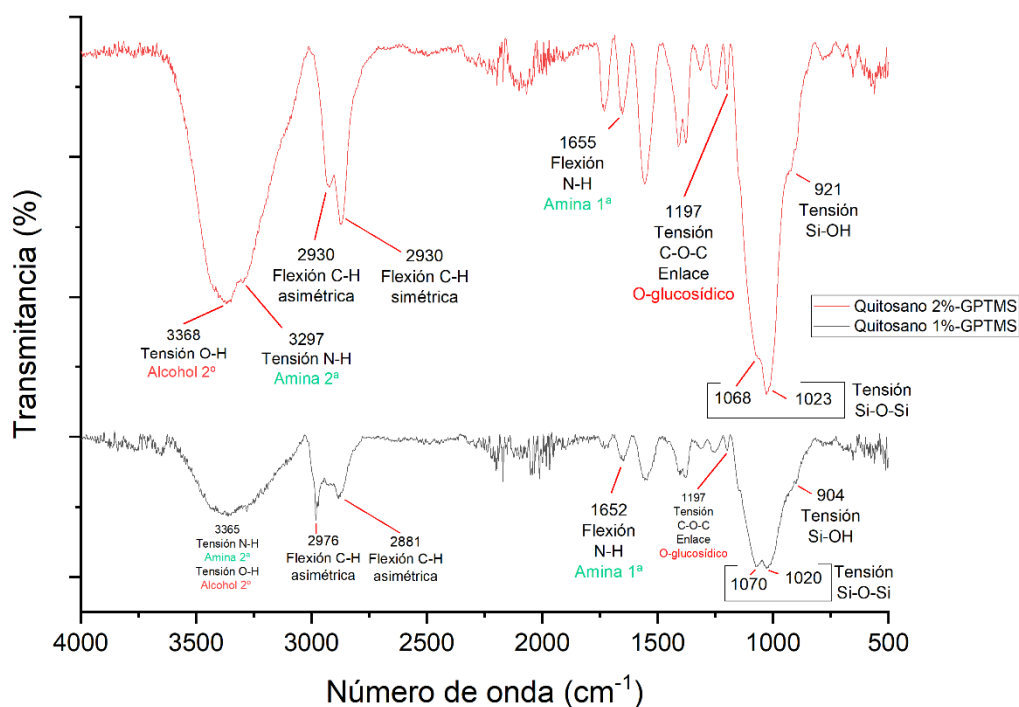


Figura 11. Espectro de infrarrojo medio de las membranas de quitosano-GPTMS a ambas concentraciones de fabricación. Elaboración propia.

Se analizó el derivado quitosano-p-BQ por FTIR (**Figura 12**) a la única concentración de síntesis (1,43%) y se identificaron las bandas características. La unión de la quinona al polímero pudo confirmarse con la banda de tensión C=N [55] (1650 cm^{-1}) propia de las bases de Schiff formadas y por la tensión C=C (cíclico) del anillo a 1575 cm^{-1} . La formación de la imina conlleva la disminución de intensidad del pico de 3343 cm^{-1} por la pérdida de la amina primaria ya que ahora únicamente se debe a los puentes de hidrógeno formados por los grupos hidroxilo y la desaparición de la banda de flexión N-H [56] confirmatoria de este grupo.

El espectro presenta una banda doble de intensidad media sobre 2000 cm^{-1} no documentado en ninguna fuente consultada. Por su gran cantidad de oscilaciones y variaciones súbitas de la señal se llegó a la conclusión de que se trataba de ruido instrumental que la corrección de ATR no pudo eliminar.

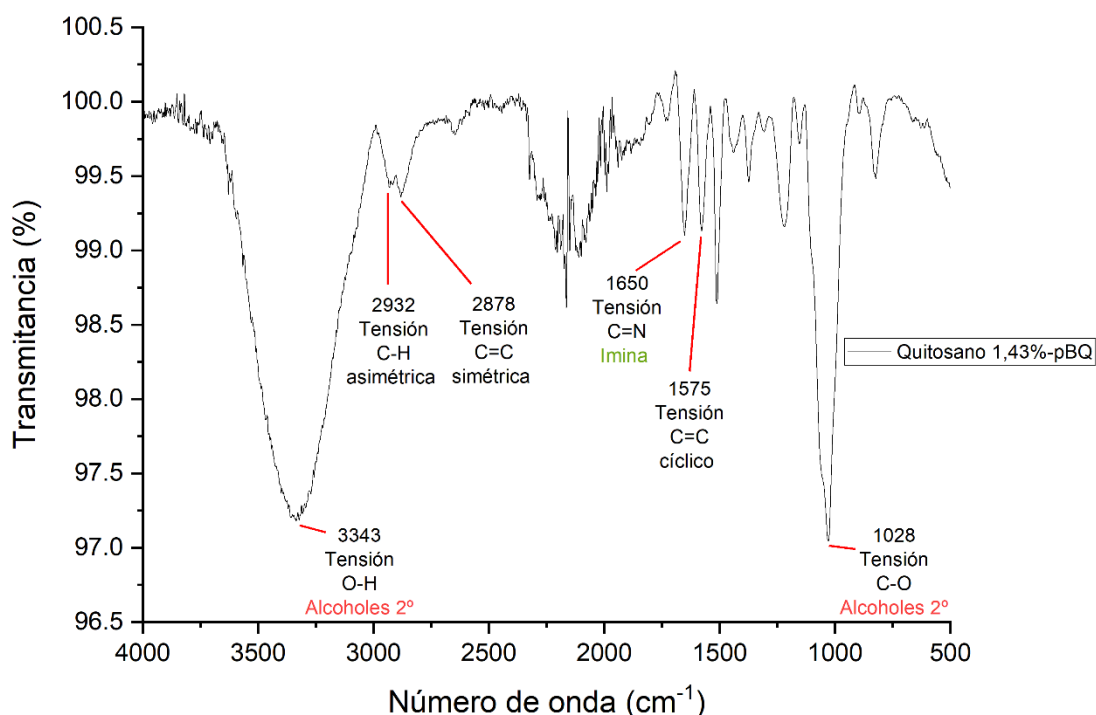


Figura 12. Espectro de infrarrojo medio del polvo de quitosano-pBQ a la única concentración de fabricación. Elaboración propia.

Se identificaron las bandas más características del espectro de infrarrojo para los geles de quitosano a distintas concentraciones entrecruzados con genipín (**Figura 13**). El espectro ofrece bandas identificativas de los dos productos de entrecruzamiento (A y B) de la **Figura 8**. El producto A está definido por la formación de un enlace amida por la transesterificación del metilo del genipín con la amina primaria del quitosano, este grupo puede observarse por la aparición de un pico intenso a 1545 y 1552 cm^{-1} de la deformación N-H propio de las amidas secundarias y un segundo pico confirmatorio a 1649 cm^{-1} de tensión C=O [57]. Por otra parte, ambos productos contienen una amina terciaria heterocíclica por la apertura del anillo de dihidropirano, que presenta un pico de tensión C=N-C a 1376 cm^{-1} [58]. El motivo de que se trate de un doblete puede ser por el solapamiento de otros picos de tensión o flexión C=C de las insaturaciones de los anillos del genipín.

Otro pico confirmatorio de la amida formada en el producto A es la banda de tensión N-H de amidas secundarias, que se encuentra solapada con la tensión O-H de los alcoholes secundarios del quitosano. Como presenta un doblete, se le atribuyó una posición de menor energía a la amida, y la de mayor al alcohol, siendo estas de 3277 y 3354 cm^{-1} , respectivamente. La región entre 2800 y 1700 cm^{-1} ostenta una cantidad de ruido moderada.

