



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Químicas

Doctorado en Ciencias con Mención en Química

**“DISEÑO DE UN HIDROGEL AUTORREPARABLE Y
ANTIMICROBIANO PARA LA INGENIERÍA DE TEJIDOS
CUTÁNEOS.”**

Tesis presentada a la facultad de ciencias químicas de la universidad de
concepción para optar al grado académico de doctor en ciencias con mención en
química

Universidad de Concepción

Por:

CARLA MARCELA RUIZ ARRIAGADA

Académicos Guías

Profesor guía: Dr. Bruno Urbano (Universidad de Concepción)

Profesor co-guía Dr. Bruno Boury (Instituto Charles Gerhardt de Montpellier)

Agosto 2026

Concepción, Chile

© 2026, Carla Marcela Ruiz Arriagada. Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo siempre la cita bibliográfica del presente documento y su autor.



Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Gracias

Por esas personas que curan, escuchan, abrazan, motivan y te hacen sonreír.



Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
TABLA DE CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ingeniería de tejidos.....	1
1.2. La piel	2
1.3. Biomateriales	5
1.4. Hidrogeles	5
1.4.1. Tipos de hidrogeles	6
1.4.2. Estrategias de entrecruzamiento	7
1.4.3. Hidrogeles de redes duales	11
1.5. Enlaces covalentes dinámicos	11
1.5.1. Clasificación según estímulo	13
1.5.2. Clasificación según mecanismo.....	13
1.5.3. Enlace disulfuro	14
1.6. Propuesta	17
1.7. Gelatina.....	17
1.8. Ácido tióctico o lipoico.....	18
1.9. Formación de red dual	18
1.10. Refuerzo por la incorporación de Cu(II).....	19
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS DE TRABAJO	20

3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	20
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4.	METODOLOGÍA.....	21
4.1.	Síntesis de gelatinas modificadas.....	21
4.1.1.	Síntesis gelatina metacrilada (GelMA)	21
4.1.2.	Síntesis gelatina modificada con ácido tióctico (GelTA).	21
4.2.	Preparación de hidrogeles.	22
4.3.	Caracterización fisicoquímica.....	23
4.3.1.	Espectroscopía infrarroja:.....	23
4.3.2.	Resonancia Magnética Nuclear:.....	23
4.3.3.	Fluorescencia:.....	23
4.3.4.	Espectroscopía de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP):24	
4.3.5.	Espectroscopia UV-Vis:	24
4.3.6.	Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersa (EDS):.....	25
4.3.7.	Análisis termogravimétrico:.....	25
4.3.8.	Capacidad de absorción de agua (swelling)	25
4.3.9.	Fotorreología:	25
4.3.10.	Reometría:.....	26
4.3.11.	Propiedades mecánicas:	26
4.3.12.	Densidad de entrecruzamiento	26
4.3.13.	Citotoxicidad:.....	27
4.3.14.	Propiedades antibacterianas:	28
4.3.15.	Determinación de aminoácidos	28
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	30
5.1.	Obtención y caracterización de gelatinas modificadas	30
5.1.1.	Caracterización por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	30
5.1.2.	Caracterización por ¹ H-RMN	32

5.1.3.	Caracterización por fluorescencia	34
5.2.	Obtención y Caracterizaciones de los hidrogeles.....	36
5.2.1.	Preparación de hidrogeles.	36
5.2.2.	Efecto del Cu(II) en contacto con las gelatinas modificadas antes de su fotopolimerización.	37
5.2.3.	Determinación de Absorción y liberación de Cu(II) por Espectroscopía de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP)	38
5.2.4.	Determinación de Absorción y liberación de Cu(II) por espectroscopía UV-Vis	43
5.2.5.	Capacidad de absorción de agua	44
5.2.6.	Fotorreometría	46
5.2.7.	Reometría	50
5.2.8.	Propiedades mecánicas.	58
5.2.9.	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	64
5.2.10.	Análisis termogravimétrico.....	67
5.2.11.	Citotoxicidad	68
5.2.12.	Ensayo antimicrobiano	73
6.	CONCLUSIONES	75
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	78
8.	ANEXOS	91
8.1.	Ácido tióctico	91
8.2.	Metodología de análisis de fluorescencia	92
8.3.	Determinación de aminoácidos	93
8.4.	Diseño de moldes.....	95
8.5.	Síntesis de gelatinas modificadas.....	96
8.6.	Preparación de hidrogeles.	96
8.7.	Absorción de Cu(II) por ICP.....	96
8.8.	Reometría cíclica.....	97

8.9.	Propiedades mecánicas.....	99
8.10.	SEM	100
8.11.	Citotoxicidad	103
8.12.	Propiedades antibacterianas.....	103



Universidad de Concepción

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen resumen de investigación.	XVI
Figura 2. Principales componentes de la ingeniería de tejidos.....	2
Figura 3: a)Diagrama de la estructura de la piel. ⁸ y b)materiales utilizados según propiedades mecánicas ²	3
Figura 4: Diferente tipos de estrategias de entrecruzamientos. ²¹	7
Figura 5: Tipos de entrecruzamiento físico.....	9
Figura 6: Tipos de entrecruzamiento químico.	9
Figura 7: Otras estrategias de entrecruzamiento.	11
Figura 8: Diagrama de formación de redes duales.	11
Figura 9: Mecanismos de autorreparación basados en enlaces covalentes dinámicos e interacciones no covalentes. ⁴⁴	12
Figura 10: Esquema de mecanismos para ECD reversibles ³⁹	14
Figura 11: Distintos mecanismos para el intercambio disulfuro ⁵⁶	14
Figura 12: Reacción de fotoclick tiol-norborneno, entrecruzamiento de ditiolano sin iniciador e inducido por fotoiniciador, entrecruzamiento ditiolano-norborneno inducido por fotoiniciador (PI, fotoiniciador). ⁶⁴	16
Figura 13: Estructura del ácido tióctico (TA).....	18
Figura 14: Esquema de mecanismo de LDH	28
Figura 15: Síntesis de gelatinas modificadas.	30
Figura 16: a) Espectro ATR-FT-IR comparación de gelatina y GelMA. b) Espectro ATR-FT-IR comparación de gelatina, ácido tióctico (TA) y GelTA.	31
Figura 17: Análisis cuantitativo de ¹ H-RMN a) gelatinas modificadas con anhídrido metacrílico (destacado en celeste se encuentra la señal asociada a la fenilalanina, metacrilatos y los protones asociados a la lisina) y b) modificación con ácido tióctico (destacado en celeste se encuentra la señal asociada a la fenilalanina y los protones asociados a la lisina.	33

Figura 18: a) Espectros de fluorescencia de distintas concentraciones de gelatina mg/ml y b) Curva de calibración de fluorescencia.....	34
Figura 19: Imágenes de hidrogeles luego de fotopolimerizar y luego de ser sumergidos en Cu(II).	36
Figura 20: Prueba cualitativa de la adición de solución de CuCl ₂	37
Figura 21: Cuantificación del contenido de Cu ²⁺ en los hidrogeles fotopolimerizados con y sin iniciador por ICP. (Análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y P< 0,05, 0,1234 (ns), 0,0332(*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,001(****)).	38
Figura 22: Capacidad de absorción y liberación de Cu(II) por medio de ICP de hidrogeles. (triplicados, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y *P< 0,05).....	40
Figura 23: Caracterización de absorción de Cu(II) por medio de absorbancia a) Espectros a distintas concentraciones de Cu(II) para la construcción de la curva de calibración y elección del máximo de absorbancia a 815nm, b) Curva de calibración y regresión lineal, Capacidad de absorción y liberación de Cu(II) de hidrogeles c) Con iniciador y d) Sin iniciador.....	44
Figura 24: Representación esquemática del hinchamiento de redes con distintos entrecruzamientos.....	45
Figura 25: Capacidad de absorción de agua de las distintas mezclas con y sin Cu(II) a) con y b) sin iniciador.(n=3, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y *P< 0,05).....	45
Figura 26: estudios de fotoreometría de a) GelMA con iniciador, b) GelMA sin iniciador, c) GelTA con iniciador, d) GelTA sin iniciador, e) hidrogeles MATA con iniciador y f) MATA hidrogeles sin iniciador.	48
Figura 27: Caracterización de propiedades reológicas de mezclas de gelatinas (GelMA/GelTA) en distintas proporciones a) mezclas con iniciador sin Cu(II), b) mezclas con iniciador con Cu(II), c) mezclas sin iniciador sin Cu(II), d) mezclas sin iniciador con Cu(II).	50
Figura 28. autorrecuperación reológica por time sweep aplicando 1% de deformación (blanco) y 1000% de deformación (celeste).....	54

Figura 29: Porcentajes de recuperación reologica de G' de los hidrogeles pormedio de los valores obtenidos de time sweep	56
Figura 30: Barridos de frecuencia de G' y G'' de hidrogeles MA_xTA_y con diferentes composiciones, en presencia y ausencia de iniciador y el efecto de la incorporación de $Cu(II)$	57
Figura 31: Determinación de densidad de entrecruzamiento efectivo desde análisis de frecuencia. (triplicados, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y $*P < 0,05$).....	58
Figura 32: Ensayos de compresión de los hidrogeles a) Con iniciador sin $Cu(II)$, b) Con iniciador Con $Cu(II)$, c) Sin iniciador sin $Cu(II)$ y d) Sin iniciador con $Cu(II)$	59
Figura 33: Segmento de las curvas de esfuerzo/deformación del 2 al 10 % de deformación para el cálculo de los módulos de Young, con sus respectivas aproximaciones lineales a) Mezclas con iniciador sin $Cu(II)$, b) Mezclas con iniciador con $Cu(II)$, c) Mezclas sin iniciador sin $Cu(II)$ y d) Mezclas sin iniciador con $Cu(II)$	60
Figura 34: análisis termogravimétrico de los hidrogeles secos por medio de liofilización	67
Figura 35: Análisis de citotoxicidad verde a las 24 horas, 48 horas y 72 horas con A) Alamar Blue y B) Pico Green (n=4, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y $*P < 0,05$).....	69
Figura 36: Análisis de citotoxicidad con azul de Alamar a a)0 μM , b)10 μM , c)50 μM y d)100 μM (cuadruplicados, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y $*P < 0,05$).....	70
Figura 37: a) Determinación de parámetros de liberación máxima y espontanea de LDH para elección de cantidad de células optimas y la determinación de porcentajes de citotoxicidad de muestras con y sin iniciador medidasluego de sumergir por a) 1h y c) 24h.	72
Figura 38: Propiedades antibacterianas por halo de inhibición con E. coli y S. epidermidis (cuadruplicado).....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales propiedades en el diseño del material para la piel (tabla adaptada de referencias). ³	3
Tabla 2: Composiciones de las mezclas de GelMA/GelTA en los hidrogeles.....	22
Tabla 3: DoF de gelatinas modificadas determinado por medio de 1H-RMN y fluorescencia.	35
Tabla 4: Calculo del DoF de gelatinas modificadas determinado por medio de RMN y fluorescencia en base a la determinación de aminoácidos.	35
Tabla 5: Porcentajes de liberación de Cu(II) de los hidrogeles sumergidos en soluciones de 0,34 mol/L y 0,12 mol/L.....	42
Tabla 6: Módulo de para hidrogeles con iniciador sin y con Cu(II)	62
Tabla 7: Módulo de para hidrogeles sin iniciador sin y con Cu(II).....	62
Tabla 8: SEM de los hidrogeles MA _x TA _y liofilizados.....	65
Tabla 9: Mapeo elemental de S y Cu para los hidrogeles MA _x TA _y liofilizados.....	66

Universidad de Concepción

RESUMEN

La ingeniería de tejidos requiere biomateriales capaces de reproducir las propiedades estructurales, mecánicas y biológicas de la matriz extracelular, manteniendo simultáneamente estabilidad, biocompatibilidad y capacidad de adaptación frente a estímulos fisiológicos. Es fundamental señalar que las propiedades mecánicas de los tejidos vivos varían significativamente, desde la rigidez del cartílago hasta la notable suavidad del tejido cerebral. En este contexto, el presente trabajo desarrolló una estrategia para la obtención de hidrogeles de red dual basados en gelatina modificada químicamente, mediante la combinación de entrecruzamientos covalentes permanentes, enlaces covalentes dinámicos e interacciones de coordinación metal-ligando.

Para ello, la gelatina fue funcionalizada independientemente con anhídrido metacrílico y ácido tióctico, obteniéndose gelatina metacrilada (GelMA) y gelatina modificada con ácido tióctico (GelTA), respectivamente. La funcionalización fue confirmada mediante espectroscopía infra-rojo (ATR-FTIR), resonancia magnética nuclear (RMN) y cuantificación de grupos amino mediante el ensayo de o-ftalaldehído (OPA) obteniendo grados de modificación aproximadamente de un 60%. Posteriormente, ambas gelatinas modificadas fueron combinadas en distintas proporciones y fotopolimerizadas para formar hidrogeles de red dual, donde la red primaria se estableció mediante la fotopolimerización de los grupos metacrilato de GelMA y la red secundaria mediante la reorganización de enlaces disulfuro provenientes de los grupos 1,2-ditiolano de GelTA. Adicionalmente, se incorporó Cu(II) como agente de coordinación con el propósito de generar puntos de entrecruzamiento físicos reversibles y potenciar tanto las propiedades mecánicas como la funcionalidad biológica del material.

Los hidrogeles fueron caracterizados mediante estudios reológicos, ensayos de compresión, análisis de hinchamiento, determinación de densidad de entrecruzamiento, microscopía electrónica de barrido, espectroscopía de energía dispersiva de rayos X, análisis termogravimétrico, estudios de absorción y liberación de Cu(II), así como ensayos biológicos de citocompatibilidad y actividad antimicrobiana.

Los resultados demostraron que la incorporación de GelTA favoreció la formación de una red dinámica capaz de reorganizarse mediante enlaces disulfuro, mientras que la presencia de Cu(II) incrementó la densidad efectiva de entrecruzamiento a través de interacciones de coordinación metal-ligando, lo que se establecen con los sitios de coordinación de la gelatina natural y los que resultan de la modificación química con ácido tióctico. La acción sinérgica de ambos mecanismos permitió mejorar la estabilidad estructural, el comportamiento viscoelástico, la resistencia mecánica y la capacidad de disipación de energía de los hidrogeles, sin afectar significativamente su estabilidad térmica. Asimismo, los materiales desarrollados presentaron una estructura porosa e interconectada, adecuada citocompatibilidad y actividad antibacteriana frente a las cepas evaluadas, evidenciando el efecto bioactivo de la incorporación del cobre.

En conjunto, esta investigación demuestra que la integración de una red covalente permanente basada en GelMA, una red covalente dinámica formada por GelTA y un sistema adicional de coordinación con Cu(II) constituye una estrategia eficaz para el diseño de hidrogeles multifuncionales con propiedades mecánicas y biológicas mejoradas. La arquitectura propuesta representa una plataforma prometedora para el desarrollo de andamios destinados a aplicaciones en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, proporcionando una nueva aproximación para el diseño de biomateriales inspirados en la organización dinámica.

Universidad de Concepción

ABSTRACT

Tissue engineering requires biomaterials capable of reproducing the structural, mechanical and biological properties of the extracellular matrix, while maintaining stability, biocompatibility and adaptability to physiological stimuli. It is critical to note that the mechanical properties of living tissues vary significantly, from the stiffness of the cartilage to the remarkable softness of the brain tissue. In this context, the present work developed a strategy for obtaining dual-lattice hydrogels based on chemically modified gelatin, by combining permanent covalent crosslinks, dynamic covalent bonds and metal-ligand coordination interactions.

To this end, gelatin was independently functionalized with methacrylic anhydride and thioctic acid, obtaining methacrylate gelatin (GelMA) and gelatin modified with thioctic acid (GelTA), respectively. Functionalization was confirmed by infra-red spectroscopy (ATR-FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR) and amino group quantification by o-phthalaldehyde (OPA) assay, obtaining degrees of modification of approximately 60%. Subsequently, both modified gelatins were combined in different proportions and photopolymerized to form dual-lattice hydrogels, where the primary lattice was established by photopolymerization of the methacrylate groups of GelMA and the secondary lattice by the reorganization of disulfide bonds from the 1,2-dithiolane groups of GelTA. Additionally, Cu(II) was incorporated as a coordination agent with the purpose of generating reversible physical cross-linking points and enhancing both the mechanical properties and the biological functionality of the material.

The hydrogels were characterized by rheological studies, compression assays, swelling analysis, crosslinking density determination, scanning electron microscopy, X-ray energy dispersive spectroscopy, thermogravimetric analysis, Cu(II) absorption and release studies, as well as biological assays of cytocompatibility and antimicrobial activity.

The results showed that the incorporation of GelTA favored the formation of a dynamic network capable of reorganizing itself by disulfide bonds, while the presence of Cu(II) increased the effective crosslinking density through metal-ligand coordination interactions, which are established with the coordination sites of natural gelatin and those resulting from chemical modification with thioctic acid. The

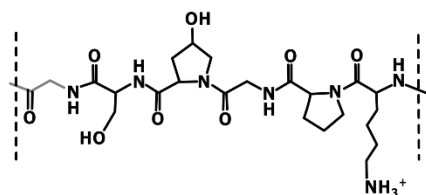
synergistic action of both mechanisms allowed to improve the structural stability, viscoelastic behavior, mechanical resistance and energy dissipation capacity of the hydrogels, without significantly affecting their thermal stability. Likewise, the materials developed presented a porous and interconnected structure, adequate cytocompatibility and antibacterial activity against the evaluated strains, evidencing the bioactive effect of the incorporation of copper.

Overall, this research demonstrates that the integration of a permanent covalent network based on GelMA, a dynamic covalent network formed by GelTA and an additional coordination system with Cu(II) constitutes an effective strategy for the design of multifunctional hydrogels with improved mechanical and biological properties. The proposed architecture represents a promising platform for the development of scaffolds for applications in tissue engineering and regenerative medicine, providing a new approach for the design of biomaterials inspired by dynamic organization.

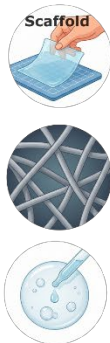


Universidad de Concepción

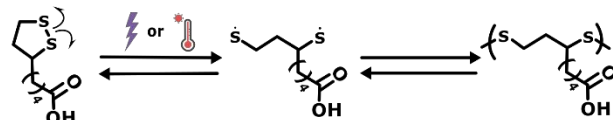
Gelatina



- Disponible en el mercado
- Biocompatible
- Fácil de modificar



Ácido tioctico



- Disponible en el mercado
- Biocompatible

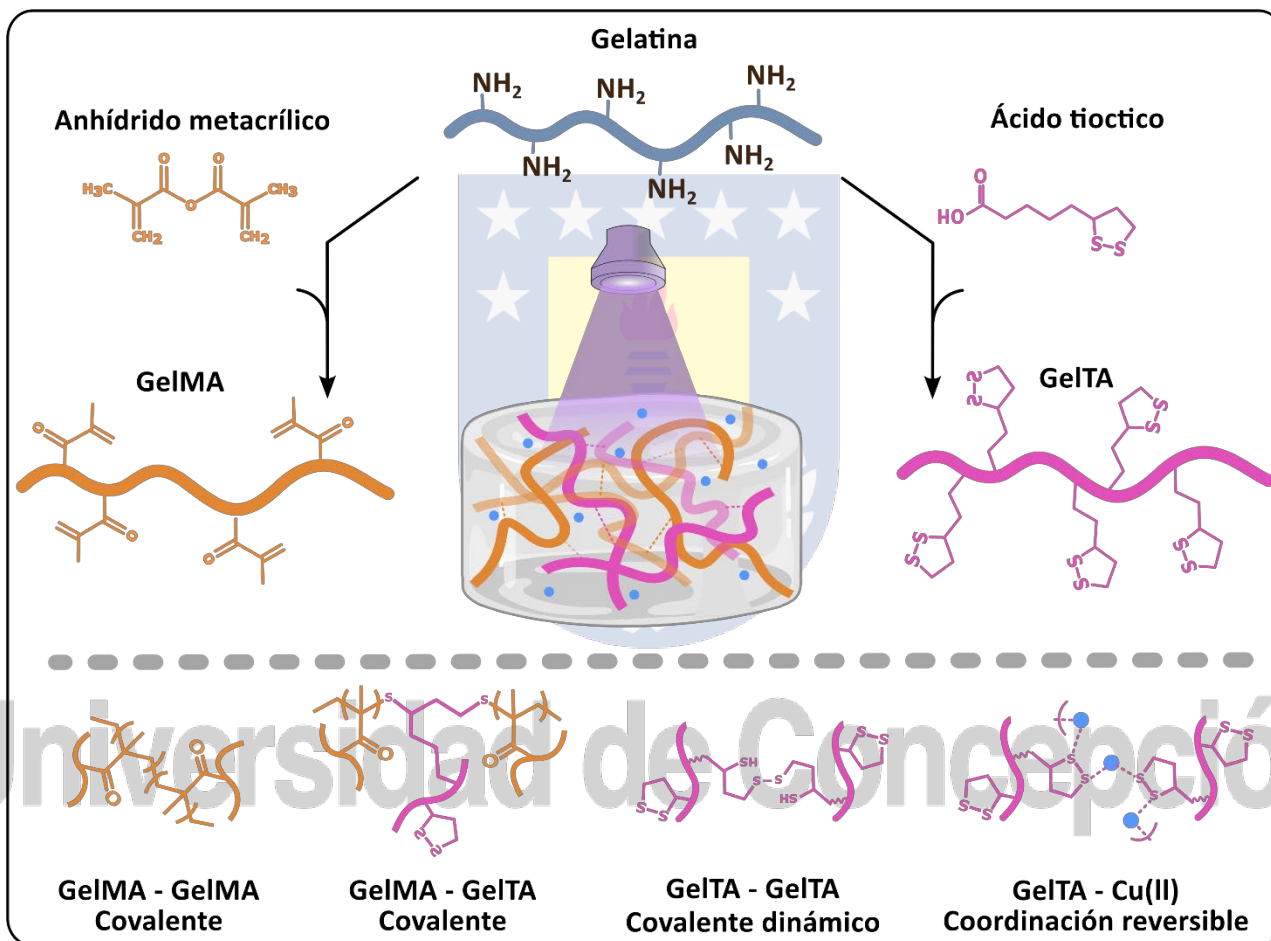


Figura 1. Imagen resumen de investigación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ingeniería de tejidos

En la actualidad es de gran interés el desarrollo de la ingeniería de tejidos ya que ofrece una gran oportunidad de avances en la medicina que incluyen la regeneración y sustitución de tejidos y órganos, la reducción de la necesidad de trasplantes, la generación de terapias personalizadas y la mejora de la calidad de vida de los pacientes¹. En particular para la sustitución de tejidos, dependiendo de en qué parte del cuerpo se requiera el reemplazo de un tejido dañado o un refuerzo la materialidad y propiedades del sustituto serán muy importantes² (**Figura 2**).

Para producir un sustituto o reemplazo del tejido original es crucial que exista compatibilidad con el organismo y no desate una respuesta inmune, es decir, que el material o sus productos de degradación no causen muerte celular, inflamación crónica o daño de las funciones de las células²⁻⁴, y para ello, es necesario que los sustitutos cumplan con diversas condiciones dependiendo del tejido objetivo donde serán utilizados.

Los sustitutos pueden ser de uso interno o externo al cuerpo y en el último caso se debe considerar también las distintas condiciones de uso como el pH, concentración de iones, adhesividad, humedad, temperatura, entre otras.

Universidad de Concepción

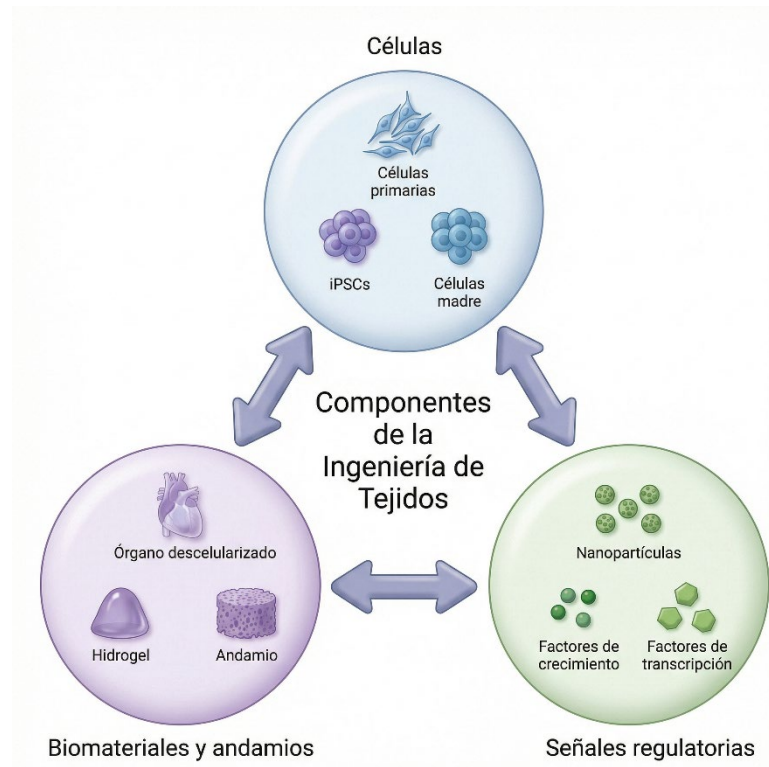
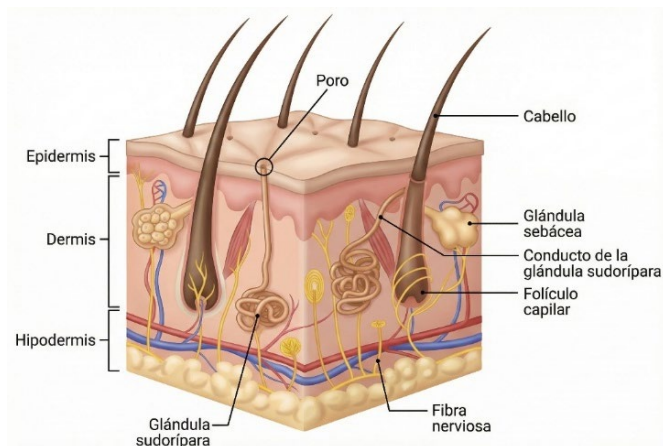


Figura 2. Principales componentes de la ingeniería de tejidos.

1.2. La piel

La piel es la primera barrera de protección, el órgano más grande y vulnerable a heridas⁵. Es un tejido que cumple un rol crucial en el cuerpo como termorregulador, barrera protectora de las condiciones ambientales entre otras⁶, por ello es de suma importancia que se mantenga en buen estado y que los daños que pueda sufrir sean reparados de manera eficiente y rápida para que pueda cumplir su función y evitar daños en el sistema al quedar expuesto al entorno. Los andamios o *scaffolds* de ingeniería de tejido de la piel se utilizan para guiar la reparación de la piel cuando la piel no puede repararse a sí misma⁷.

a)



b)

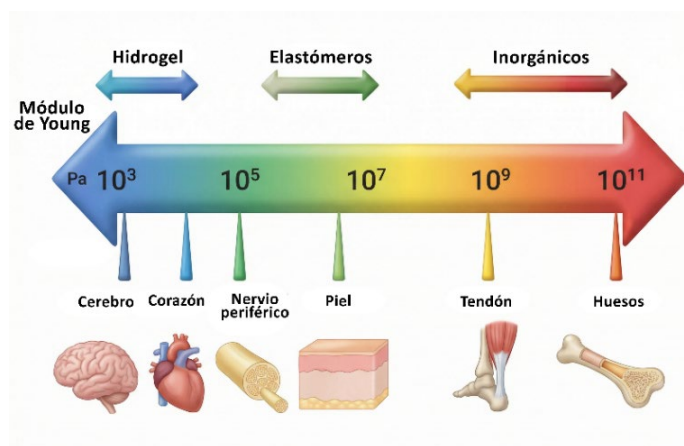


Figura 3: a) Diagrama de la estructura de la piel.⁸ y b) materiales utilizados según propiedades mecánicas²

La piel está compuesta de diferentes células y múltiples capas anatómicamente distintas, comúnmente clasificadas en tres compartimentos principales; epidermis, dermis y tejido subcutáneo (hipodermis) (**Figura 3a**). La epidermis es un epitelio multicapa dinámico, que se renueva continuamente, compuesto principalmente de queratinocitos⁶. La epidermis está conectada a su capa adyacente, la dermis, mediante la membrana basal. Los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas, los ejes y los nervios están incrustados en esta subcapa. La dermis tiene alrededor de 1-2 mm de espesor, proporciona soporte mecánico y resistencia a la tracción lo cual proviene mayoritariamente del colágeno (aproximadamente 70-80%) para la piel, así como las propiedades elásticas se deben a la elastina, la cual es un componente minoritario (del orden del 2-4%) responsable de la recuperación elástica tras la deformación. La hipodermis es la subcapa final, que funciona como amortiguador de la piel y aislante térmico del cuerpo, y está compuesta principalmente por fibroblastos y adipocitos⁶.

Diseñar materiales para el reemplazo de tejidos es necesario considerar las propiedades de los tejidos objetivos, en este caso la piel, de tal manera que sean lo más parecidas al tejido epitelial. Se han realizado varios estudios de *scaffolds* para la reparación de tejido en donde se describen algunas de estas propiedades y limitaciones que se pueden tener^{9, 10}. Los factores más importantes en el diseño para la obtención de un scaffold sustituto de piel destacan la biocompatibilidad, propiedades mecánicas, propiedades fisicoquímicas y la capacidad de absorción de agua.¹¹ (**Tabla 1**)

Tabla 1: Principales propiedades en el diseño del material para la piel (tabla adaptada de referencias).³

Consideraciones de diseño	Propiedades
Mecánicas	Capacidad para soportar condiciones de cargas naturales Resistencia a la deformación Viscoelasticidad similar a la piel nativa Rango de módulo elástico de 10 a 850 kpa Contracción mínima en cultivo <i>in vitro</i>
Biocompatibilidad	Soporte para la unión celular, proliferación y la diferenciación. Soporte para la biodegradación y la remodelación del entorno extracelular Regular las comunicaciones intercelulares e intracelulares
Fisicoquímicas	Reticulación estable y firmeza intermolecular Resistencia a la degradación rápida Porosidad suficiente para permitir el transporte de nutrientes y desechos. ph y temperatura de polimerización fisiológicamente relevantes
Absorción de agua	Capacidad para mantener un nivel óptimo de hidratación.

La biocompatibilidad es importante al momento de diseñar un material para ingeniería de tejidos. Un material se considera biocompatible cuando es capaz de interactuar con el tejido vivo sin causar una respuesta negativa. Los materiales biocompatibles son sustancias naturales o artificiales que se utilizan en contacto directo con el cuerpo humano para reemplazar o mejorar la funcionalidad de los sistemas biológicos⁴. Para que un material sea biocompatible, debe cumplir con ciertas características. En general, los materiales biocompatibles deben ser sistémica y farmacológicamente inertes, lo que significa que no deberían provocar una respuesta en el organismo y que no afectan negativamente sus tejidos. Además, deben ser estables en el tiempo, resistentes a la degradación y no tóxicos.

Mecánicamente es necesario que el material tenga la capacidad de soportar los esfuerzos mecánicos a los que está expuesto el tejido objetivo. Para caracterizar el desempeño mecánico de los *scaffolds* se pueden realizar ensayos de tensión, compresión, flexión o cizallamiento para luego comparar los parámetros del tejido objetivo con el del material, por ejemplo, el módulo de Young es un parámetro que informa acerca de la rigidez de un material y de esta forma elegir el material más adecuado para el tejido objetivo (**Figura 3b**).

1.3. Biomateriales

Los biomateriales son sustancias producidas por organismos vivos y/o diseñadas para interactuar con sistemas biológicos con fines médicos, como el soporte de tejido, la sustitución o la mejora del tejido. Pueden derivarse de fuentes naturales o sintéticas y se clasifican en categorías como cerámica, metales y polímeros. El campo ha evolucionado significativamente, integrando avances en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, lo que ha ampliado sus aplicaciones en la atención sanitaria. Las siguientes secciones detallan la clasificación, propiedades y aplicaciones de los biomateriales. Los biomateriales se pueden clasificar en biomateriales naturales: materias derivados de organismos vivos (por ejemplo, seda, colágeno) y biomateriales sintéticos: materias sintéticas (por ejemplo, cerámica, metales, polímeros) y también compuestos: combinación de diferentes materias para potenciar las propiedades.^{12, 13}

1.4. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes tridimensionales de polímeros hidrofílicos que pueden absorber y retener cantidades significativas de agua manteniendo su integridad estructural sin disolverse. Sus propiedades únicas, como la hinchazón y la flexibilidad, las hacen valiosas en diversas aplicaciones, especialmente en el ámbito biomédico. Desde una perspectiva funcional, la captación de agua gobierna el transporte de masa dentro de la matriz hidrogel, afectando la difusión de nutrientes, oxígeno y moléculas bioactivas, lo cual es especialmente relevante en aplicaciones de administración de fármacos e ingeniería de tejidos.

Los hidrogeles pueden estar formados por polímeros naturales, polímeros sintéticos o combinaciones de ambos, que se organizan en una red tridimensional entrecruzada. Las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles dependen de múltiples factores,

como la composición química, las interacciones intermoleculares, el método de polimerización, la masa molar, el pH y la porosidad

Los hidrogeles son una opción interesante en el desarrollo de biomateriales y para su uso en el reemplazo de tejidos blandos debido a dos características indispensables: i) los hidrogeles son materiales viscoelásticos suaves que puede imitar las propiedades viscoelásticas de los tejidos, ii) son sistemas abiertos que pueden intercambiar, sustancias (o energía) con el ambiente¹⁴. Los hidrogeles se han utilizado en una variedad de aplicaciones, como en la fabricación de lentes de contacto, pañales, apósitos para heridas, y sistemas de liberación de fármacos^{10, 15, 16}.

La estabilidad de las reticulaciones puede afectar la biocompatibilidad. Si la reticulación no es estable es posible que ocurra degradación del material y los productos de la degradación pueden provocar toxicidad. El grado de reticulación influye también en el tamaño de poro en el material y cambia con el contenido de agua del *scaffold*, lo cual es importante para el intercambio de nutrientes. Cabe destacar que el grado de reticulación también afecta la estabilidad mecánica, ya que generalmente, la rigidez aumenta con el grado de reticulación. Mientras, el pH juega un papel importante en el mantenimiento de un entorno fisiológicamente relevante para los componentes celulares de las construcciones de tejido vivo. Por lo tanto, también es importante evaluar y controlar el pH como parte del proceso de diseño del andamio y como puede afectar la estructura del sustituto.

La capacidad de absorción de agua es una consideración crítica que depende de la porosidad del hidrogel, la densidad de reticulación, el pH y la temperatura, ya que afecta las propiedades mecánicas del hidrogel en donde una elevada hidratación puede generar inestabilidad mecánica.

1.4.1. Tipos de hidrogeles

En literatura se describen distintos tipos de hidrogeles^{17, 18}, los cuales se clasifican en:

- i. hidrogeles químicos: formados mediante enlaces covalentes, proporcionando estabilidad
- ii. hidrogeles físicos: creados mediante interacciones más débiles como enlaces de hidrógeno, permitiendo hinchazón reversible.

- iii. hidrogeles inteligentes: Capaces de responder a estímulos externos, como cambios de temperatura o pH. Modulados por el tipo de entrecruzamiento que presentan, adaptando a la aplicación objetivo del material^{19, 20}

El entrecruzamiento de redes poliméricas es una estrategia ampliamente utilizada en la preparación de hidrogeles, donde los métodos físicos y químicos constituyen las principales vías de reticulación. (Figura 4)

1.4.2. Estrategias de entrecruzamiento



Figura 4: Diferente tipos de estrategias de entrecruzamientos.²¹

1.4.2.1. Entrecruzamiento físico

Los hidrogeles físicamente reticulados corresponden a una categoría de materiales que se forman sin recurrir a agentes de entrecruzamiento químico potencialmente

citotóxicos. En su lugar, su estructura se origina a partir de interacciones intermoleculares reversibles, tales como enlaces de hidrógeno, entrelazamientos de cadenas a nivel intra o inter polimérico, interacciones iónicas o electrostáticas, coordinación con metales, formación de complejos, así como interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, las cuales permiten establecer una red tridimensional en el gel.

Entre las distintas estrategias de entrecruzamiento físico, la coordinación entre iones metálicos y grupos funcionales presentes en las cadenas poliméricas ha recibido un creciente interés debido a la elevada estabilidad y reversibilidad de estos complejos. Los enlaces de coordinación se generan mediante la interacción de cationes metálicos con grupos donadores de electrones, como carboxilatos, hidroxilos, aminas o tioles, formando puntos de unión dinámicos cuya estabilidad depende de la naturaleza del metal, la geometría de coordinación y las condiciones del medio. A diferencia de los enlaces covalentes permanentes, estas interacciones pueden reorganizarse bajo deformación mecánica, permitiendo redistribuir esfuerzos y reducir la concentración localizada de tensiones, lo que incrementa la tenacidad y la resistencia a la fractura de los hidrogeles. **(Figura 5)**

El cobre en estado de oxidación +2 (Cu(II)) se ha consolidado como uno de los iones metálicos más estudiados para el reforzamiento de biomateriales poliméricos²². Su elevada afinidad por grupos carboxilato, amino e imidazol permite establecer múltiples enlaces de coordinación reversibles dentro de la red polimérica, incrementando la densidad efectiva de entrecruzamiento sin comprometer completamente la movilidad de las cadenas. Como consecuencia, la incorporación de Cu(II) suele traducirse en aumentos significativos del módulo elástico, la resistencia mecánica y la capacidad de disipación de energía, además de aportar funcionalidades biológicas adicionales, entre ellas actividad antimicrobiana, estimulación de la angiogénesis y participación en procesos de remodelación tisular.