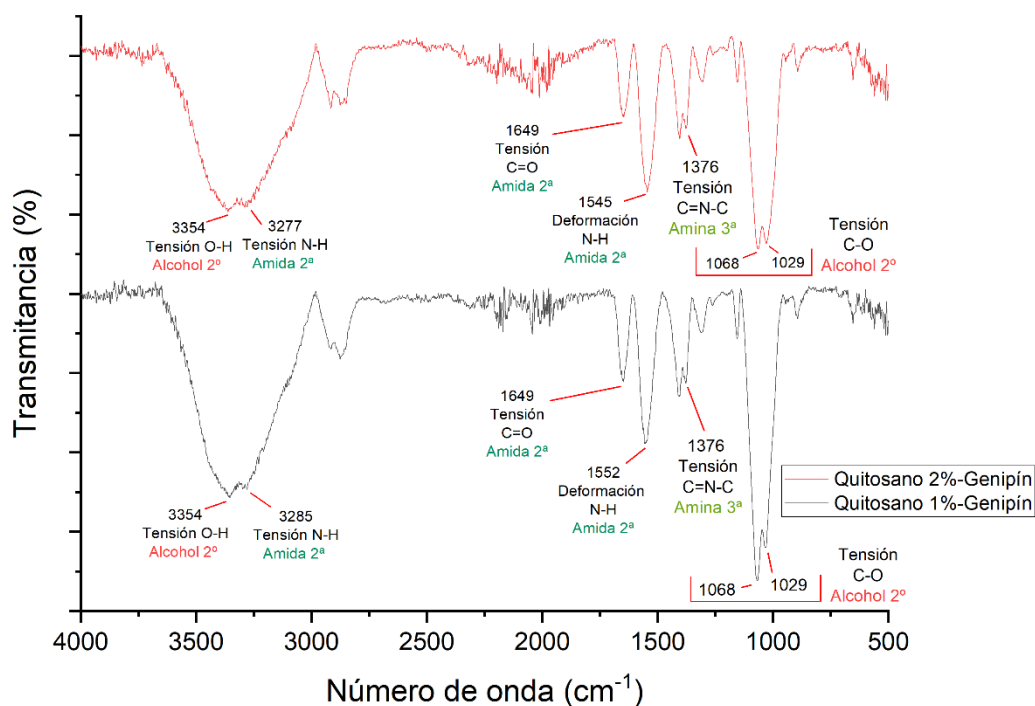


Figura 13. Espectro de infrarrojo medio de las membranas de quitosano-genipín a ambas concentraciones de fabricación. Elaboración propia.

Resultados de la evaluación de la microestructura por SEM

Los geles visualizados por SEM se contrastaron con un estándar de quitosano puro, que se identifica como el material sin modificar. El estándar se elaboró a cuatro concentraciones distintas de quitosano (1%,2%,3% y 5%) con en el mismo solvente empleado en la fabricación de los otros geles (ácido acético 5% (v/v)). Se le aplicó el mismo protocolo de preparación para SEM cambiando el voltaje a 5 kV.

Las micrográficas indican que el quitosano a bajas concentraciones presenta una estructura mixta: fibrosa y laminar (**Figura 14A**). Al aumentar puede empezar a observarse la condensación de las fibras en laminillas de superficie lisa (**14B**), lo que acarrea una disminución de la porosidad. Las laminillas pueden apilarse consigo mismas (**14C**) reforzando su rigidez y la del material, no obstante, la unión entre ellas no es total. A altas concentraciones (**14D**) se compactan ocupando el espacio libre entre ellas y formando un material escamoso de estructura ordenada.

Estas transiciones en la microestructura ya han sido observadas en estudios previos. Jana, Florczyk, Leung & Zhang (2012) [59] descubrieron y discutieron que a altas concentraciones de quitosano (>8%) el polímero exhibía problemas de compactación y cristalinidad pues la protonación de los grupos amino de la estructura es irregular, esto impide la compactación de las laminillas y un menor aumento del esperado en la rigidez del material. Xu, Yuan, Han, Lin & Zhang (2017) [60] en un estudio ampliatorio identificaron parámetros relevantes en la formación del material. Concluyeron que a parte de la concentración de quitosano; el pH durante la gelación y el tiempo de liofilización para preparar la muestra para microscopía de barrido eran condicionantes de la microestructura final del gel y su porosidad.

Esta última es clave en fenómenos de adhesión y proliferación celular. El quitosano por sí mismo no puede formar un hidrogel al no estar entrecruzado. Sin embargo, en elementos protésicos una porosidad baja o nula es necesaria para impedir la colonización que trae la degradación del material por productos del metabolismo celular [53]. En el sentido opuesto, una alta porosidad permite alojar células de tamaño inferior al del poro facilitando su instalación en el material y crecimiento por todos los espacios libres que presente, esto es de especial interés en soportes o *scaffolds* para ingeniería de tejidos para desarrollar productos que favorezcan la migración y colonización celular.

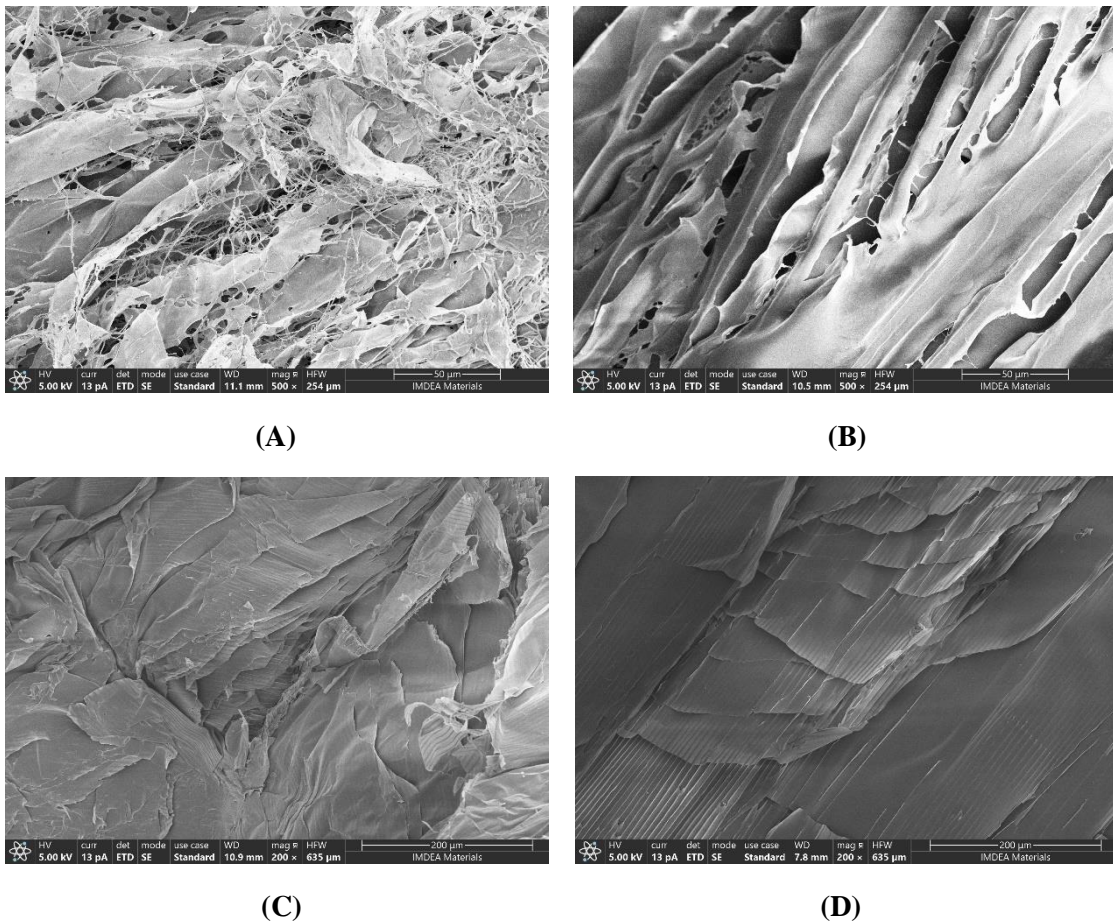


Figura 14. Micrografías SEM para muestras de quitosano puro a distintas concentraciones. A 1% B 2% C 3% D 5%. Preparación a pH 7. Escalas de 50 μm (A-B) y 200 μm (C-D). Fuente propia.