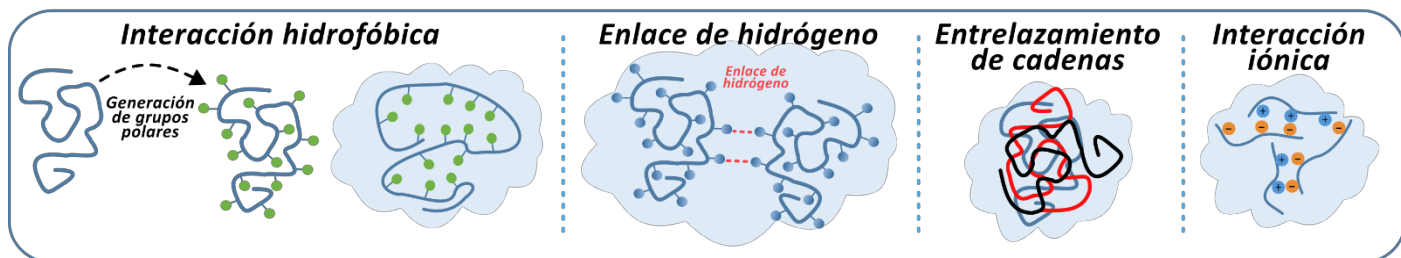


Figura 5: Tipos de entrecruzamiento físico.

1.4.2.2. Entrecruzamiento químico

En los hidrogeles, la reticulación química consiste en la formación de enlaces covalentes permanentes que, por lo general, unen cadenas poliméricas. Estos enlaces presentan una mayor resistencia y estabilidad en comparación con las interacciones presentes en hidrogeles reticulados físicamente. Se han reportado distintas estrategias de reticulación, entre las que se incluyen, sin limitarse a ellas, la reacción tipo clic de Diels–Alder, la generación de bases de Schiff, las adiciones de tipo Michael, la exposición a radiación de alta energía y el entrecruzamiento mediado por enzimas²³. **(Figura 6)**

La reticulación de polímeros por radiación de alta energía ofrece muchas oportunidades para desarrollar tecnologías inteligentes como la impresión 3D, la micro fabricación y los recubrimientos²⁴. Las principales estrategias actuales incluyen la introducción de fotoiniciadores que pueden formar radicales para desencadenar las polimerizaciones y, como consecuencia, curar los polímeros lineales o la resina mediante irradiación de luz²⁵. La reticulación mediante radicales es un proceso crucial en la química de polímeros, que utiliza diversos iniciadores para generar radicales que facilitan la formación de redes reticuladas. Este método mejora las propiedades mecánicas y la estabilidad térmica de los materiales. Diversas especies, incluidos los iniciadores y los entrecruzadores, desempeñan papeles esenciales en este proceso.

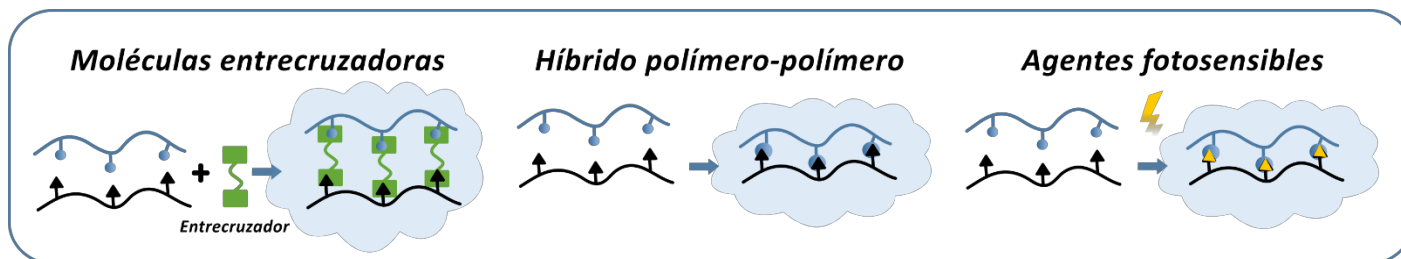


Figura 6: Tipos de entrecruzamiento químico.

1.4.2.3. Otras estrategias

Los hidrogeles convencionales, independientemente de si su estructura está gobernada por entrecruzamientos covalentes o físicos, presentan limitaciones derivadas del compromiso existente entre rigidez mecánica, elasticidad y capacidad de deformación. En general, el incremento de la densidad de entrecruzamiento mejora la resistencia y el módulo elástico del material, pero simultáneamente reduce la movilidad de las cadenas poliméricas, disminuyendo su extensibilidad, tenacidad y capacidad para disipar energía. Por el contrario, redes menos entrecruzadas exhiben una mayor deformabilidad, aunque con propiedades mecánicas insuficientes para soportar las cargas presentes en numerosos tejidos biológicos. Estas limitaciones han impulsado el desarrollo de estrategias avanzadas de ingeniería de redes poliméricas orientadas a desacoplar estas propiedades aparentemente contradictorias.

Asimismo, se han desarrollado diversas estrategias de reticulación, tales como redes poliméricas interpenetrantes, sistemas de doble red, incorporación de nano refuerzos y técnicas de fabricación aditiva, cuyo uso ha aumentado en los últimos años (**Figura 7**). Entre las estrategias, destacan los hidrogeles de doble red (Double Network, DN), una arquitectura polimérica introducida originalmente para incrementar simultáneamente la resistencia mecánica y la tenacidad de materiales altamente hidratados. Estos sistemas están constituidos por dos redes poliméricas interpenetradas que coexisten dentro del mismo volumen sin encontrarse necesariamente unidas mediante enlaces covalentes directos. Habitualmente, la primera red corresponde a una estructura que promueve /aporta rigidez, altamente entrecruzada y relativamente frágil, mientras que la segunda red posee una menor densidad de entrecruzamiento, mayor flexibilidad y elevada capacidad de deformación. La combinación de ambas redes produce un efecto sinérgico que permite obtener propiedades mecánicas considerablemente superiores a las alcanzadas por cada componente de forma individual.²⁶⁻²⁹

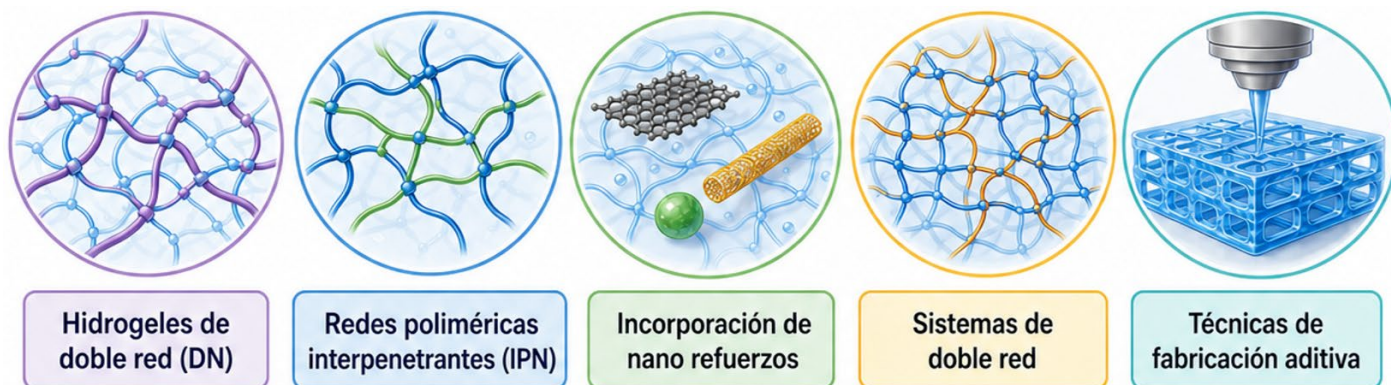


Figura 7: Otras estrategias de entrecruzamiento.

1.4.3. Hidrogeles de redes duales

Entre las estrategias más exitosas destacan los hidrogeles de red dual, cuya arquitectura combina dos redes poliméricas con funciones estructurales complementarias. A diferencia de los hidrogeles convencionales, en los que un único mecanismo de entrecruzamiento determina el comportamiento del material, las redes duales integran dos sistemas de reticulación que pueden diferir tanto en su naturaleza química como en su respuesta frente a estímulos externos. Dependiendo del diseño del material, estas redes pueden formarse mediante enlaces covalentes permanentes, enlaces covalentes dinámicos, interacciones supramoleculares o mecanismos de coordinación metal-ligando, generando una estructura jerárquica en la que cada red contribuye de manera específica a las propiedades finales del hidrogel.

(Figura 8)

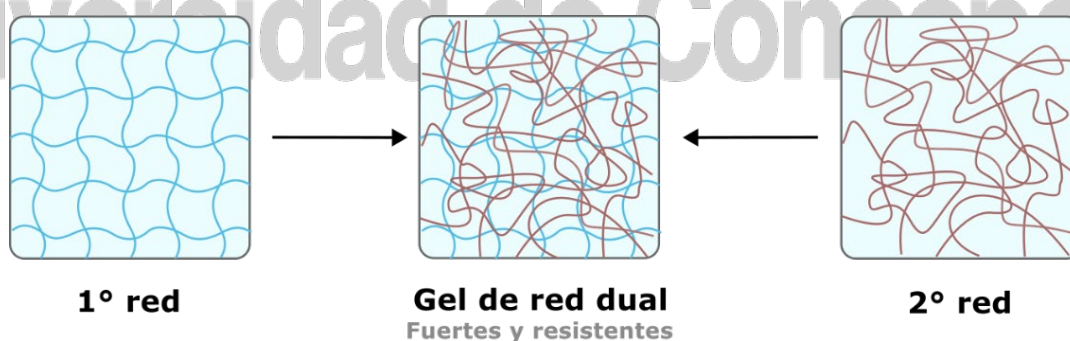


Figura 8: Diagrama de formación de redes duales.

1.5. Enlaces covalentes dinámicos

Los enlaces covalentes dinámico (ECD) son causados por interacciones fuertes, enlaces covalentes, que frente a un estímulo o en condiciones adecuadas se alcanza el equilibrio entre la formación y ruptura del enlace³⁰⁻³³, lo que otorga dinamismo y la

capacidad de ser usados como mecanismo de autorreparación ya que permiten la reorganización de las cadenas de polímero. A diferencia de las interacciones no covalentes, la naturaleza covalente de los ECD proporciona materiales con mejor estabilidad y menos fluencia. Entre los ECD más estudiados están los enlaces disulfuros, formación de iminas, ester de boronato³⁴, Diels Alder³⁵ y enlaces de coordinación³⁶⁻³⁹ (**Figura 9**). Algunas de las condiciones para que ocurra el dinamismo son la temperatura, pH, estrés mecánico⁴⁰ o luz^{39, 41-43}.

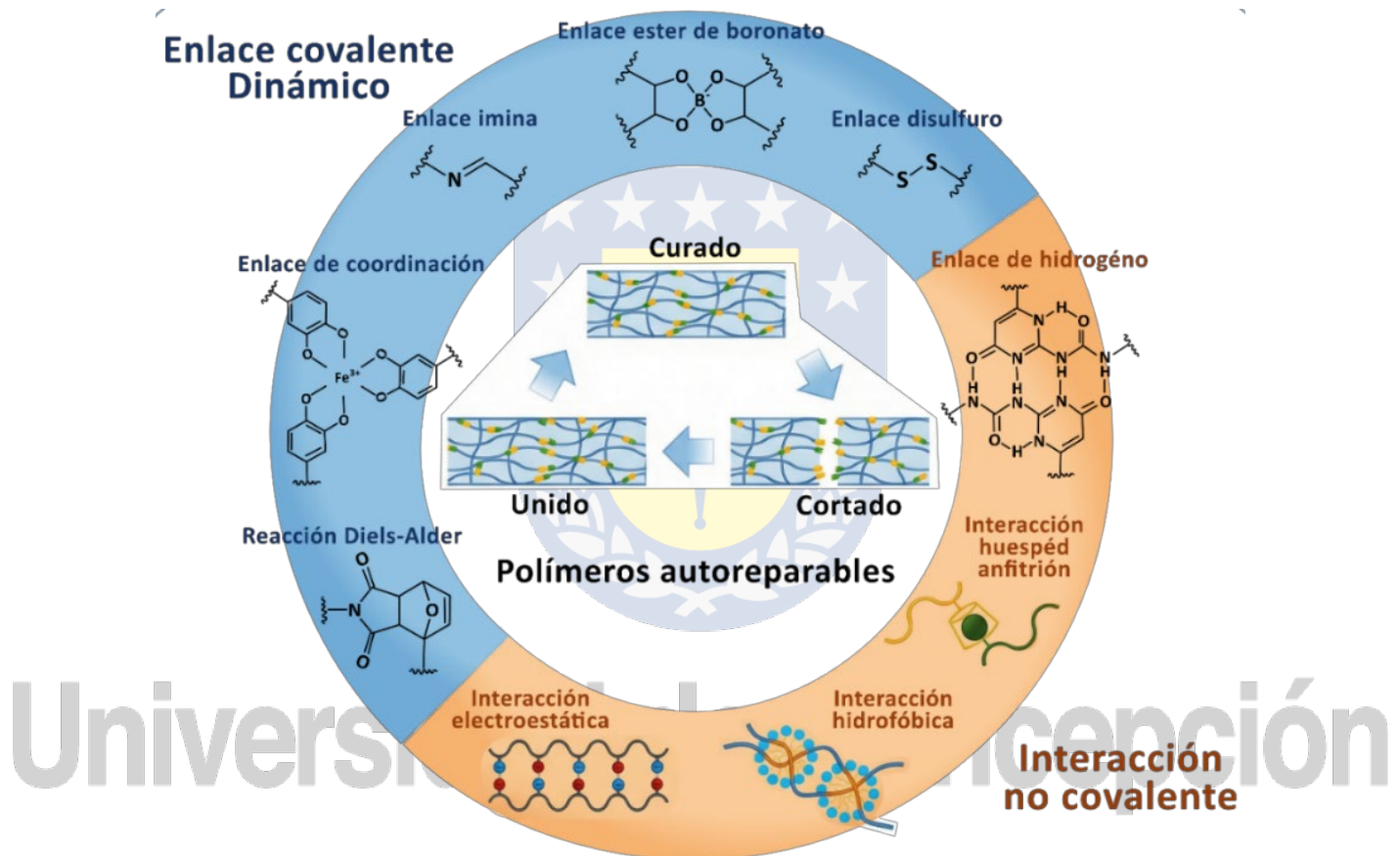


Figura 9: Mecanismos de autorreparación basados en enlaces covalentes dinámicos e interacciones no covalentes.⁴⁴

Los enlaces covalentes dinámicos también se han utilizado en el diseño de materiales poliméricos, como los hidrogeles, donde la formación y ruptura de ECD permiten la autorreparación y la respuesta a estímulos externos⁴⁵⁻⁴⁷.

Los procesos moleculares, que dan origen a la capacidad de autorreparación de los hidrogeles, se encuentran los enlaces covalentes dinámicos y las interacciones no covalentes dinámicas^{48, 49}, que pueden ser autónomos o estimulados dependiendo si es necesario o no un estímulo. Al romper enlaces, se difunden reactivos que permiten un reordenamiento de las especies que interactúan y, por consiguiente, la reparación.

Las interacciones no covalentes ocurren por medio de interacciones físicas tales como los enlaces de hidrógeno, interacciones *host-guest*⁵⁰, interacciones hidrofóbicas⁵¹ e interacciones electroestáticas⁵².

Dependiendo de la naturaleza del enlaces y las condiciones en las que se encuentran es posible los ECD posean distintas velocidades, las cuales se eligen dependiendo de cuál sea el objetivo del material, hay casos en los cuales se desea un material más fluido para ser inyectable pero que a su vez tenga la capacidad de autorrepararse con tiempos de dinamismo más cortos, también hay casos en donde se quiere un material más firme (rígido) en donde se quiere que tenga tiempos de dinamismo más largos³³

1.5.1. Clasificación según estímulo

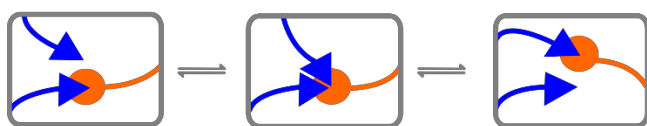
Existen dos tipos de mecanismos de autorreparación: extrínsecos e intrínsecos¹. Los mecanismos extrínsecos o no autónomos son lo que necesitan de un agente autorreparante, por ejemplo, la incorporación de microcápsulas con solución precursora para la formación del material⁵³, o de un estímulo externo para que se genere la autorreparación, algunos de los estímulos pueden ser temperatura, radiación, cambios de pH, etc. Por otro lado, los mecanismos intrínsecos autorreparación ocurren sin necesidad de un estímulo externo, por ejemplo, a temperatura ambiente o solo por contacto.

1.5.2. Clasificación según mecanismo

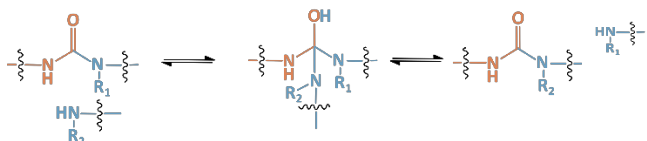
La clasificación de las redes covalentes adaptables se basa en el mecanismo de reversibilidad de la reacción dinámica. Las dos variaciones mecanicistas más comunes de los ECD reversibles se clasifican según el mecanismo de acción del intercambio. Estos son los reordenamientos de adición reversible (químicas disociativas) y los reordenamientos de intercambio reversible (químicos asociativos)(**Figura 10**). Aunque esta clasificación abarca la mayoría de los ECD, considerando la gran cantidad de posibles reacciones de intercambio y procesos catalíticos propuestos, varias ECD operan mediante mecanismos híbridos o mixtos, siendo el mecanismo real dependiente de las condiciones y el estímulo por el cual se activa la ECD.

Asociativo

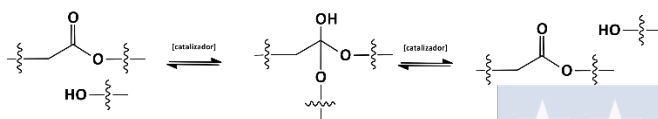
Esquema de intercambio reversible $AB + B \rightleftharpoons AB + B$



Mecanismo hipotético de urea-amina por intercambio reversible

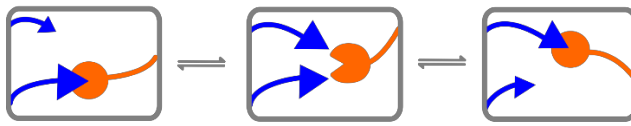


Ejemplo: Reacción de transesterificación

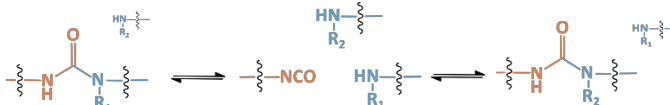


Disociativo

Esquema de adición reversible $A + B \rightleftharpoons AB$



Mecanismo hipotético de disociación de urea por adición reversible



Ejemplo: Reacción de Diels-Alder

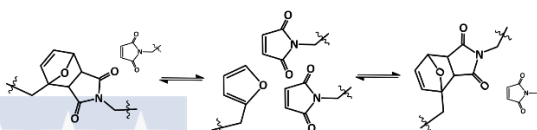


Figura 10: Esquema de mecanismos para ECD reversibles³⁹.

1.5.3. Enlace disulfuro

Los enlaces disulfuro(-S-S-) también son una clase prometedora de enlaces covalentes dinámicos gracias a su alta capacidad de respuesta a varios estímulos externos (**Figura 11**). Los enlaces disulfuro pueden reorganizarse mediante mecanismos de intercambio activados por estímulos químicos, físicos o biológicos, permitiendo que la red polimérica modifique su arquitectura sin perder su integridad estructural. Esta característica ha convertido a los disulfuros en una herramienta de gran interés para el desarrollo de materiales adaptativos capaces de responder a cambios en su entorno^{40, 54, 55}.

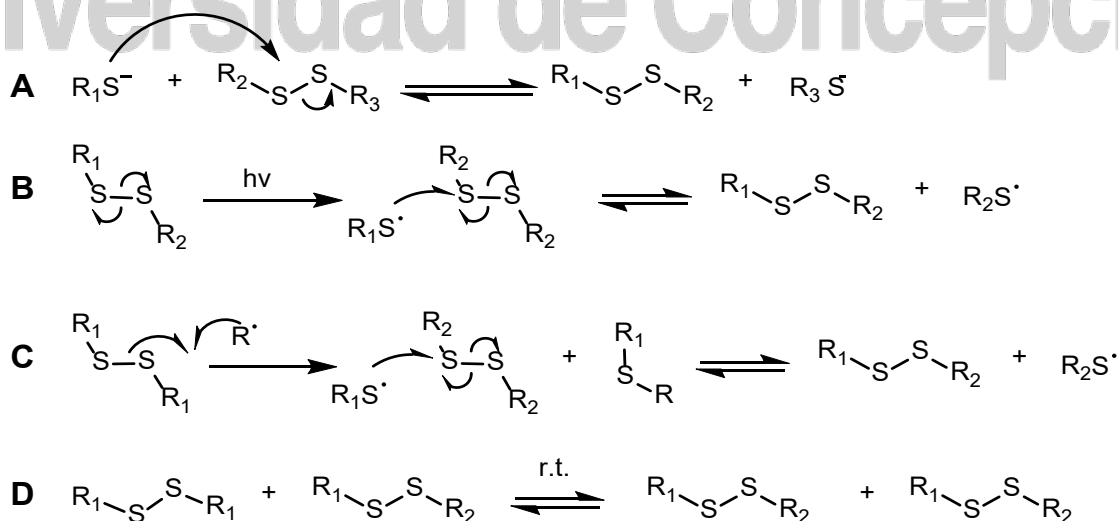


Figura 11: Distintos mecanismos para el intercambio disulfuro⁵⁶.

Los 1,2-ditiolanos, una subclase de disulfuros cíclicos presentes de forma natural en moléculas como el ácido α -lipoico (ácido tióctico), han emergido recientemente como una estrategia versátil para el diseño de redes poliméricas dinámicas⁵⁷. A diferencia de los disulfuros lineales, el anillo de cinco miembros de los 1,2-ditiolanos presenta una elevada tensión conformacional, lo que disminuye la estabilidad del enlace S–S y favorece su apertura mediante estímulos relativamente suaves, incluyendo irradiación luminosa, temperatura, agentes nucleofílicos o procesos redox. La apertura reversible del anillo (ROP) genera especies disulfuro reactivas capaces de reorganizar continuamente la arquitectura de la red polimérica, proporcionando materiales con capacidad de autoorganización, reconfiguración estructural y reciclabilidad química^{58, 59}, lo que posiciona este enlace covalente dinámico como una opción para la fabricación de hidrogeles dinámicos.^{60, 61}

Para los hidrogeles, esta química ha adquirido especial relevancia debido a que permite incorporar enlaces dinámicos directamente durante la formación de la red, sin recurrir necesariamente a reacciones de intercambio posteriores. Tras la apertura del anillo del ditiolano, los enlaces disulfuro formados permanecen dinámicos y pueden experimentar reacciones reversibles de intercambio tiol-disulfuro o metástasis de disulfuros bajo condiciones fisiológicas, confiriendo al hidrogel propiedades viscoelásticas, relajación de tensiones, capacidad de autorreparación y adaptación mecánica frente a estímulos externos⁶² (**Figura 12**). Estas características resultan particularmente atractivas para aplicaciones en ingeniería de tejidos, donde la matriz extracelular presenta un comportamiento dinámico y remodelable que es difícil reproducir mediante redes covalentes permanentes⁶³

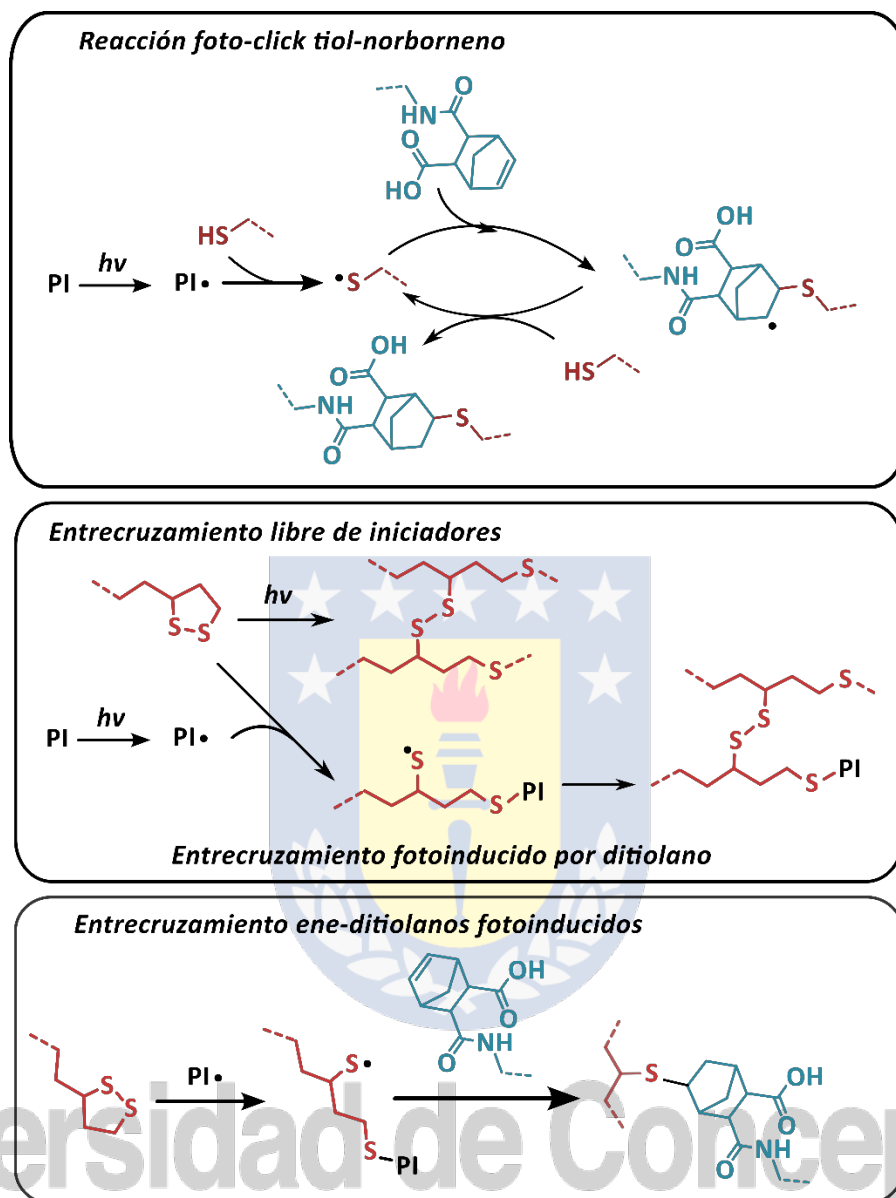


Figura 12: Reacción de fotoclick tiol-norborneno, entrecruzamiento de ditiolano sin iniciador e inducido por fotoiniciador, entrecruzamiento ditiolano-norborneno inducido por fotoiniciador (PI, fotoiniciador).⁶⁴

1.6. Propuesta

Dentro del contexto de la ingeniería de tejido y los materiales comúnmente usados junto con todos los antecedentes descritos, se plantea el diseño y obtención de un hidrogel compuesto con capacidad de autorreparación que ayude a la protección y recuperación de tejido teniendo en cuenta las propiedades específicas de la piel, tales como, mecánicas (módulo), fisicoquímicas (pH, temperatura), entre otras (**Tabla 1**). La preparación del hidrogel compuesto estará constituida por 2 tipos de gelatina. Este biopolímero se modificará con anhídrido metacrílico para su posterior polimerización y obtención de una red estable. También, se modificará con ácido lipoico o ácido tióctico (TA) para la obtención de una red dinámica capaz de autorrepararse.

1.7. Gelatina

La gelatina es un polímero de origen natural compuesto por una mezcla heterogénea de péptidos provenientes del colágeno⁶⁵, es decir es un polipéptido de alto peso molecular que es soluble en agua⁶⁶.

Dependiendo del origen de la gelatina, que puede ser bovino, porcino, avícola o desde peces, puede presentar distintas propiedades tales como antioxidante, proliferación celular, actividad en la inhibición enzimática, anticancerígena, entre otras⁶⁵. Por lo cual también se emplea para distintos usos, como cosméticos, alimentos, la industria farmacéutica, hidrogeles, nanofibras y andamios⁶⁷. Una de las formas más utilizadas de la gelatina en la ingeniería de tejido es por medio de films⁶⁸ por ser descrita como un material novedoso por su fácil disposición, bajo costo, buena biocompatibilidad y excelente biodegradabilidad⁶⁹.

Se propone la modificación del biopolímero gelatina para la obtención de gelatina metacrilada (GelMA) por medio de la modificación con anhídrido metacrílico, el cual incorporará grupos metacrilatos a su estructura lo que permite la polimerización y formación de una red tridimensional con enlaces covalentes permanentes que brindan estabilidad mecánica al hidrogel compuesto⁷⁰.

Por otra parte, se plantea el uso de ECD para lograr incorporar la capacidad de autorreparación del hidrogel compuesto. Dentro de la variedad de ECD se encuentran los enlaces disulfuro, que se forman entre dos átomos de azufre y se observan

comúnmente en las proteínas, donde desempeñan un papel en la estabilización de su estructura.

1.8. Ácido tióctico o lipoico

Un compuesto que presenta enlace disulfuro es el ácido tióctico, el cual es utilizado ampliamente en apósitos médicos, adhesivos, material de respuesta de estímulo, recubrimientos anticorrosivos, materiales de autocuración, materiales ignífugos, entre otras⁷¹ (**Figura S1**). Estudios previos han reportado que el ácido tióctico (TA) puede estimular una serie de acciones celulares, como eliminador de especies reactivas de oxígeno (ROS), agente quelante para iones metálicos y factores antiinflamatorios⁷². Se ha demostrado que derivados del ácido tióctico funcionan como fotoreticulantes dinámicos, capaces de generar enlaces disulfuro bajo irradiación en condiciones fisiológicas y sin necesidad de iniciadores radicalarios convencionales⁶³.

Su origen biológico, elevada biocompatibilidad, facilidad de funcionalización mediante el grupo carboxilo del ácido tióctico (**Figura 13**) y la posibilidad de combinar enlaces disulfuro dinámicos con otros mecanismos de reticulación covalente permiten diseñar hidrogeles de red dual con propiedades mecánicas ajustables, capacidad de autorreparación y comportamiento biomimético, aspectos esenciales para aplicaciones avanzadas en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa⁷³.

En conocimiento las propiedades del ácido tióctico se plantea la modificación de la gelatina con (GelTA) para la incorporación de enlaces disulfuro y su posterior participación en los enlaces covalentes dinámicos a los cuales se les atribuye la capacidad de autorreparación, además de presentar la capacidad de aportar radicales con capacidad de desencadenar la polimerización.

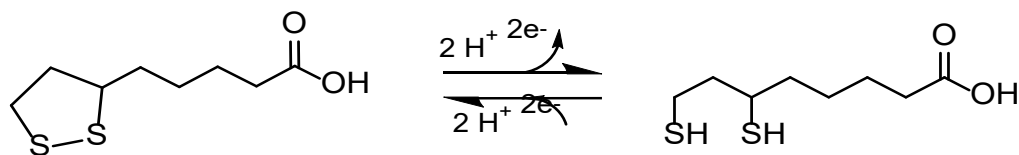


Figura 13: Estructura del ácido tióctico (TA)

1.9. Formación de red dual

Para poder llegar a las características deseadas y aportar nuevas características al material se opta por una red dual, en donde la primera red, entrecruzada de forma

covalente será en base a GelMA. La segunda red, menos entrecruzada se agrega por medio de GelTA y los enlaces disulfuros que tiene presentes en el anillo ditiolano, el cual también puede actuar como portador de radicales

Bajo irradiación lumínica, el enlace disulfuro del anillo puede experimentar una apertura homolítica, originando radicales en el azufre altamente reactivos. Estas especies radicalarias reaccionan posteriormente con otros radicales o con grupos ditiolano vecinos, dando lugar a la formación espontánea de nuevos enlaces disulfuro intermoleculares y, en consecuencia, a una red polimérica dinámicamente entrecruzada. Este mecanismo permite que la formación de la red basada en disulfuros ocurra simultáneamente con otros procesos de fotopolimerización, posibilitando el diseño de hidrogeles de red dual. En estos sistemas, una primera red covalente permanente se establece mediante la polimerización radicalaria de grupos vinílicos, mientras que la segunda red se origina a partir de la reorganización fotoinducida de los grupos 1,2-ditiolano. Debido a la naturaleza reversible de los enlaces disulfuro recién formados, esta segunda red conserva la capacidad de experimentar reacciones dinámicas de intercambio, otorgando al material propiedades de autorreparación, relajación de tensiones, remodelación estructural y adaptación mecánica⁷⁴.

1.10. Refuerzo por la incorporación de Cu(II)

La combinación de la doble red con la incorporación de Cu(II) por interacciones de coordinación metal-ligando representa una estrategia eficaz para desarrollar hidrogeles con propiedades mecánicas superiores. En estos sistemas los enlaces de coordinación actúan como enlaces de sacrificio, rompiéndose preferentemente bajo deformación para disipar energía y restableciéndose posteriormente una vez eliminada la carga mecánica. Este comportamiento permite mejorar simultáneamente la rigidez, la tenacidad y la durabilidad del material.

Además del refuerzo mecánico, el ion Cu(II), incorpora propiedades antibacterianas al hidrogel ya que los iones dañan la membrana y dañan la célula, induciendo una respuesta al estrés oxidativo⁷⁵.

2. HIPÓTESIS

La interacción de los enlaces covalentes dinámicos del hidrogel aportadas por GelTA entre las cadenas del biopolímero modificado promoverá la autorreparación del material. La cual se verá mejorada por la adición de los iones para un entrecruzamiento físico, además de incorporar propiedades antibacterianas al material.

3. OBJETIVOS DE TRABAJO

3.1. OBJETIVO GENERAL

1. Diseñar, sintetizar y preparar un hidrogel, a base de gelatina modificada que forman enlaces covalentes dinámicos otorgando capacidad de autorreparación y Cu(II) que aporta propiedades antibacterianas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener gelatina modificada con anhídrido metacrílico y ácido tióctico (GelMA/GelTA) y caracterizada por técnicas espectroscópicas.
2. Preparar hidrogeles compuestos de GelMA/GelTA/Cu y estudiar sus propiedades de absorción de agua, mecánicas, viscoelásticas.
3. Evaluar las propiedades de autorreparación de los hidrogeles compuestos a través de ensayos mecánicos y de estría de distintas formulaciones.
4. Evaluar las propiedades antimicrobianas del material por medio de pruebas de difusión en disco y evaluar la capacidad de crecimiento celular por medio de viabilidad y crecimiento celular.

4. METODOLOGÍA

4.1. Síntesis de gelatinas modificadas

4.1.1. Síntesis gelatina metacrilada (GelMA)

La síntesis de la gelatina metacrilada se realizó siguiendo el protocolo reportado por Loessner *et.al.*^{76,77}. El protocolo experimental consistió en disolver 30,00 g de gelatina en 300 mL de agua desionizada ultrapura (solución 10% m/v) y calentar la mezcla en un baño de agua a 60 °C hasta su completa disolución. Luego con agitación vigorosa se agrega gota a gota el anhídrido de metacrilato (MAA) según la relación de 0,60 g (3,89 mmol) de anhídrido por 1,00 g de gelatina, es decir, 18,00g para un alto grado de funcionalización (HF) o 0,06 g (0,389 mmol) de anhídrido por 1,00 g de gelatina, es decir, 1,80g para un bajo grado de funcionalización (LF). La disolución se agita vigorosamente por 60 min durante los cuales la mezcla se vuelve oscura y se debe continuar por 3 horas hasta que se vuelva clara y homogénea. Después de este periodo de reacción, se transfirió la solución a tubos de 50 mL, centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos (se encuentra como un precipitado blanquecino). Luego, se diluye el sobrenadante de la solución en 2 volúmenes de agua desmineralizada ultrapura previamente calentada a 40°C. Posteriormente, la gelatina metacrilada (GelMA) se dializa a 40°C por 5 días (cut-off 14 kDa) contra agua desionizada. Se ajusta el pH de la solución de GelMA a 7.4 usando NaHCO_3 y finalmente se liofiliza.

4.1.2. Síntesis gelatina modificada con ácido tióctico (GelTA).

La síntesis de la gelatina modificada con ácido tióctico se realizó siguiendo el protocolo reportado por Jiangtao *et.al.*⁷⁸ La síntesis empieza con la disolución de 260 mg (1,26 mmol) de ácido lipoico o tióctico (TA) en 20 mL de etanol al 60% en agua, ajustar el pH de la solución a 5,9-6,0 con una solución acuosa de NaOH 1 mol/L, agregar 310 mg (1,62 mmol) de EDC y 200 mg (1,74 mmol) de NHS y calentar la mezcla en un baño de agua a 37°C por 30 min. Paralelamente se prepara una solución de gelatina, disolviendo 250 mg en 30 mL de EtOH al 60 % hasta completa disolución. Luego, con agitación vigorosa, se agrega lentamente la solución de gelatina sobre la solución de ácido tióctico y se deja reaccionar por 16 h a 37 °C en oscuridad. Después, se precipita el producto agregando EtOH (por cada 20 mL de solución se agregan 25 mL de EtOH), se transfiere la solución en tubos de 50 mL y se centrifuga a 4000 rpm por 10 min para

separar el precipitado. Luego, se enjuaga el precipitado 3 veces con alícuotas de 5 mL de EtOH y luego con 5 mL de agua. Posteriormente, la gelatina modificada con ácido tióctico (GelTA) se solubiliza en 10 mL de agua a 30 °C y finalmente se liofiliza por 24 h a -40 °C y 0,0001 bar.