El segundo set de micrografías (**Figura 15**) se corresponde con las muestras de los geles entrecruzados con GPTMS y genipín. Pudo observarse que la superficie de corte lateral de la membrana de GPTMS 1% (**15A**) porta una morfología porosa. La superficie formal también presentaba porosidad, pero de poca profundidad (**15B**). El tamaño de poro era heterogéneo. Al aumentar la concentración del polímero a 2% se identificó la transición de superficie porosa a una rugosa en el corte lateral (**15C**) y la formación de bordes más finos y menos ramificados en la superficie formal (**15D**).

Esto se relaciona con el material ideado por Purwanto *et al.* (2017) [54], un híbrido de quitosano-GPTMS que presenta una superficie porosa de color blanquecino similar a la identificada en este trabajo por SEM y de buena elasticidad y flexibilidad, por lo que se demuestra de nuevo que este reactivo es usado para conferirle al material con el que se entrecruza propiedades similares a una silicona.

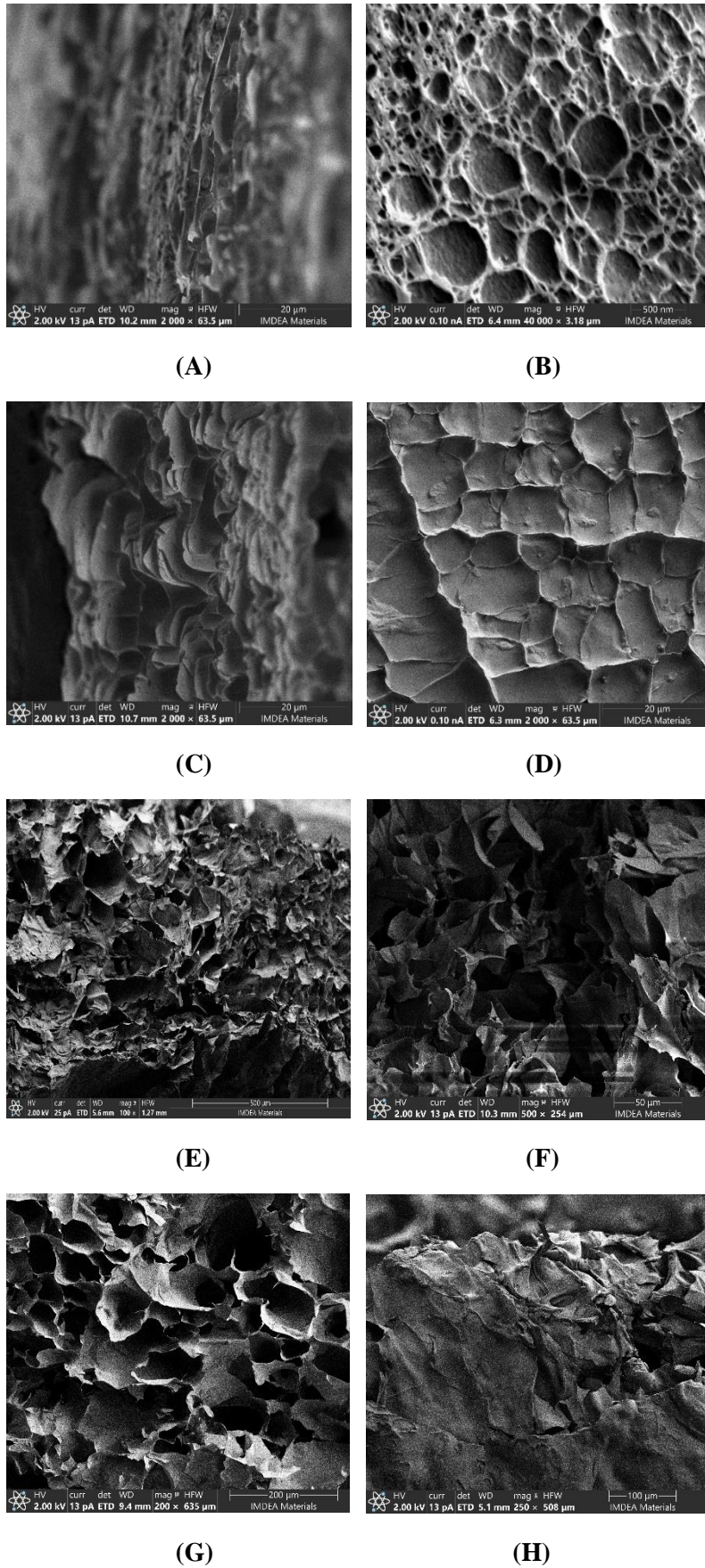


Figura 15. Micrografías SEM de quitosano modificado con GPTMS (A-D) y genipín (E-H) al 1% (A,B,E,F) y 2% (C,D,G,H) para superficie de corte (A,C,E,G) y superficie formal (B,D,F,H). Preparación a pH 7. Escalas de 20 μm (A, C, D), 500 nm (B), 500 μm (E), 50 μm (F), 200 μm (G) y 100 μm (H).

El hidrogel entrecruzado con genipín posee una microestructura más hueca que el derivado anterior (15E). Se aprecia la compactación de laminillas dejando amplias fisuras entre ellas (15F). Al elevar la concentración se observa como el tamaño de poro aumenta (15G) y dichos espacios pueden ser rellenados con más matriz. En ciertas partes del gel se observa ausencia de poros (15H), aunque la superficie no llega a ser suave o plana en ningún punto pues sigue presentando oquedades o pliegues.

Esta morfología es idéntica a la descrita por Gao *et al.* (2014) [32], cuyo estudio analizó la estructura de geles de quitosano al 1 y 2% entrecruzados con distintas cantidades de genipín. Concluyeron que la aparición de poros es debido a una menor concentración local de genipín lo que provoca una menor frecuencia de entrecruzamiento y el debilitamiento de la estructura. Esto es más propio y queda patente en las muestras de quitosano al 2%, cuyo mayor diámetro de poro se debe a un mayor trabajo de difusión del genipín en el interior de un material más denso.

Resultados del estudio de citotoxicidad

Los datos del ensayo de viabilidad PrestoBlue™ fueron recogidos por el software i-Control™ (Tecan) del lector de microplacas y exportados a Microsoft Excel 2018 (Microsoft Corporation) para su procesado. La media del control negativo empleada como blanco fue descontada de los valores de todos los grupos para reducir el ruido instrumental. Se calculó la media de cada grupo y su desviación estándar. Para todos los test se tomó la señal de fluorescencia del control positivo como la equivalente a la de todas de células vivas identificándose como la viabilidad al 100% y se normalizaron los otros tratamientos respecto a ella. Este control consistía en células cultivadas en medio sin ningún hidrogel. El control negativo de los test directos se basó en incubar medio DMEM suplementado sin hidrogel ni células, mientras que el de los indirectos era únicamente dPBS. El análisis estadístico consistió en una prueba de normalidad Shapiro-Wilk con el *Freeware online Statistics Kingdom* (Anexo III, Tabla S2) para la que los test directos e indirectos demostraron seguir una distribución normal ($p > 0,05$ en todos los casos). En segundo lugar, se llevó a cabo un test paramétrico ANOVA de 1 factor con el *Freeware online Good Calculators* (Tabla 2) para encontrar diferencias significativas entre los grupos de cada tratamiento. No se encontró ninguna para las distintas concentraciones de los geles ($p > 0,05$ en todos los casos).