4.2. Preparación de hidrogeles.

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron soluciones de GelMA y GelTA en distintas proporciones, obteniendo al final en todos los casos una concentración total de 5.0 %m/v de gelatina. También se adiciona el fotoiniciador IRGACURE 2959 (IG) a una concentración de 0,5%_{m/v} de solución. Para cada una de las muestras de disponen las masas de gelatina e iniciador correspondientes en tubos Falcon de 15 mL, se agregan 3 mL de agua, se agitan y se calientan a 37 °C hasta completa disolución. Luego, las soluciones se disponen en un molde de teflón para fotopolimerizar a 365 nm por 5 min a una distancia de 7 cm de la lámpara (UV-Crosslinker CL-1000, AnalytikJena); las muestras son cubiertas con un portaobjetos de vidrio tratado con silano. Una vez obtenidos, los hidrogeles fueron desmoldados y sumergidos en 2 mL de una solución de CuCl₂·2H₂O 0,5 mol/L por 48 h a temperatura ambiente.

Tabla 2: Composiciones de las mezclas de GelMA/GelTA en los hidrogeles

GelMA/GelTA	GelMA %m/v	GelTA %m/v	Acrónimo
3:1	3,75	1,25	MA ₃ TA ₁
2:1	3,33	1,66	MA ₂ TA ₁
1:1	2,5	2,5	MA ₁ TA ₁
1:2	1,66	3,33	MA ₁ TA ₂
1:3	1,25	3,75	MA ₁ TA ₃
-	5	-	GelMA
-	-	5	GelTA



Ilustración 1: Diagrama preparación hidrogel.

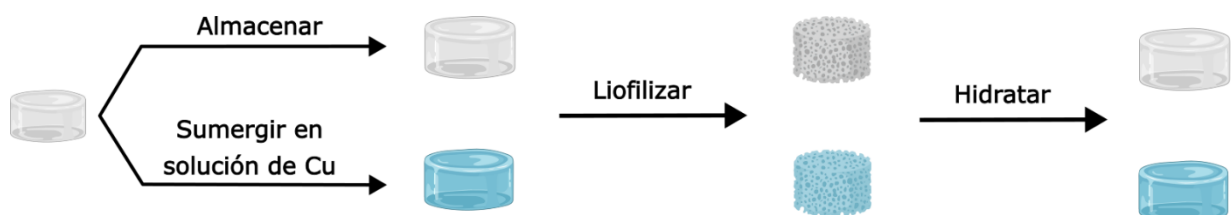


Ilustración 2: Procedimiento para agregar Cu(II) a los hidrogeles y preparación para distintos análisis.

4.3. Caracterización fisicoquímica.

4.3.1. Espectroscopía infrarroja:

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada en estado sólido sin preparación adicional (ATR-FTIR). Se realizó en un espectrómetro Jasco FT/IR-4X en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y un promedio de 32 escaneos por muestra.

4.3.2. Resonancia Magnética Nuclear:

Se adquirieron espectros de RMN ^1H en estado de solución para caracterizar la síntesis de las gelatinas modificadas y determinar su grado de funcionalización (DoF), sus precursores (en D_2O) y el ácido tióctico (TA) (en MeOD). Todas las mediciones se realizaron utilizando un espectrómetro Bruker Avance III HD de 400 MHz. La determinación de DoF para GelMA y GelTA se llevó a cabo a través del seguimiento de los grupos $-\text{NH}_2$ de la lisina. Utilizando el área bajo la curva de la señal del protón del metileno en la lisina (3 ppm) y la **ecuación 1**.

$$\text{DoF} = \left(1 - \frac{\text{proton lisina en GelMA}}{\text{proton lisina en gelatina}}\right) \times 100\% \quad \text{Ecuación 1}$$

4.3.3. Fluorescencia:

Mediante un método de fluorescencia se confirmó la determinación de DoF obtenida por RMN. El método consiste en marcar los grupos NH_2 de la gelatina modificada con fluraldehído ^{76 77}(Figura S2). Luego se relaciona la intensidad de la fluorescencia con

la cantidad de grupos aminos en la gelatina y se determina el DoF a través de la **ecuación 2**. El protocolo experimental consistió, primero, en construir una curva de calibración con gelatina sin modificar (0,02 - 0,4 mg/mL) a $\lambda_{ex} = 360$ nm. Las medidas fueron realizadas en un equipo de fluorescencia (Fluorometer, Photon Technology International Inc. QuantaMaster). Con la curva de calibración de intensidad fluorescencia a 430 nm vs. concentración de gelatina se analizaron las muestras de GelMA y GelTA y se determinó la intensidad de fluorescencia de la muestra correspondiente a una concentración de gelatina de X mg/ml en la curva de calibración y la concentración residual de amina, en donde se reemplazan los valores obtenidos en la siguiente ecuación para obtener el grado de funcionalización.

$$DoF = \left(\frac{0.5 - X}{0.5} \right) \times 100\% \quad \text{Ecuación 2}$$

4.3.4. Espectroscopía de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP):

Esta técnica se utilizó para determinar la concentración de Cu absorbido en los hidrogeles. Se utilizó una curva de calibración (rango entre 5 y 50 mg/L) a 324 nm con un patrón de Cu. Los hidrogeles son sumergidos en 2 mL de soluciones de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ por 2 días. Posterior a este periodo, se toman alícuotas de 20 μ L del sobrenadante y una alícuota de la solución inicial, se mide y, por diferencia entre el total de la solución inicial y la solución luego de contactar con el hidrogel se calcula la cantidad en el hidrogel.

Por otro lado, también se determina la cantidad de Cu(II) liberada por los hidrogeles, en donde cada uno de los geles previamente sumergidos en la solución de Cu(II) es sumergido en 2 mL de agua desionizada por 2 días a temperatura ambiente, para luego medir la cantidad de Cu(II) liberada al sobrenadante y se mide el sobrenadante por medio de ICP.

4.3.5. Espectroscopia UV-Vis:

La absorción de Cu(II) por los hidrogeles se determinó mediante colorimetría UV-visible en lectores de microplacas BioTek (lector multimodo Synergy H1) y utilizando una curva de calibración de absorción de estándares de Cu(II) (0,006 y 0,1 mol/L) a 815 nm. Se realizó un análisis sobre 20 μ L de alícuotas de la solución de 2,00 ml de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ antes y después de la inmersión de los hidrogeles. La cantidad de Cu(II) en el hidrogel se calculó por la diferencia entre la cantidad en la solución inicial y la

cantidad restante en la solución tras el contacto con el hidrogel. Para poder realizar el cálculo por la cantidad de masa es necesario masar cada uno de los hidrogeles para luego obtener el resultado de moles absorbidos por gramos de hidrogel.

4.3.6. Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersa (EDS):

Para el estudio de la superficie y morfología de los hidrogeles se analizará a través de SEM (JEOL JSM-6380LV, Japón 2004), además se realizó un análisis elemental y un mapeo de la superficie a través de EDS (Oxford Instrument x-maxn 2019) para conocer la distribución de los elementos asociados a cada superficie.

4.3.7. Análisis termogravimétrico:

Las propiedades térmicas de los hidrogeles se estudiaron mediante análisis termogravimétrico con un modelo Netzsch 209 FI IRIS, una tasa de calentamiento de 10 °C·min⁻¹ desde temperatura ambiente hasta 550°C, una atmósfera de N₂ y crisoles de aluminio.

4.3.8. Capacidad de absorción de agua (swelling):

Para determinar la capacidad máxima de retención de agua en el hidrogel. El hinchamiento de los hidrogeles se lleva a cabo masando la cantidad de agua. Inicialmente son sintetizados y secados por liofilización y masados; luego, se dejan en contacto con 5 mL de agua desionizada y se dejan por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este periodo, son masados nuevamente, secando con papel de lavado para eliminar el exceso de agua en la superficie. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Por medio de la **ecuación 3** se pueden determinar los gramos de agua absorbidos por gramos de hidrogel.

$$Swelling = \left(\frac{m_{hidratado} - m_{seco}}{m_{seco}} \right) \quad \text{Ecuación 3}$$

4.3.9. Fotorreología:

Mediante un reómetro de platos paralelos (MCR 702e, Anton Paar) equipado con una fuente de luz UV (rango entre 320 y 550 nm) (Omnicure S1500, Excelitas Technologies) que permitió estudiar el cambio de rigidez del hidrogel simultáneamente con la aplicación de radiación UV en intervalos. Primero se realizó un periodo sin radiación de aproximadamente 1 min, para luego irradiar por 5 min la muestra, seguido de 5

min sin radiación, y 5 min con radiación. Este análisis se realizó a 37 °C y humedad relativa de 60%.

4.3.10. Reometría:

Se realizaron mediciones reométricas con un reómetro DHR-3 e instrumentos TA. Se realizaron pruebas de deformación oscilatoria utilizando una geometría de placas paralelas de 8 mm, GAP de 1 mm, con deformación que iba del 0,01% al 1000%, para determinar la región y los módulos lineales de almacenamiento viscoelástico (G') y pérdida (G'') a 37°C. Las propiedades de autorreparación se estudiaron mediante un barrido temporal. Se realizaron pruebas de deformación oscilatoria utilizando una geometría de placas paralelas de 8 mm, con deformaciones del 1% y del 1000%.

4.3.11. Propiedades mecánicas:

Las propiedades mecánicas por compresión se midieron de forma uniaxial (EZ-Test, Shimadzu). Las probetas cilíndricas, de 8,0 mm de diámetro y 5,0 mm de altura, se probaron bajo compresión a 1 mm min⁻¹, celda de carga de 500 N, hasta alcanzar un desplazamiento total de 3,2 mm.

4.3.12. Densidad de entrecruzamiento:

Para la determinación de la densidad de entrecruzamiento se define un 10% de deformación con un barrido de frecuencias de 1 a 100% de frecuencia angular, con una geometría de platos paralelos 8mm, para la determinación de la densidad de entrecruzamiento. La densidad efectiva de reticulación (ν_e) de los hidrogeles se estimó a partir de mediciones reológicas utilizando la teoría de elasticidad del caucho. El módulo de almacenamiento (G') se obtuvo a partir de pruebas de barrido de frecuencia dentro de la región viscoelástica lineal, y la densidad de reticulación se calculó de seguido:

$$\nu_e = \frac{G'}{RT} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde R es la constante universal del gas y T es la temperatura absoluta. La reometría no mide directamente enlaces químicos, sino la respuesta elástica de la red, por lo que el parámetro obtenido corresponde a una densidad efectiva de entrecruzamiento. Los cálculos se realizan a una frecuencia angular de 10 rad/s, en la

que se comparan los módulos de almacenamiento de cada una de las mezclas, y el análisis se realiza a 37°C

4.3.13. Citotoxicidad:

La citotoxicidad de material se evalúa por medio de 2 metodologías

4.3.13.1. Lixiviado de cada uno de los geles con y sin Cu(II) (Línea celular fibrocitos)

Las formulaciones de hidrogeles MAXTay se pre incubaron en PBS durante 24, 48 y 72 horas antes de ser utilizadas sobre células. Las células de fibroblastos dérmicos humanos (HDF, ATCC) se sembraron a una densidad celular de 1×10^4 células en placas de 96 pozos. Tras 24 horas de cultivo, se expusieron a medios pre condicionados con PBS en diferentes proporciones de dilución, asumiendo una liberación máxima de Cu(II) de 100 μ M. La actividad metabólica del cultivo se evaluó utilizando AlamarBlue® (Thermofisher). Se añadió una solución de AlamarBlue® al 10% al cultivo y se incubó durante 3 horas a 37 °C (5% de CO₂, humedad). El cambio de fluorescencia sobrenadante se determinó mediante un lector de placas (λ_{ex} 545 nm, λ_{em} 590 nm).

El contenido de ADN se determinó mediante el ensayo® Picogreen (Thermo Fisher). Brevemente, se añadió un volumen conocido de agua Milli-Q al cultivo celular tras la medición con azul de Alamar, seguido de almacenamiento de muestras a -80°C. Las muestras fueron sometidas a al menos tres ciclos de congelación y descongelación. El ensayo con Picogreen se realizó siguiendo el protocolo del fabricante (PG, Thermo Fisher). Se calculó la relación de actividad metabólica por contenido de dsDNA. Ambos análisis se realizaron al menos en triplicado.⁷⁹

4.3.13.2. Kit de citotoxicidad LDH (Línea celular SK-1)

El Kit de Ensayo de Citotoxicidad LDH™ CyQUANT de Invitrogen™ proporciona los reactivos necesarios para un método colorimétrico sencillo y fiable que cuantifique la citotoxicidad celular. El kit puede utilizarse con diferentes tipos celulares de mamíferos, incluidos modelos 3D, para medir la citotoxicidad mediada por compuestos químicos y para analizar la citotoxicidad mediada por células. Dado que la concentración de LDH en el medio es un indicador de citotoxicidad celular, el ensayo puede utilizarse para monitorizar la citotoxicidad de la misma muestra a lo largo del tiempo.

Para realizar el ensayo, se transfiere una alícuota del medio de cultivo celular a una nueva placa y se añade la mezcla de reacción del kit de ensayo de citotoxicidad LDH de CyQUANT™. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, los ensayos se detienen añadiendo la solución de término (solución stop) y luego se mide la absorbancia usando un lector de microplacas. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica presente en muchos tipos celulares diferentes y es un indicador bien definido y fiable de citotoxicidad. El daño a la membrana plasmática libera LDH en el medio de cultivo celular circundante. La LDH extracelular en el medio puede cuantificarse mediante una reacción enzimática acoplada en la que la LDH cataliza la conversión del lactato en piruvato mediante la reducción de NAD^+ a NADH. La oxidación de NADH por diáfora conduce a la reducción de una sal de tetrazolio (INT) a un producto formazano rojo que puede medirse espectrofotométricamente a 490 nm (**Figura 14**). El nivel de formación de formazan es directamente proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio, lo que indica citotoxicidad.

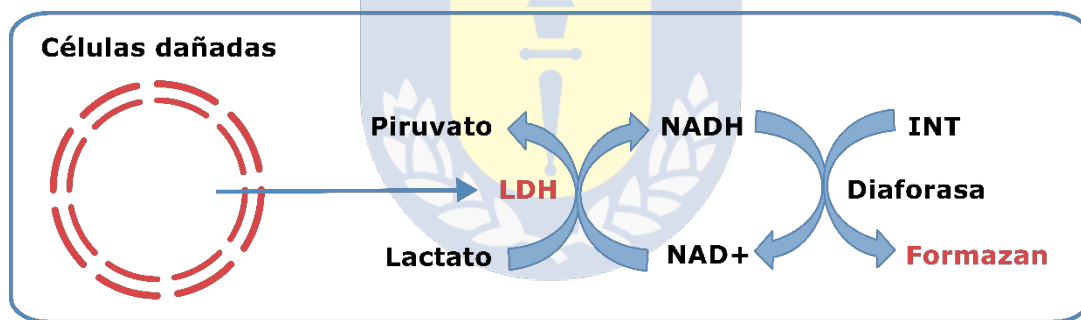


Figura 14: Esquema de mecanismo de LDH

4.3.14. **Propiedades antibacterianas:**

E.coli y *S.epidermidis* se utilizaron como cepas modelo para evaluar las propiedades antibacterianas de los hidrogeles. Los stocks congelados ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 % glicerol) se transfirieron a placas de agar de caldo de lisógena (LB) e incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Una sola colonia se inoculó en 5 mL de medio LB y se cultivó durante 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a 200 rpm^{80} . Coloca 150 μL del inóculo en una placa y extiéndelo uniformemente por toda la superficie, luego déjalo reposar durante cinco minutos. Luego coloca el disco que contiene la muestra encima e incuba en un horno a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas, midiendo los halos de inhibición.

4.3.15. **Determinación de aminoácidos:**

Para obtener valores en cantidades y no porcentajes se realiza la determinación de aminoácidos. Las muestras se sometieron a hidrólisis ácida con HCl 6 N durante 22 horas en condiciones de vacío. Los hidrolizados se analizaron en un analizador automático de la casa Biochrom, modelo Biochrom30. La separación de los aminoácidos se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico y la detección por reacción con ninhidrina postcolumna.

El análisis de aminoácidos consta de cuatro pasos:

1. Hidrólisis de la proteína (HCl 6 N, 110°C durante 20-24 horas)
2. Derivatización de los aminoácidos con un reactivo químico que permita su detección
3. Separación cromatográfica de los aminoácidos derivatizados
4. Interpretación de los resultados

Las muestras se depositan en tubos de borosilicato pirolizados y se llevan a sequedad en una speed vacuum. La hidrólisis se realiza a vacío, con HCl 6 N en fase gaseosa, conteniendo fenol al 1% (p/v), durante 20-24 horas a 110°C. Para calcular las posibles pérdidas se añade una cantidad conocida de norleucina como estándar interno. Tras la hidrólisis, el exceso de HCl se elimina en una speed vacuum. Posteriormente, los hidrolizados se resuspenden en tampón citrato sódico pH 2.2 y se pasan a viales de inyección.

El analizador Biochrom 30 utiliza la metodología clásica de análisis de aminoácidos basada en cromatografía de intercambio iónico y derivatización postcolumna con ninhidrina. Tras la separación cromatográfica, el derivado ninhidrina-aminoacídico eluido de la columna, conocido como púrpura de Ruhemann, se detecta por absorbancia a 570 y 440 nm (prolina). A partir del cromatograma resultante es posible establecer la identidad, proporción y cantidad de los aminoácidos que conforman la proteína hidrolizada. El límite de detección de la técnica es 10 pmol (50 pmol para la prolina). La derivatización con ninhidrina presenta la ventaja de ser bastante tolerante frente a la presencia de contaminantes en la muestra como pueden ser sales, urea o pequeñas cantidades de detergentes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Obtención y caracterización de gelatinas modificadas

Para la obtención de las gelatinas modificadas se considera que la gelatina es una mezcla heterogénea de aminoácidos de los cuales la lisina será el de mayor interés para la modificación, siendo el aminoácido en el que se lleva a cabo la amidación con anhídrido metacrílico y ácido tióctico. (**Figura 15**)

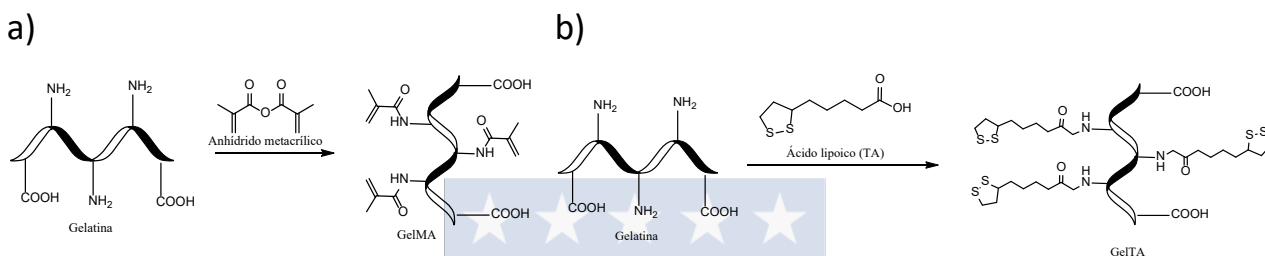


Figura 15: Síntesis de gelatinas modificadas.

5.1.1. Caracterización por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

En la **Figura 16a** se comparan los espectros infrarrojos obtenidos mediante el método ATR-FTIR de la gelatina y GelMA. Se observa la presencia de las bandas vibracionales asociadas a los grupos funcionales de acuerdo con la metacrilación de una parte de las funciones amina de la gelatina que resultan de la presencia de lisina, entonces, a 3275 cm^{-1} (OH , ν), 2936 cm^{-1} (C-H Csp^3 , ν), 1627 cm^{-1} (C=O (amida), ν), 1518 cm^{-1} (NH , δ). Mientras que para GelMA HF se presentan bandas muy parecidas en 3300 cm^{-1} (OH , ν), 2931 cm^{-1} (Csp^3 , ν), 3069 cm^{-1} (Csp^2 , ν), 1627 cm^{-1} (C=O (amida), ν), 1541 cm^{-1} (NH , δ). Así, la principal diferencia entre la gelatina y GelMA es la señal de 3072 cm^{-1} correspondiente a la vibración de C-H Csp^2 , además de las señales en $1635\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ que se asignan a las vibraciones de estiramiento del doble enlace C=C del grupo metacrilato, confirmando la incorporación de los grupos vinílicos.

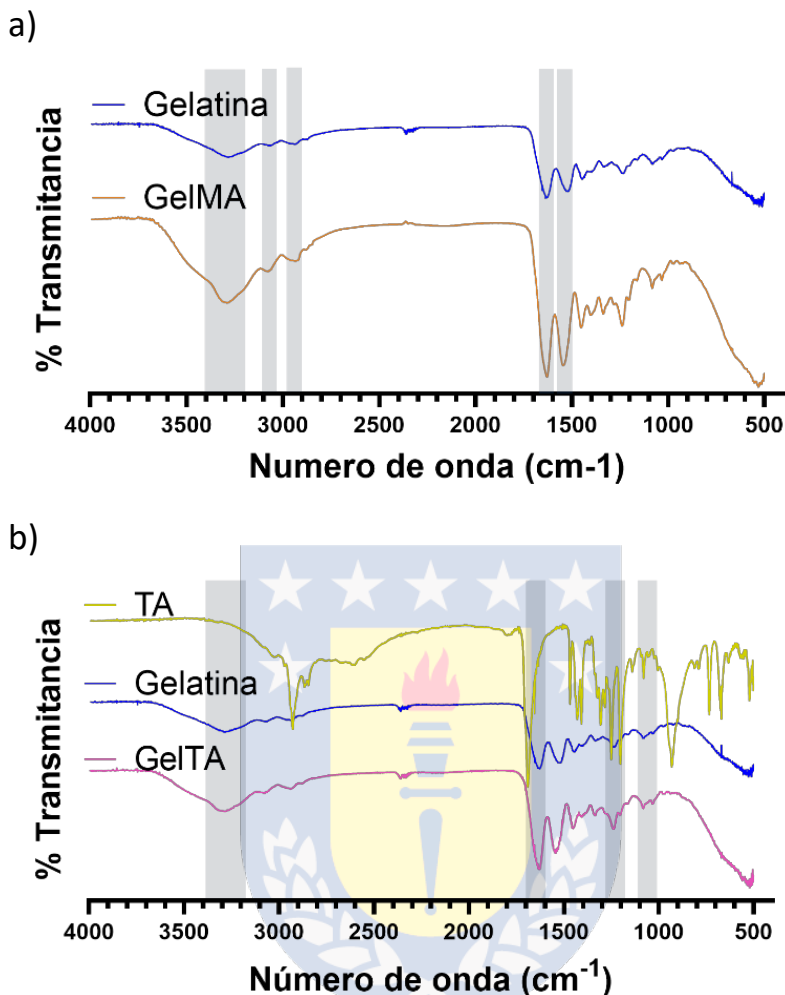


Figura 16: a) Espectro ATR-FT-IR comparación de gelatina y GelMA. b) Espectro ATR-FT-IR comparación de gelatina, ácido tióctico (TA) y GelTA.

En la **Figura 16b** se comparan los espectros FT-IR de la gelatina, ácido tióctico y GelTA. El espectro del ácido tióctico (TA) presenta bandas características en 2920 y 2850 cm^{-1} (C-H de grupos metileno, st), así como picos intensos en 1695 cm^{-1} (C=O del grupo carboxílico) y entre $1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ (C-S, v). En el espectro de GelTA, estas señales se conservan parcialmente, pero aparecen desplazadas e integradas con las bandas típicas de la gelatina, se encuentran las bandas de 1082 cm^{-1} (C-O, st), 1538 cm^{-1} (N-H), 3277 cm^{-1} (OH), 1236 cm^{-1} (S-CH₂)^{81, 82}, destacando una nueva señal en torno a 1730 cm^{-1} , correspondiente al grupo carbonilo del ácido tióctico, lo que confirma la formación de enlaces tipo amida entre la gelatina y el ácido tióctico.

Los resultados del análisis ATR-FT-IR confirman cualitativamente la modificación química de la gelatina, tanto mediante la metacrilación (GelMA) como por la

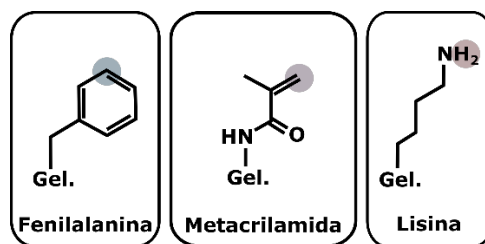
modificación con ácido tióctico (GelTA). sin embargo, para obtener una medición cuantitativa del injerto de estos ácidos, es necesario utilizar otra técnica, RMN.

5.1.2. Caracterización por ^1H -RMN

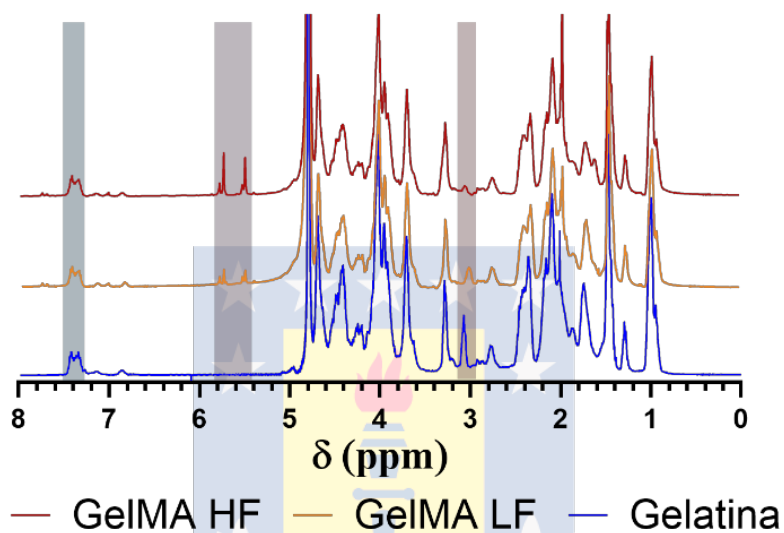
La caracterización de la estructura de las gelatinas modificadas (GelMA y GelTA) se realizó por medio de la asignación de las señales de interés, dado que la estructura de la gelatina ya es conocida y es una mezcla heterogénea de aminoácidos que muestra varias señales. En donde, para la GelMA se puede observar la aparición e incremento en la señal de los protones del grupo vinil metacrilato $\delta = 5,4$ y $5,7$ ppm y la disminución en la señal a $\delta = 2,9$ ppm asociada al protón del metileno en la lisina, lo cual confirma la modificación de la gelatina. Si suponemos que la señal de los aminoácidos aromáticos de la gelatina (fenilalanina), entre $\delta = 6,9$ y $7,5$ ppm, se mantiene constante en su intensidad, podemos utilizarlo como patrón interno para normalizar los espectros.

Del mismo modo, se calculó el grado de funcionalización para GelTA, comparando la disminución en la señal a $\delta = 2,9$ ppm (señal de protón del metileno en la lisina) lo que confirmó la modificación de la gelatina (**Figura 17**). Con el área bajo la curva asociada al protón del metileno de la lisina se realiza el cálculo del grado de funcionalización de cada una de las gelatinas modificadas asociado a la amidación de la lisina, en donde se obtuvo un grado de funcionalización de 64% para GelMA-HF, un 60% para GelMA-LF y un 59% para GelTA.

Universidad de Concepción



a)



b)

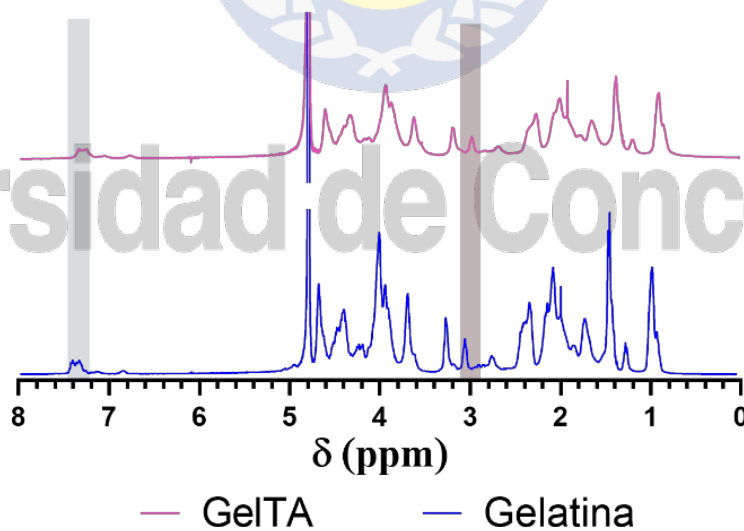


Figura 17: Análisis cuantitativo de ^1H -RMN a) gelatinas modificadas con anhídrido metacrílico (destacado en celeste se encuentra la señal asociada a la fenilalanina, metacrilatos y los protones asociados a la lisina) y b) modificación con ácido tióctico (destacado en celeste se encuentra la señal asociada a la fenilalanina y los protones asociados a la lisina).

5.1.3. Caracterización por fluorescencia

Con el fin de confirmar este grado de funcionalización, se utilizó un método alternativo basado en la fluorescencia⁷⁶. Este método consiste en marcar los grupos NH_2 de la gelatina modificada con un agente fluorescente llamado fluoraldehído, el cual es reactivo frente a este tipo de aminas. Se relaciona la intensidad de la fluorescencia con la cantidad de grupos aminos en la gelatina y por medio del cambio en la intensidad de fluorescencia se determina el grado de funcionalización de las gelatinas modificadas (**parte experimental**). El espectro de emisión muestra un corrimiento espectral hacia longitudes de onda mayores a medida que aumenta la concentración de grupos amino (**Figura 18a**), y se usó una longitud de onda de excitación a de 360 nm para fabricar la curva de calibrado, de acuerdo con el protocolo publicado anteriormente⁷⁶. El **Figura 18b** muestra la curva de calibración de intensidad de fluorescencia a 430 nm vs. concentración de gelatina. Finalmente se analizaron las muestras de GelMA y GelTA y se determinó la concentración (mg/L) por medio de la curva de calibración.

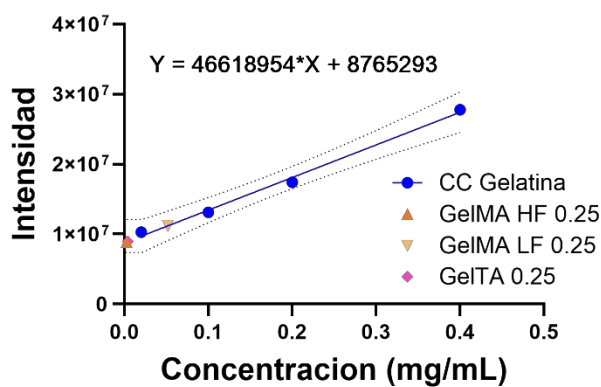
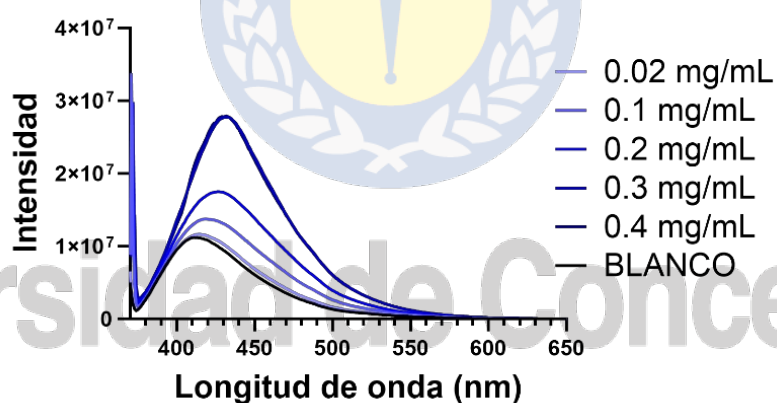


Figura 18: a) Espectros de fluorescencia de distintas concentraciones de gelatina mg/ml y b) Curva de calibración de fluorescencia.

Usando este protocolo se obtuvo el grado de funcionalización de las gelatinas modificadas; 68% para GelMA-HF y 60% para GelMA-LF. Estos grados de funcionalización son consistentes con los obtenidos a través de ^1H -RMN. Para GelTA se obtuvo un DoF de un 68%. Si bien el resultado se acerca al DoF obtenido por ^1H -RMN no presenta la misma concordancia obtenida para GelMA, lo que puede estar asociado a la baja solubilidad del GelTA en D_2O por lo cual se puede tener error al preparar la muestra ya que parte del sólido que es necesario no se logra solubilizar y se envía a analizar una concentración menor a la solicitada (20mg/600uL) (**Tabla 3**). Teniendo en consideración los resultados obtenidos se trabajará con un solo DoF para GelMA, de un 60%.

Tabla 3: DoF de gelatinas modificadas determinado por medio de ^1H -RMN y fluorescencia.

	DoF RMN	DoF Fluorescencia
GelMA HF	64%	68%
GelMA LF	60%	60%
GelTA	59%	68%

Luego de realizar la determinación de los porcentajes de modificación de cada una de las gelatinas y verificar por 2 métodos se desea obtener la cantidad de lisina que fue modificada, por lo cual se caracteriza la cantidad de aminoácidos presente en la gelatina, con ello ya se cuenta con una cantidad base de 2,6140 nmoles o 0,2305 ug de lisina, de la cual se logró la modificación de los distintos porcentajes obtenidos (**Tabla 4**)

Tabla 4: Calculo del DoF de gelatinas modificadas determinado por medio de RMN y fluorescencia en base a la determinación de aminoácidos.

	DoF RMN (nmoles)	DoF Fluorescencia (nmoles)
GelMA HF	1.673	1.778
GelMA LF	1.778	1.778
GelTA	1.542	1.778

Desde este punto se trabajará solo con un grado de funcionalización de GelMA, eligiendo el 60% por ser más concordante entre ambos análisis. Por otro lado, se seguirá trabajando con el mismo grado de funcionalización para GelTA.

5.2. Obtención y Caracterizaciones de los hidrogeles.

5.2.1. Preparación de hidrogeles.

Para la preparación de los hidrogeles se mezclaron los biopolímeros en distintas proporciones. Se trabajó con GelMA de DoF 60% y GelTA DoF 59%, y se prepararon las soluciones precursoras según la **Tabla 2 (metodología)**, y una disolución del fotoiniciador IRGACURE 2959 al 0,5% para entrecruzar la red.

Los hidrogeles se prepararon con y sin iniciador para evaluar cual es el efecto en la fotopolimerización radicalaria ya que el ácido tióctico es capaz de actuar como iniciador de radicales libres⁸³. Además de con (0,5 mol/L) y sin la presencia de Cu(II) para evaluar la existencia de un refuerzo mecánico además de la mejora de la incorporación o mejora de propiedades antibacterianas.

Los hidrogeles son preparados con geometrías de disco con un diámetro de 8 mm y una altura variable de 2 o 5 mm dependiendo del análisis que se realizará. Además, que luego de fotopolimerizar las distintas mezclas y obtener el disco, se sumergen en una solución de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mol/L por 2 días para asegurar absorción de Cu(II) y poder evaluar el efecto que tiene en los hidrogeles. **(Figura 19)**

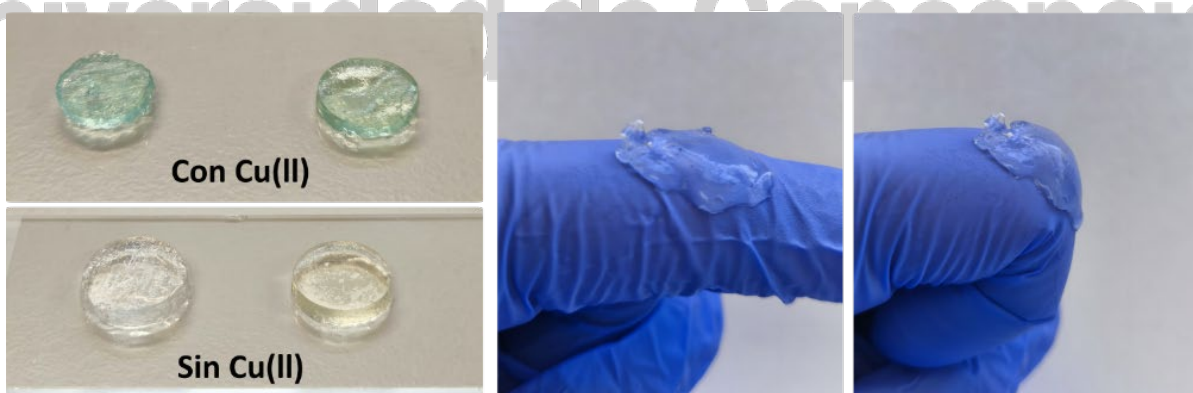


Figura 19: Imágenes de hidrogeles luego de fotopolimerizar y luego de ser sumergidos en Cu(II).

5.2.2. Efecto del Cu(II) en contacto con las gelatinas modificadas antes de su fotopolimerización.

Inicialmente, y de manera cualitativa, se estudiaron las gelatinas modificadas y sus mezclas para observar si experimentaban gelificación mediante la interacción con los iones Cu(II).

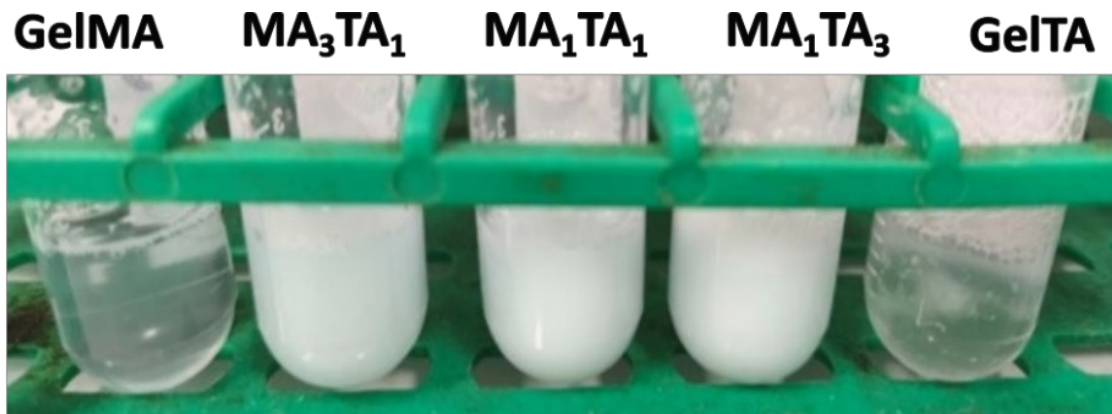


Figura 20: Prueba cualitativa de la adición de solución de CuCl₂.