Los resultados del test ANOVA indican que independientemente de qué derivado de quitosano se emplee como hidrogel de soporte, la viabilidad celular no se ve afectada. Un material se considera citotóxico cuando esta es inferior al 80% [33]. Como todos los datos presentes sobrepasan el 100% (Figura 16), no puede emitirse una conclusión efectiva. No es frecuente obtener valores por encima del máximo, no obstante, tampoco es inusual. El reactivo PrestoBlue es una solución basada en resazurina, un tinte celular que en estado oxidado presenta un color azul característico, pero que al reducirse a resorufina por oxidorreductasas mitocondriales se torna rosa. Presenta una correlación directa con la actividad mitocondrial y la respiración celular. Un periodo de incubación prolongado permite la acumulación de resorufina oxidada que ocasiona saturación de fluorescencia [62], por lo que es posible obtener señales que al normalizarse sobrepasen el 100%. Para evitar esto, debe determinarse el tiempo de incubación adecuado para cada línea celular teniendo en cuenta el metabolismo de la respiración de cada una y construir una recta de calibrado a partir de ensayos de tinción previos con la línea de interés [63].

En otros estudios donde se han analizado extractos de quitosano entrecruzado con genipín [64, 32] los autores también obtienen señales iguales y superiores al 100%. La justificación que proporcionan es que la ínfima toxicidad del genipín, aproximadamente 10.000 veces inferior al glutaraldehído (en fibroblastos de ratón 3T3 y extrapolable) sigue permitiendo la proliferación de las células durante la incubación, por lo que la señal puede superar el máximo, además el reactivo de viabilidad PrestoBlue™ al carecer de toxicidad tampoco lo impide, a diferencia de las sales de tetrazolio en las que se basan los métodos convencionales que resultan letales para las células por la formación de cristales salinos en su interior. En este caso, puede asumirse que ambos materiales son citocompatibles en concordancia con los estudios anteriores, ya que además en ningún caso la viabilidad es inferior al 80%.

En general, se aprecia un descenso entre el porcentaje de viabilidad de los test directos (16A y B) y los indirectos (C y D), lo que quiere decir que la supervivencia celular es menor en presencia de extractos de los materiales que de los mismos. Esto puede deberse a proliferación en la superficie del gel en contacto con la monocapa celular.

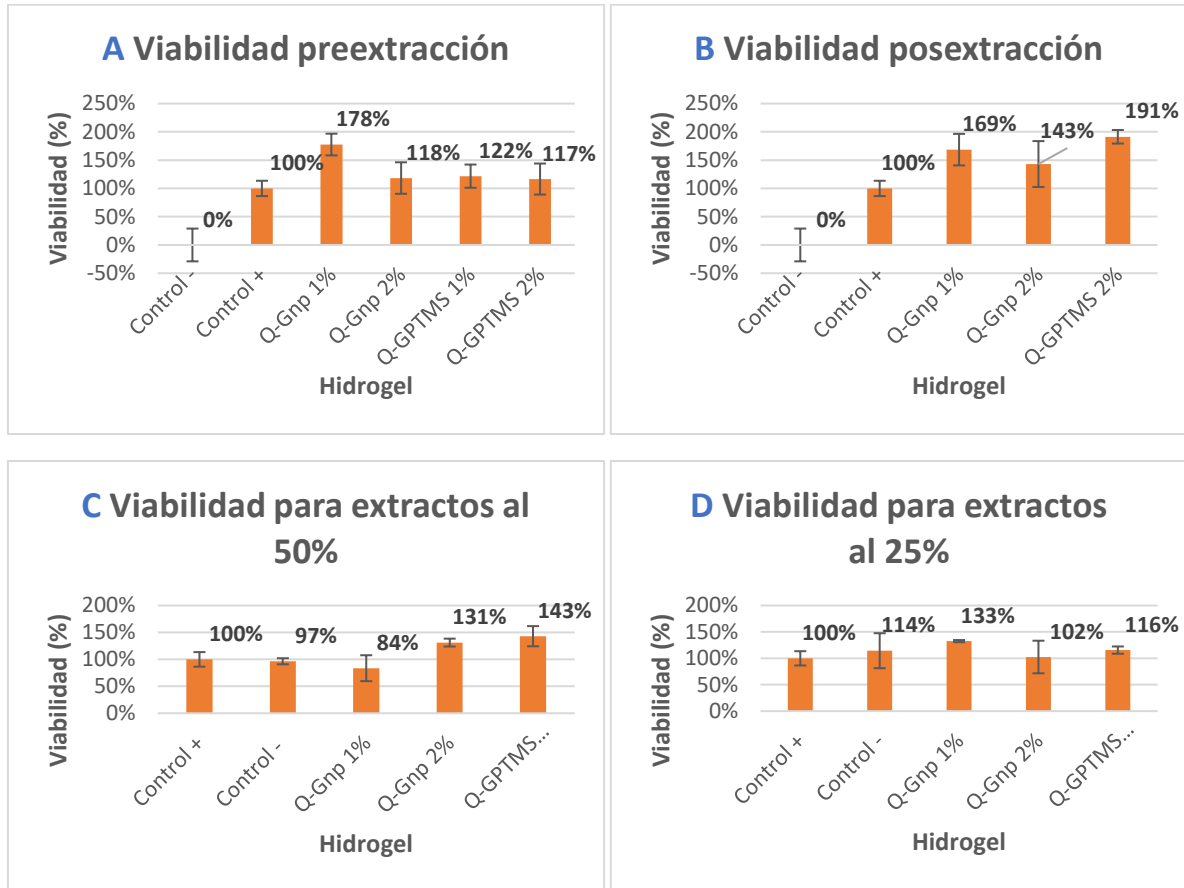


Figura 16. Resultados del test de viabilidad con el reactivo PrestoBlue™ para los test directos (A y B) e indirectos (C y D). Quitosano es abreviado como “Q” y genipín como “Gnp”. Elaboración propia.

Tabla 2. Resultados de la prueba ANOVA de 1 factor para todos los grupos experimentales de los test de contacto directos e indirectos (**Figura 16 A-D**) para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$)

ANOVA DE 1 FACTOR						
TRATAMIENTO	FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	ESTADÍSTICO F	VALOR p
Preextracción	Intergrupar	4	10417,72	2604,43	1,49	0,2759
	Intragrupar	10	17438,67	1743,87		
	Total	14	27856,39			
Posextracción	Intergrupar	3	13810,91	4603,6374	2,28	0,1564
	Intragrupar	8	16157,35	2019,67		
	Total	11	29968,26			
Extractos al 50%	Intergrupar	4	7203,22	1800,80	0,52	0,7205
	Intragrupar	9	30876,01	3430,67		
	Total	13	38079,23			
Extractos al 25%	Intergrupar	4	1582,90	395,72	0,23	0,9111
	Intragrupar	8	13492,34	1686,54		
	Total	12	15075,24			

Resultados del estudio de adhesión

Los datos del ensayo de viabilidad con PrestoBlue™ se procesaron de la misma forma que para el test anterior. Se realizó un test de normalidad Shapiro-Wilk (**Anexo III, Tabla S3**) indicando este que la muestra seguía una distribución gaussiana ($p>0,1$). El análisis ANOVA de 1 factor (**Tabla 3**) reveló que sí hay diferencias significativas entre los distintos tipos de hidrogel ($p=0,0001$). Para identificar los grupos anómalos se empleó un test *post-hoc* de Bonferroni con el *freeware online* GraphPad (**Tabla 4**) que identificó de cuales se trataba. Se consideró trivial la diferencia entre ambos controles (negativo y positivo) y la del control negativo con la membrana de quitosano-GPTMS 2% pero se admitieron las parejas conformadas por el control positivo con la membrana de quitosano-GPTMS 2% y la del hidrogel de quitosano-genipín 2% con la membrana de quitosano-GPTMS 2% ($p<0,05$ en todos los casos).