En la **Figura 20** se observan lo que ocurre tras de la adición de unas gotas de solución de Cu(II) a soluciones de mezclas de gelatinas, GelMA y GelTA. Para las mezclas de GelMA/GelTA se observa un cambio en la homogeneidad desde una solución transparente a una solución blanquecina. En el caso de las muestras de GelTA se observa un precipitado, estas observaciones están de acuerdo con la coordinación, quizás con quelación, de Cu(II) por los azufres de un disulfuro como es conocido en la literatura⁸³⁻⁸⁵. Este fenómeno puede llegar al entrecruzamiento por la formación de un enlace de coordinación entre el Cu(II) y el puente disulfuro del ácido tióctico y causa la separación del polímero de la solución. Para GelMA se observa el cambio de coloración de la solución por la adición la solución de CuCl₂, aun así, no presenta ningún precipitado además de que la solución permanece líquida.

Estos experimentos también sugieren que la reacción del Cu(II) produce materiales inadecuados para las aplicaciones previstas. Para aprovechar la reactividad del Cu(II) con GelTA, incorporamos estos iones Cu²⁺ tras la fotopolimerización (con y sin iniciador) de los hidrogeles. Así, la incorporación del Cu(II) al hidrogel será obtenido mediante inmersión en una solución de Cu(II).

Esta prueba define que la forma de incorporación del Cu(II) se realizara por medio de inmersión en una solución, ya que no se es capaz de obtener soluciones homogéneas al incorporarlo antes de la fotopolimerización.

5.2.3. Determinación de Absorción y liberación de Cu(II) por Espectroscopía de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP)

Para la determinación de la cantidad de Cu(II) absorbido inicialmente por los hidrogeles fotopolimerizados se prueba con concentraciones de 0,4 y 0,05 mol/L ya que en literatura ya se han cargado hidrogeles por inmersión en distintas soluciones. Los hidrogeles son sumergidos en disoluciones de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 48 h para asegurar equilibrio de absorción de Cu(II), luego de este periodo se recupera el sobrenadante de cada una de las disoluciones el cual se cuantifica por medio de ICP. **(Figura 21)**

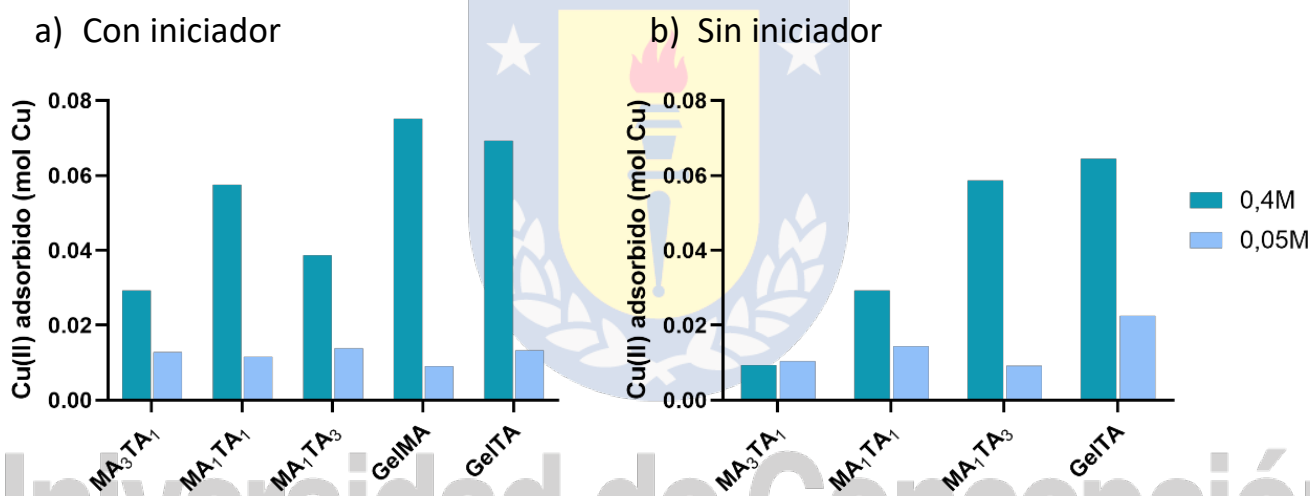


Figura 21: Cuantificación del contenido de Cu^{2+} en los hidrogeles fotopolimerizados con y sin iniciador por ICP. (Análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y $P < 0,05$, 0,1234 (ns), 0,0332(*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,001(***)).

Para la determinación de efecto de la concentración se obtuvieron los resultados de la **Figura 21**, en los cuales las muestras con y sin iniciador no presentan diferencias significativas entre las distintas formulaciones.

Al sumergir los hidrogeles en una solución de Cu^{2+} con iniciador todas las formulaciones muestran retención de Cu^{2+} en el hidrogel respecto a la fracción remanente en solución, con una tendencia dependiente de la composición. Los sistemas con mayores proporciones de GelTA presentan mayores valores de Cu^{2+} absorbidos en la matriz, especialmente en las muestras sin iniciador (**Figura 21b**). De

acuerdo con los previos experimentos la presencia de tioles favorece la coordinación de los iones Cu^{2+} . Sin embargo, se observa que los hidrogeles sin GelTA también absorben iones Cu^{2+} , ya sea por simple ósmosis o porque la gelatina inicial tiene funciones que pueden coordinar el Cu (II), en particular las funciones carboxilato y amina.

Si consideramos el efecto de la concentración, pasando de 0,4 a 0,05 mol/L, se observa una disminución global del contenido metálico en los hidrogeles, como era esperable por la menor disponibilidad de iones en el medio. La cuantificación de Cu(II) en los hidrogeles revela que la capacidad de retención depende tanto de la composición como de la presencia del iniciador. Las formulaciones exhiben una eficiencia superior en la incorporación de Cu(II), evidenciando un efecto de los grupos tiol en la coordinación metálica.



Universidad de Concepción

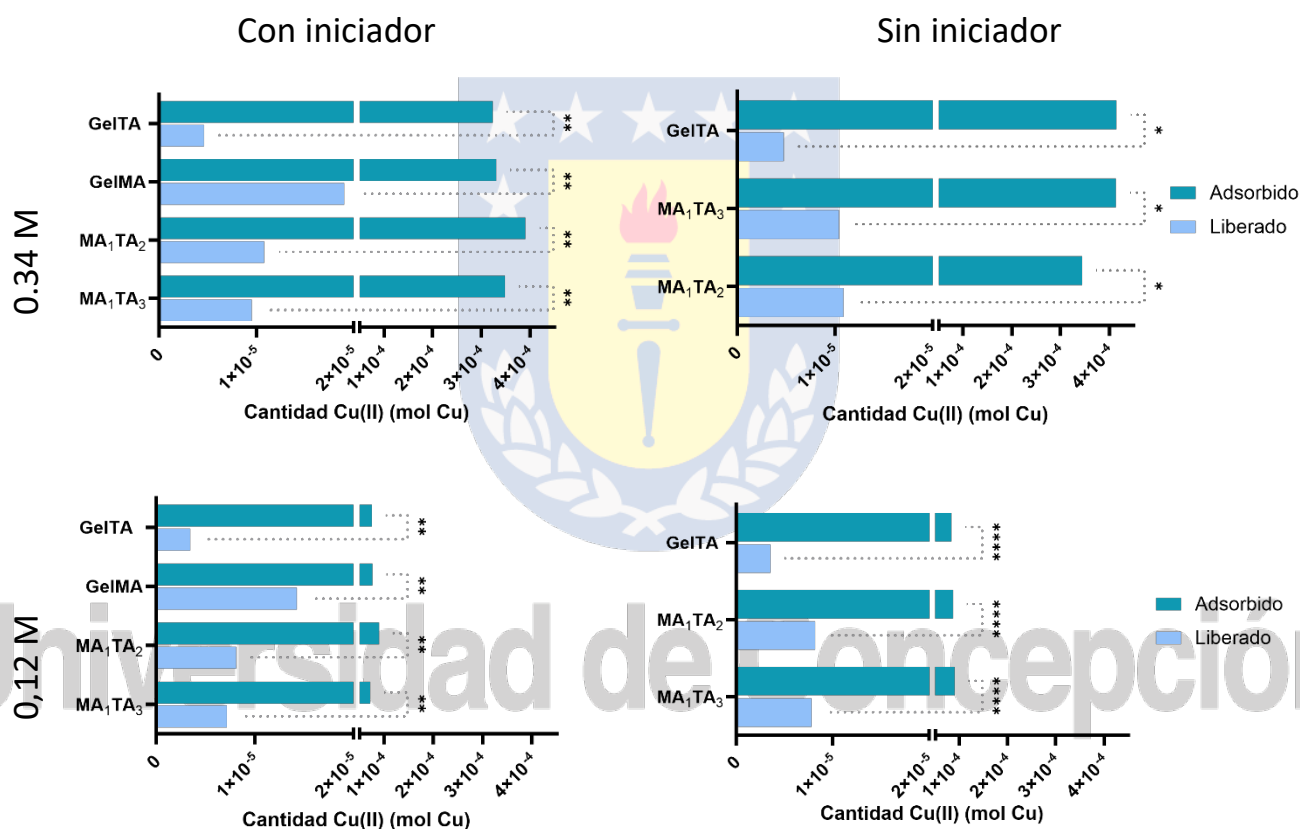
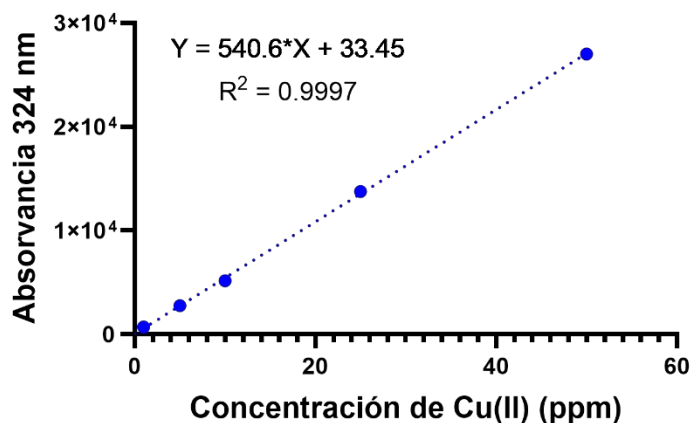


Figura 22: Capacidad de absorción y liberación de Cu(II) por medio de ICP de hidrogeles. (triplicados, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y *P< 0,05).

Para realizar la determinación de absorción y liberación de Cu(II) se realizó una aproximación previa en donde se asume la interacción 1:1 de disulfuro con Cu(II), de esta manera asumir que todos los disulfuros disponibles interactúen con los iones, por otro lado, se realiza el mismo proceso, pero esta vez asumiendo que parte de los disulfuros están formando enlaces covalentes dinámicos y entrecruzando el material, asumiendo una interacción 3:1 por cada 3 disulfuros un Cu(II). Se prueban estos

supuestos pensando en que no quede demasiado Cu(II) libre ya que este puede afectar en la citotoxicidad del material, especialmente si es liberado con rapidez o hay un gran exceso que se libere por gradiente. La liberación con respecto a la cantidad de Cu(II) cargado es muy importante al momento de intentar realizar aproximaciones a usos médicos, ya que se debe considerar que se mantenga en rangos donde el efecto del ion es beneficioso para las propiedades antibacterianas, pero que a la vez no afecte la viabilidad celular, ya que se han reportado resultados en donde se tienen concentraciones límites de Cu(II) para mantener la viabilidad celular.^{22, 86}

Ya teniendo en mente las consideraciones necesarias se procede a la preparación de los hidrogeles fotopolimerizados (acotados a las muestras con mayores proporciones de GelTA), los cuales son sumergidos en disoluciones de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Ilustración 2 en parte experimental**) de distintas concentraciones (0,34 M y 0,12 M) por 48 h para asegurar equilibrio de absorción de Cu(II), luego de este periodo se recupera el sobrenadante de cada una de las disoluciones el cual se cuantifica por medio de ICP (**Figura 22**). Se prepara una curva de calibración y luego se procede a la determinación de concentraciones de absorción, para la liberación es el mismo proceso solo que el hidrogel ya cargado con Cu(II) se sumerge en agua.

Es posible observar que todas las muestras son capaces de retener parte de la cantidad de Cu(II) en la estructura del hidrogel después de la liberación, ya que no libera su totalidad, esto se puede atribuir que hay iones que quedan atrapados dentro de la red por medio de las interacciones con los grupos funcionales superficiales especialmente con los disulfuros, ya que al comparar con GelMA se observa que este hidrogel es el que presenta mayores liberaciones de Cu(II).

Tabla 5: Porcentajes de liberación de Cu(II) de los hidrogeles sumergidos en soluciones de 0,34 mol/L y 0,12 mol/L.

Muestra	Liberación 0.34 mol/L (%)		Muestra	Liberación 0.12 mol/L (%)	
	CON iniciador	SIN iniciador		CON iniciador	SIN iniciador
GelTA	1.4 %	1.1 %	GelTA	4.6 %	4.3 %
GelMA	5.8 %		GelMA	18.8 %	
MA₁TA₂	2.8 %	3.2 %	MA₁TA₂	9.0 %	9.4 %
MA₁TA₃	2.7 %	2.5 %	MA₁TA₃	10.0 %	8.7 %

La **Tabla 5** presenta los porcentajes de liberación de Cu(II) calculados considerando la cantidad absorbida como el 100% para cada uno de los hidrogeles y en base a ese valor se calcula cual fue la cantidad liberada. Los resultados permiten evaluar la influencia de la composición del hidrogel y del proceso de fotopolimerización sobre la capacidad de retención y liberación del ion metálico.

En la condición de mayor concentración de Cu(II) (0,34 M, **Tabla 5a**), se observa que los hidrogeles de GelMA presentan la liberación más elevada, alcanzando un 5.8 % en las muestras fotopolimerizadas (sin iniciador no se obtiene hidrogel). En contraste, los sistemas con mayor proporción de GelTA exhiben una liberación inferior, con valores de 2.8 y 2.7 % para las muestras con iniciador y un 3.2 y 2.5 % sin iniciador. Estas observaciones son consistentes con la hipótesis de la coordinación del Cu²⁺ por los grupos de azufre de GelTA, lo que limita su liberación. Por otro lado, la similitud de los valores entre las muestras GelTA con y sin iniciador (1.4 y 1.1 %) indica que el proceso de fotopolimerización no altera significativamente la retención del metal en esta formulación

En la condición de menor concentración de Cu(II) (0,12 M, **Tabla 5b**), se observa un aumento generalizado de los porcentajes de liberación en todas las formulaciones, lo que es consistente con una menor cantidad inicial de ion disponible para difusión. Nuevamente, las formulaciones basadas en GelMA exhiben los mayores valores de liberación (18.8 %). En esta condición, la tendencia general se mantiene, mostrando

que una mayor proporción de GelTA en la red reduce la liberación del Cu(II), mientras que la presencia del iniciador parece favorecer una liberación ligeramente mayor, posiblemente debido a diferencias en la reticulación y la disponibilidad de los sitios de coordinación que pueden encontrarse reticulados.

5.2.4. Determinación de Absorción y liberación de Cu(II) por espectroscopía UV-Vis

Tras la fotopolimerización, los hidrogeles se sumergieron en una solución de 0,01 mol/L Cu(II) preparada con $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, concentración elegida por estar en los límites de citotoxicidad de esta manera se trabaja en rangos en que no debería ser citotóxico el material, pero aun así evaluar el aporte de la incorporación de Cu(II) al hidrogel, y la absorción se cuantificó mediante espectroscopía UV-Vis. La absorción de Cu(II) por hidrogeles puede deberse a la diferencia de presión osmótica entre el volumen de hidrogel y la solución externa. Dentro del hidrogel, los iones Cu(II) pueden interactuar con los residuos funcionales de aminoácidos de la gelatina, así como con los átomos de azufre del anillo de ditiolano^{87, 88}. La presencia de enlaces disulfuro en el anillo influye en la coordinación con Cu(II)⁸⁹, donde el ion interactúa con un átomo de azufre en cada anillo, promoviendo la reticulación⁹⁰. La **Figura 23** muestra la cantidad de Cu(II) absorbida y liberada, lo que evidencia que la cantidad de Cu(II) absorbida no se ve afectada por la composición, sin que se observe una tendencia clara. Además de la coordinación de Cu(II) con GelTA, pueden estar presentes otros procesos de coordinación con los propios grupos funcionales de la gelatina, como la coordinación de Cu(II) por carboxilatos terminales de la cadena de gelatina, pero también por grupos amino de cadena lateral de la cadena de gelatina, como la prolina, por ejemplo⁹¹.

Cabe destacar que la tendencia se mantiene tanto en presencia como ausencia de iniciador, más aún se puede observar una diferencia en las cantidades absorbidas, las cuales son levemente mayores en los hidrogeles sin iniciador, lo cual se puede deber a que la ausencia de iniciador provoca un menor entrecruzamiento y quedan más grupos funcionales disponibles para las interacciones con Cu(II).

La concentración de Cu(II) liberada es uno de los factores a considerar al diseñar el material, ya que la muerte celular ocurre con concentraciones superiores a $10 \mu\text{M}$ ⁹², lo que debe evitarse asegurando una eficacia antibacteriana suficiente. La **Figura 23** muestra que la liberación de Cu(II) se encuentra dentro de un rango que permite la

actividad antibacteriana, mientras se acerca a concentraciones que se informa inducen efectos citotóxicos en exposiciones prolongadas. Esto pone de manifiesto la necesidad de optimizar cuidadosamente la carga y el lanzamiento de Cu(II) para las aplicaciones previstas⁹³.