Tabla 3. Resultados de la prueba ANOVA de 1 factor para el ensayo de adhesión (**Figura 17**) para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$)

ANOVA DE 1 FACTOR						
TRATAMIENTO	FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	ESTADÍSTICO F	VALOR p
Adhesión	Intragrupar	3	90745,99	30248,66	30,02	0,0001
	Intergrupar	8	8058,68	1007,33		
	Total	11	98804,67			

A priori es posible asumir que hay más fibroblastos adheridos a la membrana de GPTMS por presentar el valor de viabilidad más alto (**Figura 17**), superior al del control positivo y al del hidrogel de quitosano-genipín 2%, sin embargo, debe saberse que este último gel presentó un pH ácido. Esto se identificó cuando el reactivo PrestoBlue™ adquirió su clásica coloración rosada indicando una acidez inferior a 6,5 (punto de viraje de la

resazurina) que es con toda seguridad por trazas de ácido acético residuales del solvente del quitosano en el hidrogel, indicando una neutralización insuficiente con NaOH. No obstante, el valor inferior del hidrogel de genipín no se debe solo a su acidez sino también a una adhesión menos efectiva al material. El estudio de imagen por SEM (**Figura 18**) da prueba de ello. Los fibroblastos cultivados sobre el gel de genipín presentan una morfología esférica mientras que los de la membrana de GPTMS una estructura más alargada y aplanada. Solo el segundo caso contempla una correcta estructura de adhesión fusiforme (**18A** y **18B**). En fibroblastos, las uniones efectivas al soporte se dan por el desarrollo de filopodios [**65**] y lamelipodios [**66**], prolongaciones citoplasmáticas ricas en actina que se encargan de fijar la célula al soporte y de su desplazamiento por superficies. En los geles analizados puede verse la formación de dichas prolongaciones en únicamente en la membrana de quitosano-GPTMS 2% (**18C** y **18D**). Las células adheridas al hidrogel de quitosano-genipín 2% no las presentaban (**18E** y **18F**), sin embargo, esto no puede atribuirse a una pobre o nula citocompatibilidad y/o adhesión del material, pues contrastaría con los resultados de todos los artículos de la literatura consultada, sino a que un pH bajo le ha conferido al material una mayor agresión contra las células que están en contacto con él, impidiendo que desarrollen uniones. Esta explicación de una unión celular deficiente por pH ya ha sido analizada por varios autores [**67**, **68**, **69**] y justifica la baja adhesión de células al material y junto a un porcentaje de viabilidad no nulo (**Figura 17**) no pone en duda la citocompatibilidad del material.

Tabla 4. Resultados del análisis post-hoc de Bonferroni de las medidas de viabilidad de los geles sembrados (**Figura 17**) para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$). Quitosano es abreviado como “Q” y genipín como “Gnp”.

BONFERRONI			
COMPARACIÓN	DIFERENCIA DE MEDIAS	ESTADÍSTICO t	p<0,05
Control – vs Control +	-100	3,86	Si*
Control – vs Q-Gnp 2%	-38	1,47	No
Control – vs Q-GPTMS 2%	-229	8,84	Si*
Control + vs Q-Gnp 2%	62	2,40	No
Control + vs Q-GPTMS 2%	-129	4,98	Si
Q-Gnp 2% vs Q-GPTMS 2%	-191	7,37	Si

*Resultados no considerados por trivialidad

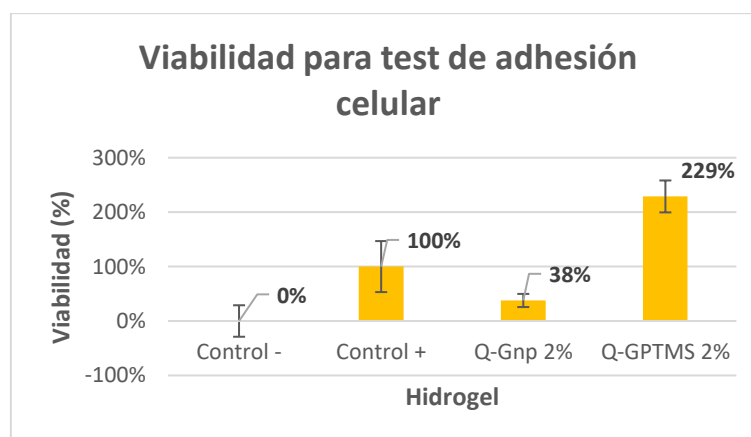
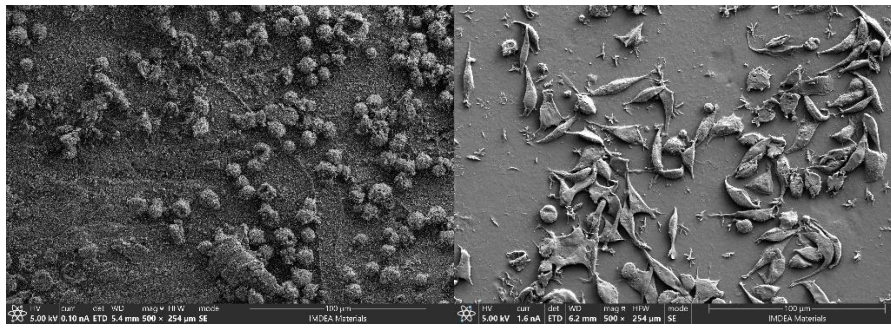
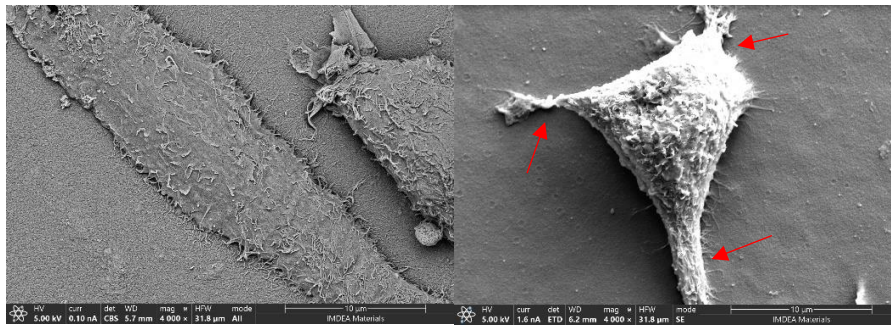


Figura 17. Resultados del test viabilidad por PrestoBlue™ para las células sembradas sobre los distintos hidrogeles a una única concentración del 2%. Quitosano es abreviado como “Q” y genipín como “Gnp”



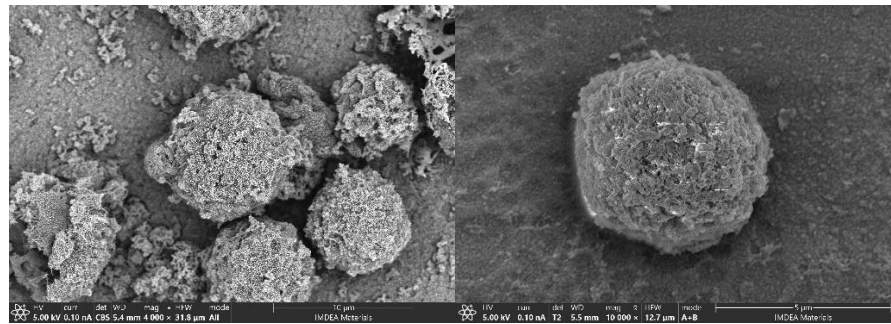
(A)

(B)



(C)

(D)



(E)

(F)

Figura 18. Micrografías SEM del ensayo de adhesión. **A** Adhesión de fibroblastos en el hidrogel de quitosano-genipín 2%. Escala 110 μm . **B** Adhesión de fibroblastos en el hidrogel de quitosano-GPTMS 2%. Escala 100 μm . **C** y **D** Detalle de fibroblastos unidos a membrana de GPTMS, donde se aprecian filopodios y lamelipodios (flechas rojas), respectivamente. Escalas de 10 μm . **E** y **F** Detalle de fibroblastos unidos a hidrogel de genipín sin apreciarse las extensiones citoplasmáticas mencionadas. Escalas de 10 y 5 μm .

CONCLUSIONES

La modificación de quitosano con GPTMS da como lugar membranas (y no hidrogeles) de elasticidad y flexibilidad creciente al aumentar la concentración del agente entrecruzante por la polimerización de los grupos silanol a siloxano. El derivado de pBQ presentaba una consistencia apropiada de gel al final de la síntesis, pero fueron las agresivas condiciones del proceso de lavado y secado la que provocaron la degradación de la red polimérica. Replanteando el proceso de *downstream* podría obtenerse el hidrogel deseado. El material modificado con genipín se exhibe como un hidrogel de color azul, la procedencia natural de sus componentes (quitosano del exoesqueleto de gambas y genipín de *Gardenia Jasminoides*) y su baja toxicidad lo posicionan como una fuente sostenible para la elaboración de soportes para ingeniería de tejidos.

El análisis por FTIR corrobora la correcta síntesis de los derivados al presentar los grupos funcionales esperados tras entrecruzar y SEM su morfología esperada para decidir posibles aplicaciones.

El estudio de citotoxicidad no muestra que los materiales testados provoquen muerte celular (viabilidad >80% en todos los casos) y el análisis estadístico por ANOVA tampoco revela diferencias significativas entre el tipo de gel o su concentración ($p > 0,05$). El resultado de viabilidad contenido en el estudio de adhesión revela muerte celular pronunciada para las células adheridas al derivado de genipín (viabilidad <50%) por un pH demasiado bajo y no por toxicidad asociada al material, por ello, el análisis estadístico ANOVA indica diferencias significativas entre geles ($p < 0,001$) que fueron confirmados por la prueba post-hoc de Bonferroni ($p < 0,05$). El análisis SEM de los materiales sembrados reveló una mejor adhesión de los fibroblastos L929 al derivado de GPTMS que al de genipín por exhibir morfologías fusiformes y esféricas, respectivamente. Esto puede aprovecharse dependiendo de si se desee que el soporte sea colonizado en menor o mayor medida para obtener una densidad celular específica.

El quitosano ha demostrado ser un polímero de origen natural, cuya forma de obtención puede tornarse biológica con cierta inversión en mejorar los rendimientos de reacción del método enzimático con CDAs. Su entrecruzamiento con GPTMS ofrece un material sostenible al 50% por un agente entrecruzante sintético. Por contraparte, su modificación con otro compuesto natural como el genipín puede permitir crear un material completamente amigable con el medio ambiente, sin desechos de producción, biocompatible y destinado a múltiples aplicaciones (ingeniería de tejidos, biorremediación, *drug delivery*, etc.) estableciendo un método de fabricación sostenible y beneficioso acoplable al proceso de obtención del polímero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thakur, S., Thakur, V., & Arotiba, O. (2018). History, Classification, Properties and Application of Hydrogels: An Overview. *Gels Horizons: From Science To Smart Materials*, 29-50. doi: 10.1007/978-981-10-6077-9_2
2. Jiang, L., Qian, F., He, X., Wang, F., Ren, D., & He, Y. et al. (2007). Novel chitosan derivative nanoparticles enhance the immunogenicity of a DNA vaccine encoding hepatitis B virus core antigen in mice. *The Journal Of Gene Medicine*, 9(4), 253-264. doi: 10.1002/jgm.1017
3. Qiao Y, Huang Y, Qiu C, Yue X, Deng L, et al. (2010) The use of PEGylated poly [2-(N,N-dimethylamino) ethyl methacrylate] as a mucosal DNA delivery vector and the activation of innate immunity and improvement of HIV-1-specific immune responses. *Biomaterials* 31: 115-123.
4. Yoo, Y., Yoon, S. J., Kim, S. Y., Lee, D. W., Um, S., Hyun, H., Hong, S. O., & Yang, D. H. (2018). A local drug delivery system based on visible light-cured glycol chitosan and doxorubicin·hydrochloride for thyroid cancer treatment in vitro and in vivo. *Drug delivery*, 25(1), 1664–1671. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1507058>
5. Sepantafar, M., Maheronnaghsh, R., Mohammadi, H., Radmanesh, F., Hasani-Sadrabadi, M. M., Ebrahimi, M., & Baharvand, H. (2017). Engineered Hydrogels in Cancer Therapy and Diagnosis. *Trends in biotechnology*, 35(11), 1074–1087. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.015>
6. Dimatteo, R., Darling, N. J., & Segura, T. (2018). *In situ* forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. *Advanced drug delivery reviews*, 127, 167–184. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.007>
7. Benmassaoud, M. M., Gultian, K. A., DiCerbo, M., & Vega, S. L. (2020). Hydrogel screening approaches for bone and cartilage tissue regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1460(1), 25–42. <https://doi.org/10.1111/nyas.14247>
8. Caló, E., & Khutoryanskiy, V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252-267. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024
9. Nicodemus, G. D., & Bryant, S. J. (2008). Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 14(2), 149–165. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2007.0332>

10. Milcovich, G., Lettieri, S., Antunes, F. E., Medronho, B., Fonseca, A. C., Coelho, J., Marizza, P., Perrone, F., Farra, R., Dapas, B., Grassi, G., Grassi, M., & Giordani, S. (2017). Recent advances in smart biotechnology: Hydrogels and nanocarriers for tailored bioactive molecules depot. *Advances in colloid and interface science*, 249, 163–180. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.009>
11. Liu, X., Steiger, C., Lin, S., Parada, G. A., Liu, J., Chan, H. F., Yuk, H., Phan, N. V., Collins, J., Tamang, S., Traverso, G., & Zhao, X. (2019). Ingestible hydrogel device. *Nature communications*, 10(1), 493. doi.org/10.1038/s41467-019-08355-2
12. Yahia, L. (2015). History and Applications of Hydrogels. *Journal Of Biomedical Sciences*, 04(02). doi: 10.4172/2254-609x.100013
13. Yang, C., Nan, B., Ye, H., Yan, H., Wang, M., & Yuan, Y. (2021). MiR-193b-5p protects BRL-3A cells from acrylamide-induced cell cycle arrest by targeting FoxO3. *Food And Chemical Toxicology*, 150, 112059. doi: 10.1016/j.fct.2021.112059
14. Van Tran, V., Park, D., & Lee, Y. (2018). Hydrogel applications for adsorption of contaminants in water and wastewater treatment. *Environmental Science And Pollution Research*, 25(25), 24569-24599. doi: 10.1007/s11356-018-2605-y
15. Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A. H., Mujtaba, M. A., Alghamdi, N. A., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers*, 12(11), 2702. doi: 10.3390/polym12112702
16. Zamora-Mora, V., Velasco, D., Hernández, R., Mijangos, C., & Kumacheva, E. (2014). Chitosan/agarose hydrogels: Cooperative properties and microfluidic preparation. *Carbohydrate Polymers*, 111, 348-355. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.087
17. Al Sulaiman, D., Cadinu, P., Ivanov, A., Edel, J., & Ladame, S. (2018). Chemically Modified Hydrogel-Filled Nanopores: A Tunable Platform for Single-Molecule Sensing. *Nano Letters*, 18(9), 6084-6093. doi: 10.1021/acs.nanolett.8b03111
18. Qi, X., Su, T., Zhang, M., Tong, X., Pan, W., Zeng, Q., & Shen, J. (2020). Sustainable, flexible and biocompatible hydrogels derived from microbial polysaccharides with tailorable structures for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 237, 116160. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116160
19. Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4(3), 411–427.

20. Zhang, X., Yuan, J., Li, F., & Xiang, J. (2021). Chitin Synthesis and Degradation in Crustaceans: A Genomic View and Application. *Marine Drugs*, 19(3), 153. doi: 10.3390/md19030153
21. Yilmaz Atay, H. (2019). Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. *Functional Chitosan*, 457-489. doi: 10.1007/978-981-15-0263-7_15
22. Kaczmarek, M., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczesna-Antczak, M., & Daroch, M. (2019). Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 7. doi: 10.3389/fbioe.2019.00243
23. Kafetzopoulos, D., Martinou, A., & Bouriotis, V. (1993). Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), 2564–2568. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.2564>
24. Tokuyasu, K., Mitsutomi, M., Yamaguchi, I., Hayashi, K., & Mori, Y. (2000). Recognition of Chitooligosaccharides and Their N-Acetyl Groups by Putative Subsites of Chitin Deacetylase from a Deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*, 39(30), 8837-8843. doi: 10.1021/bi0005355
25. Ilyina, A., Tatarinova, N., & Varlamov, V. (1999). The preparation of low-molecular-weight chitosan using chitinolytic complex from *Streptomyces kurssanovii*. *Process Biochemistry*, 34(9), 875-878. doi: 10.1016/s0032-9592(99)00022-9
26. Vicente, F., Huš, M., Likozar, B., & Novak, U. (2021). Chitin Deacetylation Using Deep Eutectic Solvents: *Ab Initio*-Supported Process Optimization. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(10), 3874-3886. doi: 10.1021/acssuschemeng.0c08976
27. Lapomarda, A., De Acutis, A., Chiesa, I., Fortunato, G. M., Montemurro, F., De Maria, C., Mattioli Belmonte, M., Gottardi, R., & Vozzi, G. (2020). Pectin-GPTMS-Based Biomaterial: toward a Sustainable Bioprinting of 3D scaffolds for Tissue Engineering Application. *Biomacromolecules*, 21(2), 319–327. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01332>
28. Mikhailov, S., Zakharova, A., Drenichev, M., Ershov, A., Kasatkina, M., & Vladimirov, L. et al. (2016). Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Derivatives of Nucleosides and Nucleotides. Mechanism and Comparison with Glutaraldehyde. *Nucleosides, Nucleotides And Nucleic Acids*, 35(3), 114-129. doi: 10.1080/15257770.2015.1114132
29. Tacias-Pascacio, V., García-Parra, E., Vela-Gutiérrez, G., Virgen-Ortiz, J., Berenguer-Murcia, Á., Alcántara, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Genipin as An Emergent

- Tool in the Design of Biocatalysts: Mechanism of Reaction and Applications. *Catalysts*, 9(12), 1035. doi: 10.3390/catal9121035
30. Li, C. P., Weng, M. C., & Huang, S. L. (2020). Preparation and Characterization of pH Sensitive Chitosan/3-Glycidyloxypropyl Trimethoxysilane (GPTMS) Hydrogels by Sol-Gel Method. *Polymers*, 12(6), 1326. <https://doi.org/10.3390/polym12061326>
 31. Ding, H., Li, B., Jiang, Y., Liu, G., Pu, S., & Feng, Y. et al. (2021). pH-responsive UV crosslinkable chitosan hydrogel via “thiol-ene” click chemistry for active modulating opposite drug release behaviors. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117101. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117101
 32. Gao, L., Gan, H., Meng, Z., Gu, R., Wu, Z., & Zhang, L. et al. (2014). Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 398-405. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.03.002
 33. International Organization for Standardization. (2009). Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO/DIS Standard No. 10993-5). Retrieved from <https://www.iso.org/standard/36406.html>
 34. Gibney, R., Patterson, J., & Ferraris, E. (2021). High-Resolution Bioprinting of Recombinant Human Collagen Type III. *Polymers*, 13(17), 2973. doi: 10.3390/polym13172973
 35. Shirozaki, Y., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A., Lopes, M. A., Santos, J. D., Costa, M. A., & Fernandes, M. H. (2009). Physical, chemical and in vitro biological profile of chitosan hybrid membrane as a function of organosiloxane concentration. *Acta biomaterialia*, 5(1), 346–355. doi: 10.1016/j.actbio.2008.07.022
 36. Liu, Y., Su, Y., & Lai, J. (2004). *In situ* crosslinking of chitosan and formation of chitosan–silica hybrid membranes with using γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent. *Polymer*, 45(20), 6831-6837. doi: 10.1016/j.polymer.2004.08.006
 37. Meyers, R. (2001). Encyclopedia of physical science and technology (3rd ed., pp. 257-276). Amsterdam: Elsevier. ISBN-10: 9780122274107
 38. Beppu, M., Vieira, R., Aimoli, C., & Santana, C. (2007). Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. *Journal Of Membrane Science*, 301(1-2), 126-130. doi: 10.1016/j.memsci.2007.06.015
 39. Yang, Q., Dou, F., Liang, B., & Shen, Q. (2005). Studies of cross-linking reaction on chitosan fiber with glyoxal. *Carbohydrate Polymers*, 59(2), 205-210. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.09.013

40. Madera-Santana, T., Herrera-Méndez, C., & Rodríguez-Núñez, J. (2018). An overview of the chemical modifications of chitosan and their advantages. *Green Materials*, 6(4), 131-142. doi: 10.1680/jgrma.18.00053
41. Antony, R., Arun, T., & Manickam, S. (2019). A review on applications of chitosan-based Schiff bases. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 129, 615-633. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.047
42. Haj, N., Mohammed, M., & Mohammood, L. (2020). Synthesis and Biological Evaluation of Three New Chitosan Schiff Base Derivatives. *ACS Omega*, 5(23), 13948-13954. doi: 10.1021/acsomega.0c01342
43. Abdalla, T., Nasr, A., Bassioni, G., Harding, D., & Kandile, N. (2022). Fabrication of sustainable hydrogels-based chitosan Schiff base and their potential applications. *Arabian Journal Of Chemistry*, 15(1), 103511. doi: 10.1016/j.arabjc.2021.103511
44. Abid, O., & Ramadan, A. (2018). Preparation and Identification of Novel 1, 3-Oxazepine Derivatives by Cycloaddition Reactions [2+5] of Selected Carboxylic Acid Anhydrides with Imines Derived from 4-methyl aniline. *Al-Mustansiriyah Journal Of Science*, 29(2), 93-100. doi: 10.23851/mjs.v29i2.331
45. Butler, M., Ng, Y., & Pudney, P. (2003). Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal Of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41(24), 3941-3953. doi: 10.1002/pola.10960
46. Dimida, S., Demitri, C., De Benedictis, V., Scalera, F., Gervaso, F., & Sannino, A. (2015). Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal Of Applied Polymer Science*, 132(28), n/a-n/a. doi: 10.1002/app.42256
47. Muzzarelli, R. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1-9. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.01.016
48. Gregorio-Jauregui, K., Pineda, M., Rivera-Salinas, J., Hurtado, G., Saade, H., & Martinez, J. et al. (2012). One-Step Method for Preparation of Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan. *Journal Of Nanomaterials*, 2012, 1-8. doi: 10.1155/2012/813958
49. Motiei, M., Pleno de Gouveia, L., Šopík, T., Vícha, R., Škoda, D., & Císař, J. et al. (2021). Nanoparticle-Based Rifampicin Delivery System Development. *Molecules*, 26(7), 2067. doi: 10.3390/molecules26072067

50. Glišić, S., Nikolić, G., Cakić, M., & Trutić, N. (2015). Spectroscopic study of copper (II) complexes with carboxymethyl dextran and dextran sulfate. *Russian Journal Of Physical Chemistry A*, 89(7), 1254-1262. doi: 10.1134/s0036024415070122
51. Yusharani, M., Stenley, Harmami, Ulfir, I., & Ni'mah, Y. (2019). Synthesis of water-soluble chitosan from squid pens waste as raw material for capsule shell: temperature deacetylation and reaction time. *IOP Conference Series: Materials Science And Engineering*, 509, 012070. doi: 10.1088/1757-899x/509/1/012070
52. Shingel, K. (2002). Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and γ -irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 337(16), 1445-1451. doi: 10.1016/s0008-6215(02)00209-4
53. Fernandes Queiroz, M., Melo, K., Sabry, D., Sasaki, G., & Rocha, H. (2014). Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?. *Marine Drugs*, 13(1), 141-158. doi: 10.3390/md13010141
54. Ma, F., Wang, Z., Zhao, H., & Tian, S. (2012). Plasma Depolymerization of Chitosan in the Presence of Hydrogen Peroxide. *International Journal Of Molecular Sciences*, 13(6), 7788-7797. doi: 10.3390/ijms13067788
55. Zuluaga-Corrales, Héctor Fabio, & Ruiz-Cruz, Yury, & Romero-Peñaloza, Elkin Libardo, & Triana-Guzmán, Vivian Lizeth, & Chaur-Valencia, Manuel Noé (2018). New chitosan-imine derivatives: from green chemistry to removal of heavy metals from water. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (89),34-43. ISSN: 0120-6230.
56. Yu, R., Cornette de Saint-Cyr, L., Soussan, L., Barboiu, M., & Li, S. (2021). Anti-bacterial dynamic hydrogels prepared from O-carboxymethyl chitosan by dual imine bond crosslinking for biomedical applications. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 167, 1146-1155. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.068
57. Klein, M., Hackenhaar, C., Lorenzoni, A., Rodrigues, R., Costa, T., Ninow, J., & Hertz, P. (2016). Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 137, 184-190. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.069
58. El Ichi, S., Zebda, A., Alcaraz, J., Laaroussi, A., Boucher, F., & Boutonnat, J. et al. (2015). Bioelectrodes modified with chitosan for long-term energy supply from the body. *Energy & Environmental Science*, 8(3), 1017-1026. doi: 10.1039/c4ee03430a
59. Jana, S., Florczyk, S., Leung, M., & Zhang, M. (2012). High-strength pristine porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Journal Of Materials Chemistry*, 22(13), 6291. doi: 10.1039/c2jm16676c

60. Xu, Y., Yuan, S., Han, J., Lin, H., & Zhang, X. (2017). Design and fabrication of a chitosan hydrogel with gradient structures via a step-by-step cross-linking process. *Carbohydrate Polymers*, 176, 195-202. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.032
61. van Tienen, T., Heijkants, R., Buma, P., de Groot, J., Pennings, A., & Veth, R. (2002). Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes. *Biomaterials*, 23(8), 1731-1738. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00280-0
62. Purwanto, M., Atmaja, L., Salleh, M., Mohamed, M., Jaafar, J., & Ismail, A. et al. (2017). Correlation between proton conductivity, hydrophilicity, and thermal stability of Chitosan/Montmorillonite composite membrane modified GPTMS and their performance in direct methanol fuel cell. *Malaysian Journal Of Analytical Science*, 21(3). doi: 10.17576/mjas-2017-2103-17
63. Suntornnond, R., Tan, E., An, J., & Chua, C. (2017). A highly printable and biocompatible hydrogel composite for direct printing of soft and perfusable vasculature-like structures. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-17198-0
64. Riss, T., & Moravec, R. (2004). Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *ASSAY And Drug Development Technologies*, 2(1), 51-62. doi: 10.1089/154065804322966315
65. Wong, S., Guo, W. H., & Wang, Y. L. (2014). Fibroblasts probe substrate rigidity with filopodia extensions before occupying an area. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(48), 17176–17181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412285111>
66. Sixt M. (2012). Cell migration: fibroblasts find a new way to get ahead. *The Journal of cell biology*, 197(3), 347–349. <https://doi.org/10.1083/jcb.201204039>
67. Rauschner, M., Lange, L., Hüsing, T., Reime, S., Nolze, A., & Maschek, M. et al. (2021). Impact of the acidic environment on gene expression and functional parameters of tumors in vitro and in vivo. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1). doi: 10.1186/s13046-020-01815-4
68. Chen, Y. H., Chung, Y. C., Wang, I. J., & Young, T. H. (2012). Control of cell attachment on pH-responsive chitosan surface by precise adjustment of medium pH. *Biomaterials*, 33(5), 1336–1342. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.048>

ANEXO I

Cálculos para la síntesis de los derivados

Determinación de la masa molecular del quitosano de exoesqueleto de gambas (DD \geq 75%).

Ecuación SI. Sistema de ecuaciones para la determinación de la masa molecular del quitosano a partir de 1g de reactivo y un DD=75%.

$$\begin{cases} m_{\text{QUITOSANO}} + m_{\text{QUITINA}} = 1g \\ \frac{m_{\text{QUITOSANO}}}{161,2g/mol} \div \frac{m_{\text{QUITINA}}}{203,9g/mol} = 0,75 \end{cases} \quad \text{Siendo } m_{\text{quitosano}}=0,704g \text{ y } m_{\text{quitina}}=0,296g.$$

Tabla SI. Recopilación de ecuaciones usadas para el cálculo de masas y volúmenes de reactivos de síntesis

REACTIVO	Masa (g)	Volumen (μL)	ECUACIÓN
Quitosano 1% (m/v)	1	-	$m_{\text{quitosano}} = [\text{Quitosano}](p/v) \times V_{\text{solución}}$
Quitosano 2% (m/v)	2	-	
GPTMS para Quitosano 1%	-	972	$V_{\text{GPTMS}} = \frac{n_{\text{quitosano}}}{1g_{\text{quitosano}}} \times m_{\text{quitosano}} \times \frac{M_m \text{ GPTMS}}{d_{\text{GPTMS}}}$
GPTMS para Quitosano 2%	-	1940	
p-BQ para Quitosano 1,43%	0,238	-	$m_{\text{pBQ}} = \frac{n_{\text{quitosano}}}{1g_{\text{quitosano}}} \times m_{\text{quitosano}} \times \frac{1 \text{ mol}_{\text{pBQ}}}{2 \text{ moles}_{\text{quitosano}}} \times M_m \text{ pBQ}$
Genipín para Quitosano 1 y 2%	0,01	-	$m_{\text{Gnp}} = [\text{Gnp}](p/v) \times V_{\text{solución}}$

ANEXO II

Cálculos para el volumen de cultivo de fibroblastos L929 necesario para los tests de citotoxicidad y adhesión

Datos

Volumen por pocillo: 0,25 mL

Densidad celular final: $1,8 \times 10^4$ células/pocillo

Concentración celular del cultivo de partida: $1,36 \times 10^4$ células/mL

Cálculos

Ecuación S2. Cálculo de la concentración de células por pocillo para una placa de 48

$$\frac{1,8 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{pocillo}}}{0,25 \frac{\text{mL}}{\text{pocillo}}} = 7,2 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

Ecuación S3. Cálculo del volumen necesario de cultivo de fibroblastos L929 confluyente al 80%

$$\frac{1,36 \times \frac{10^6 \text{células}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL}}{7,2 \times 10^4 \frac{\text{células}}{\text{mL}}} = 19 \text{ mL}$$

ANEXO III

Pruebas de normalidad para resultados de los test de citotoxicidad y adhesión

Tabla S2. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los test directo e indirecto para una confianza del 95%. ($\alpha=0,05$)

SHAPIRO-WILK			
TRATAMIENTO	ESTADÍSTICO W	GRADOS DE LIBERTAD	VALOR p
Preextracción	0,958	15	0,666
Posextracción	0,904	12	0,181
Extractos al 50%	0,897	13	0,122
Extractos al 25%	0,904	13	0,154

Tabla S3. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el ensayo de adhesión para una confianza del 95%. ($\alpha=0,05$)

SHAPIRO-WILK			
TRATAMIENTO	ESTADÍSTICO W	GRADOS DE LIBERTAD	VALOR p
Adhesión	0,900	12	0,139