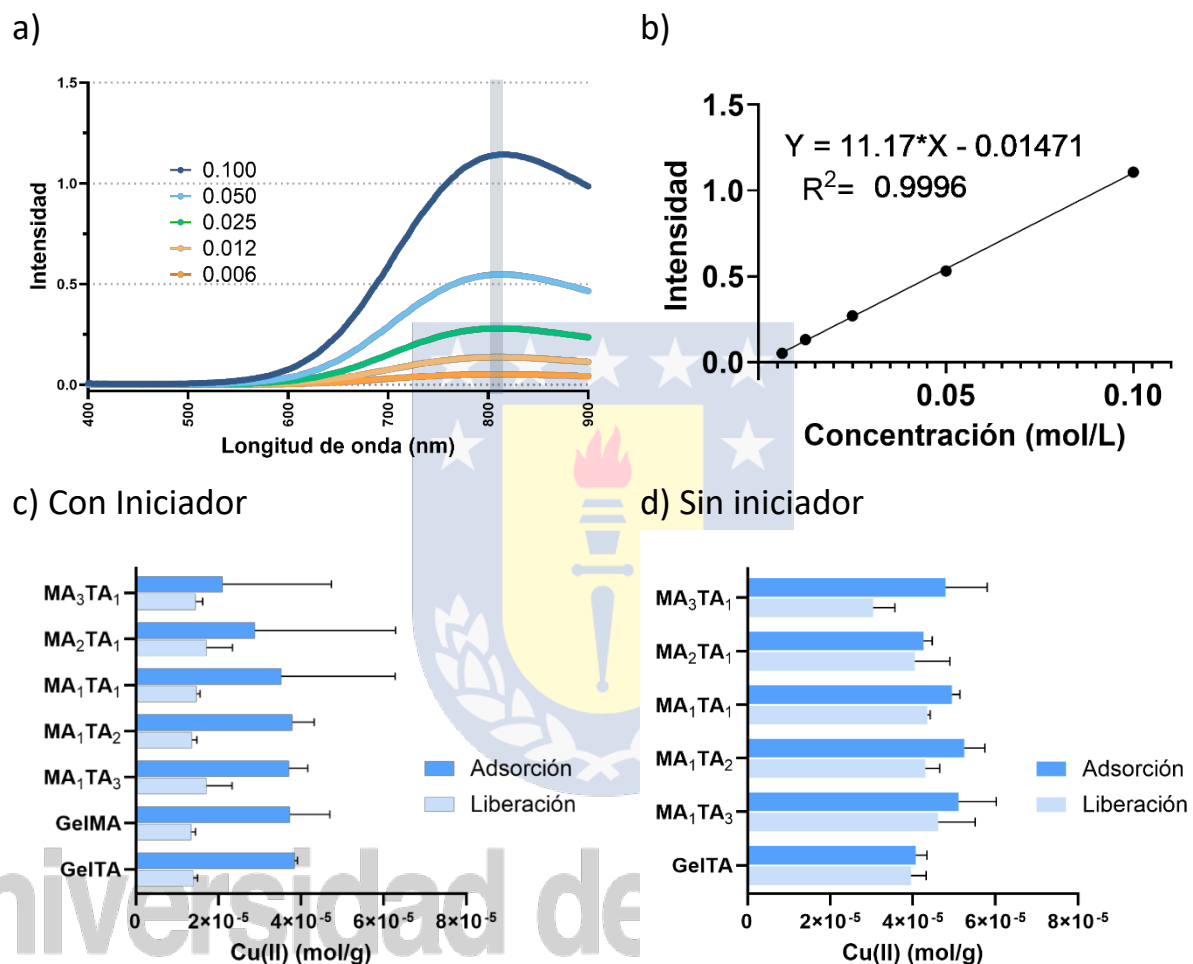


Figura 23: Caracterización de absorción de Cu(II) por medio de absorbancia a) Espectros a distintas concentraciones de Cu(II) para la construcción de la curva de calibración y elección del máximo de absorbancia a 815nm, b) Curva de calibración y regresión lineal, Capacidad de adsorción y liberación de Cu(II) de hidrogeles c) Con iniciador y d) Sin iniciador.

5.2.5. Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua de los hidrogeles es un parámetro crítico que ofrece una visión directa de su arquitectura de red. Específicamente, el comportamiento de la hinchazón está estrechamente relacionado con la densidad de reticulación, el tamaño de la malla y la porosidad de la red polimérica, donde una mayor absorción de agua suele indicar una estructura reticulada débil, mientras que

una hinchazón menor refleja una red más densa^{94, 95} (**Figura 24**). Además, el contenido de agua en equilibrio influye de manera significativa en las propiedades mecánicas de los hidrogeles, ya que los sistemas altamente hidratados suelen presentar menor rigidez y mayor deformabilidad.

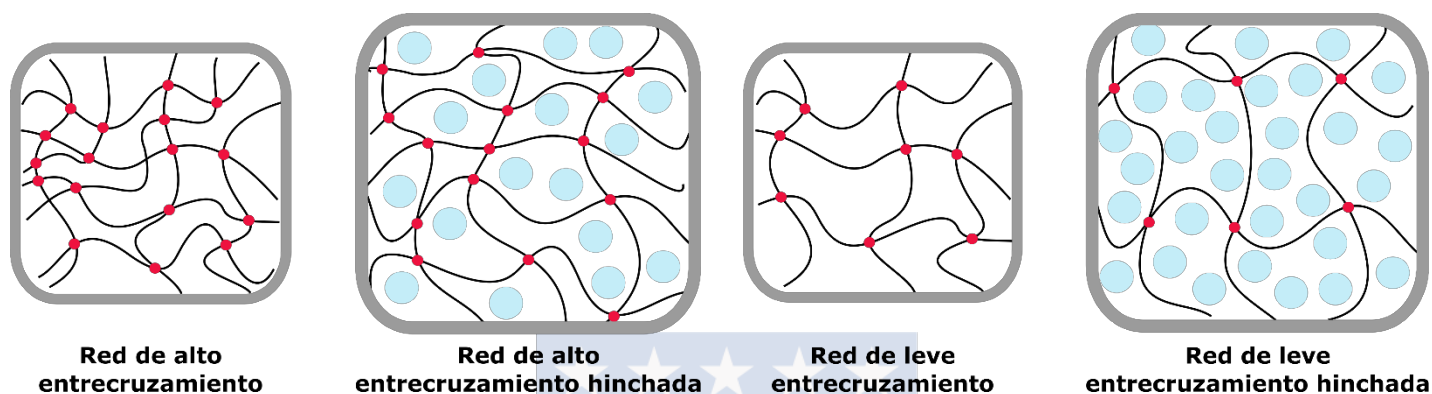


Figura 24: Representación esquemática del hinchamiento de redes con distintos entrecruzamientos.

La capacidad de absorción de agua fue medida luego de 48 horas de tener el residuo sólido de los hidrogeles liofilizados sumergidos en agua a pH 7, con agitación y temperatura constantes.

a) Con Iniciador

b) Sin Iniciador

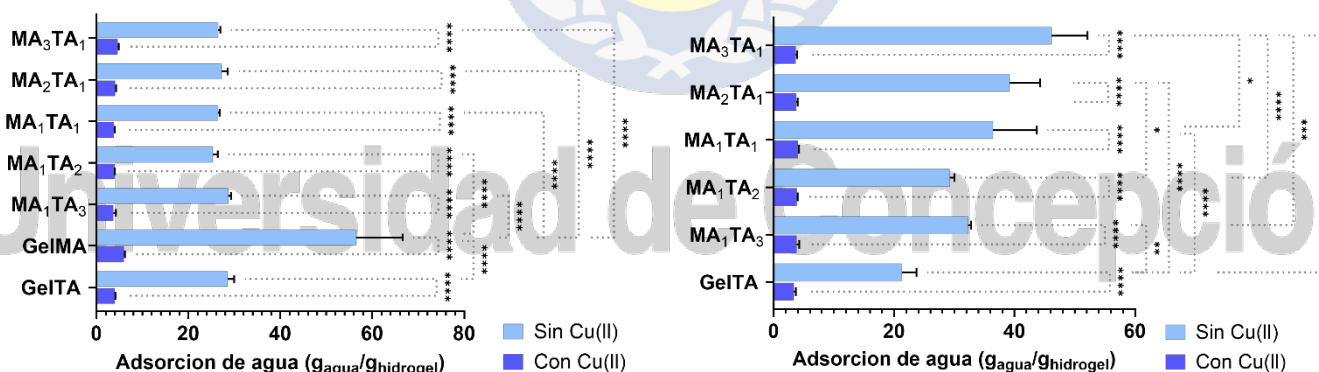


Figura 25: Capacidad de absorción de agua de las distintas mezclas con y sin Cu(II) a) con y b) sin iniciador. (n=3, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y *P< 0,05).

La **Figura 25** presenta la capacidad de absorción de agua (S_w) de los hidrogeles fotopolimerizados con y sin iniciador además de la evaluación del efecto de la incorporación de Cu(II) en la capacidad de absorción de agua.

Para los hidrogeles con iniciador (**Figura 25a**) se observa que todos ellos presentan diferencias significativas al contener o no Cu(II), ya que su absorción en el hidrogel disminuye en 1 orden de magnitud la capacidad de absorción de agua. Considerando

que los disulfuros pueden formar entrecruzamientos físicos con el Cu(II), la disminución notable de la capacidad de absorción de agua se puede deber al mayor entrecruzamiento físico que aporta el catión, tendencia que también se observa con los hidrogeles sin iniciador (**Figura 25b**).

Al comparar las composiciones de los hidrogeles se puede observar que cuando contienen iniciador no presentan muchas diferencias entre ellos con excepción de GelMA que presenta diferencias significativas con todos los hidrogeles, lo cual se puede deber a que es el que presenta entrecruzamiento solo por medio del iniciador, en cambio todos los demás lo presentan tanto por el iniciador como por los disulfuros, provocando que tenga mayor entrecruzamiento y como consecuencia una menor capacidad de absorción de agua. Por otro lado, al comparar los hidrogeles sin iniciador si se ven diferencias significativas en las distintas formulaciones, siendo las que presentan mayores proporciones de GelTA las que presentan menores absorciones de agua en consecuencia de estar más entrecruzados.

En resumen, la mayor diferencia la causa el entrecruzamiento de los hidrogeles, que se ve afectado por la composición y en mayores proporciones por la presencia de reticulaciones físicas con el Cu(II)

5.2.6. Fotorreometría

La metodología que se siguió para obtener los datos de fotorreometría consiste en medir el módulo de la muestra mientras se aplican periodos sin radiación, en blanco, y con radiación, en rosado, lo que permite evaluar sus propiedades viscoelásticas (**Figura 26**). En estas condiciones se puede observar el cambio en los módulos de almacenamiento, asociarlo al entrecruzamiento del material, comprobar que es iniciado por radiación, la cual provoca la formación de radicales y por consiguiente, la formación de reticulación. Por otro lado, se puede asociar la llegada a un plateau del módulo con el término del entrecruzamiento, ya que no hay más grupos disponibles, y así también se puede determinar cuánto tiempo de exposición a UV es necesario para la formación de los hidrogeles.

Con el fin de evaluar las capacidades de fotopolimerización de los hidrogeles con y sin iniciador y determinar si GelTA aporta en este proceso, además de definir los tiempos de radiación necesarios para llegar a un *plateau* del G' , se realiza fotorreometría. En este análisis se consideraron distintos factores, como el tiempo durante el cual la

muestra es irradiada y la duración de cada intervalo. También se controlaron y mantuvieron constantes la temperatura (37°C) y la humedad (60%).

De forma preliminar, se realizó el análisis de mezclas compuestas de diferentes proporciones de las dos gelatinas modificadas con el objetivo de encontrar la proporción más cercana al módulo de la piel (10 a 850 kPa^{96,97}), considerando que la proyección de este trabajo es generar un material útil en la ingeniería de tejidos cutáneos. Las proporciones usadas se presentan en la **Tabla 2**.

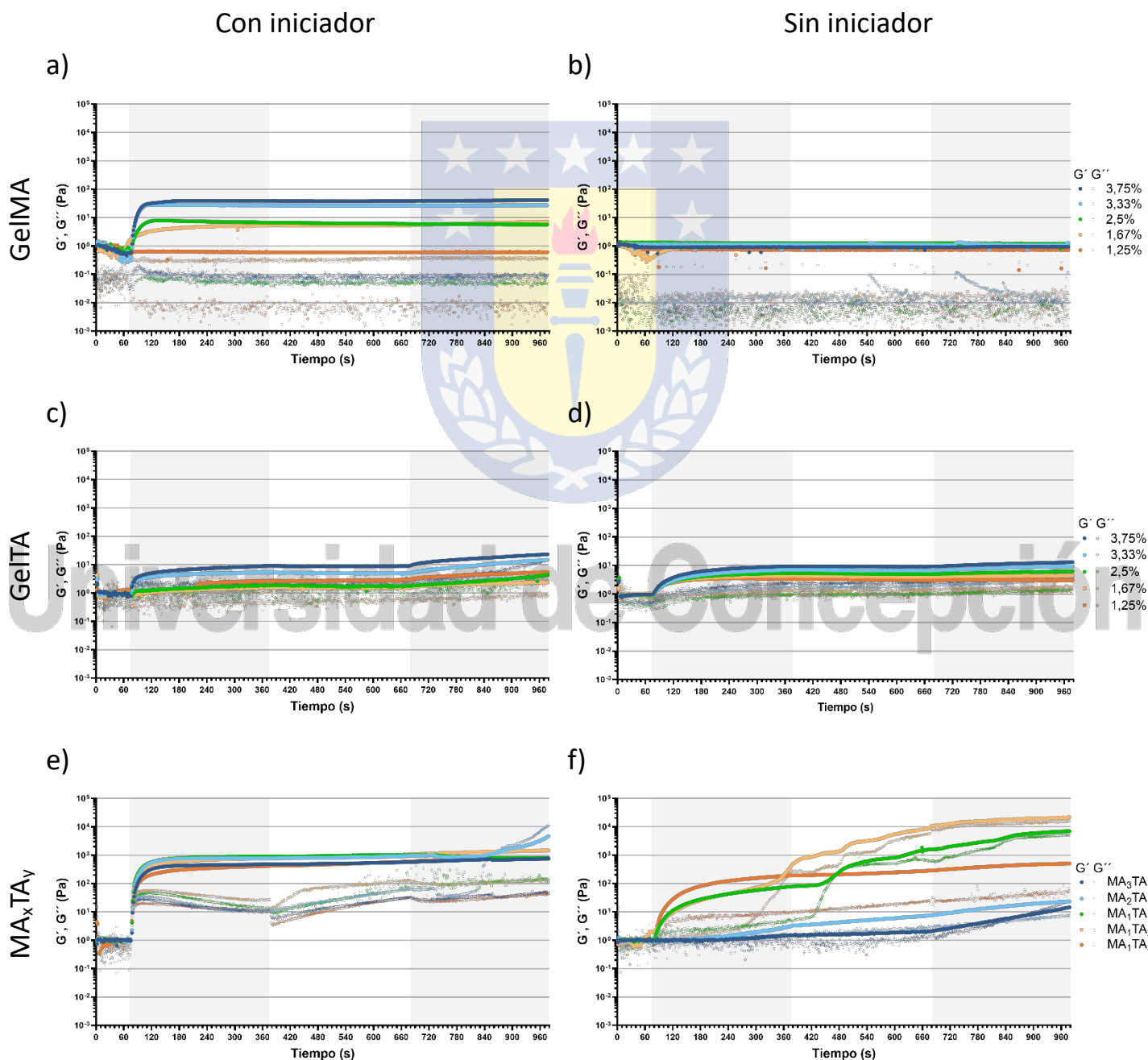


Figura 26: estudios de fotoreometría de a) GelMA con iniciador, b) GelMA sin iniciador, c) GelTA con iniciador, d) GelTA sin iniciador, e) hidrogeles MATA con iniciador y f) MATA hidrogeles sin iniciador.

La caracterización de gelatinas modificadas se realiza mediante fotorreometría para comparar la evolución de los módulos viscoelásticos bajo irradiación en formulaciones con y sin iniciador, además de que se probaron las distintas concentraciones, siendo las relacionadas con las proporciones en las mezclas para comprobar el aporte de cada una de las gelatinas modificadas al comportamiento del hidrogel dual,

En las **Figura 26a y b** se observa el comportamiento de GelMA. Con iniciador, el módulo de almacenamiento (G') aumenta abruptamente tras la exposición a la luz, alcanzando valores en el rango de 10^1 – 10^2 Pa, con una clara dependencia de la concentración (el hidrogel al 3,75% muestra la mayor rigidez, mientras que al 2.5% el aumento es mínimo). Sin iniciador, no se observa un aumento significativo de G' , que se mantiene prácticamente en el rango de 10^0 – 10^1 Pa durante toda la prueba, Este resultado confirma que la radiación UV por sí sola no es suficiente para inducir el entrecruzamiento de los grupos metacrilato presentes en GelMA. La ausencia de radicales libres impide el inicio de la reacción de propagación, por lo que las cadenas conservan un comportamiento predominantemente líquido o de solución altamente viscosa.

Las **Figura 26c y d** corresponden a GelTA. En este caso, aun en ausencia de iniciador, se observa un aumento progresivo en G' , atribuible a la formación espontánea de enlaces disulfuro. No obstante, en presencia de iniciador y radiación, el refuerzo mecánico es más pronunciado, alcanzando valores cercanos a 10^1 Pa en las formulaciones de mayor concentración, lo que demuestra que la fotopolimerización contribuye de manera sinérgica a la estabilización de la red.

En las **Figura 26e y f** se muestran las mezclas de GelMA y GelTA. Con iniciador, la evolución de G' es rápida y alcanza los valores más altos de la serie, en el rango de 10^3 – 10^4 Pa, con una respuesta mucho más consistente que las observadas para los sistemas individuales, además de mostrar un comportamiento más parecido al de GelMA. Sin iniciador, las mezclas también desarrollan un incremento en G' , aunque más gradual y con valores finales menores, lo cual indica que la contribución de los enlaces dinámicos de GelTA permite cierta estructuración incluso en ausencia de radiación, pero sin alcanzar la rigidez que aporta GelMA. Las formulaciones con mayor contenido relativo de GelTA presentan una evolución más prolongada del módulo

elástico, lo que indica que la contribución de la red dinámica adquiere mayor importancia a medida que aumenta la concentración de segmentos funcionalizados con ácido tióctico.

Estos resultados demuestran que la presencia de iniciador es esencial para inducir un entrecruzamiento covalente eficiente en GelMA ya que es este compuesto el cual aporta la formación de radicales al ser expuesto a luz UV y por consiguiente la iniciación del entrecruzamiento. Por otro lado, GelTA contribuye con la formación de enlaces covalentes dinámicos, aun sin iniciador, ya que este también puede formar radicales sobre los azufres del anillo ditiolano e iniciar la reticulación^{98, 99}. La combinación de ambos polímeros en una red dual da lugar a una respuesta mecánica superior, ya que se combinan las propiedades de ambas redes, con rigideces hasta un orden de magnitud mayores que las de las redes simples, especialmente cuando se activa la fotopolimerización.

Los resultados demuestran que la fotopolimerización de los grupos metacrilato constituye el principal mecanismo responsable del rápido desarrollo de la rigidez mecánica del sistema. GelMA requiere obligatoriamente la presencia de un fotoiniciador para formar una red covalente eficiente, mientras que GelTA presenta una respuesta prácticamente independiente del iniciador, dominada por mecanismos de entrecruzamiento físico y dinámico. Cuando ambos polímeros se combinan (MATA), se observa un comportamiento sinérgico en el que la red covalente formada por GelMA proporciona una rápida estabilización inicial, mientras que la red basada en GelTA continúa reorganizándose después de la irradiación, contribuyendo al aumento progresivo del módulo elástico. Este comportamiento es característico de hidrogeles de red dual, donde la combinación de enlaces permanentes y dinámicos permite obtener materiales con elevada estabilidad mecánica, capacidad de disipación de energía y potenciales propiedades de autorreparación, características altamente deseables para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

5.2.7. Reometría

5.2.7.1. Amplitud

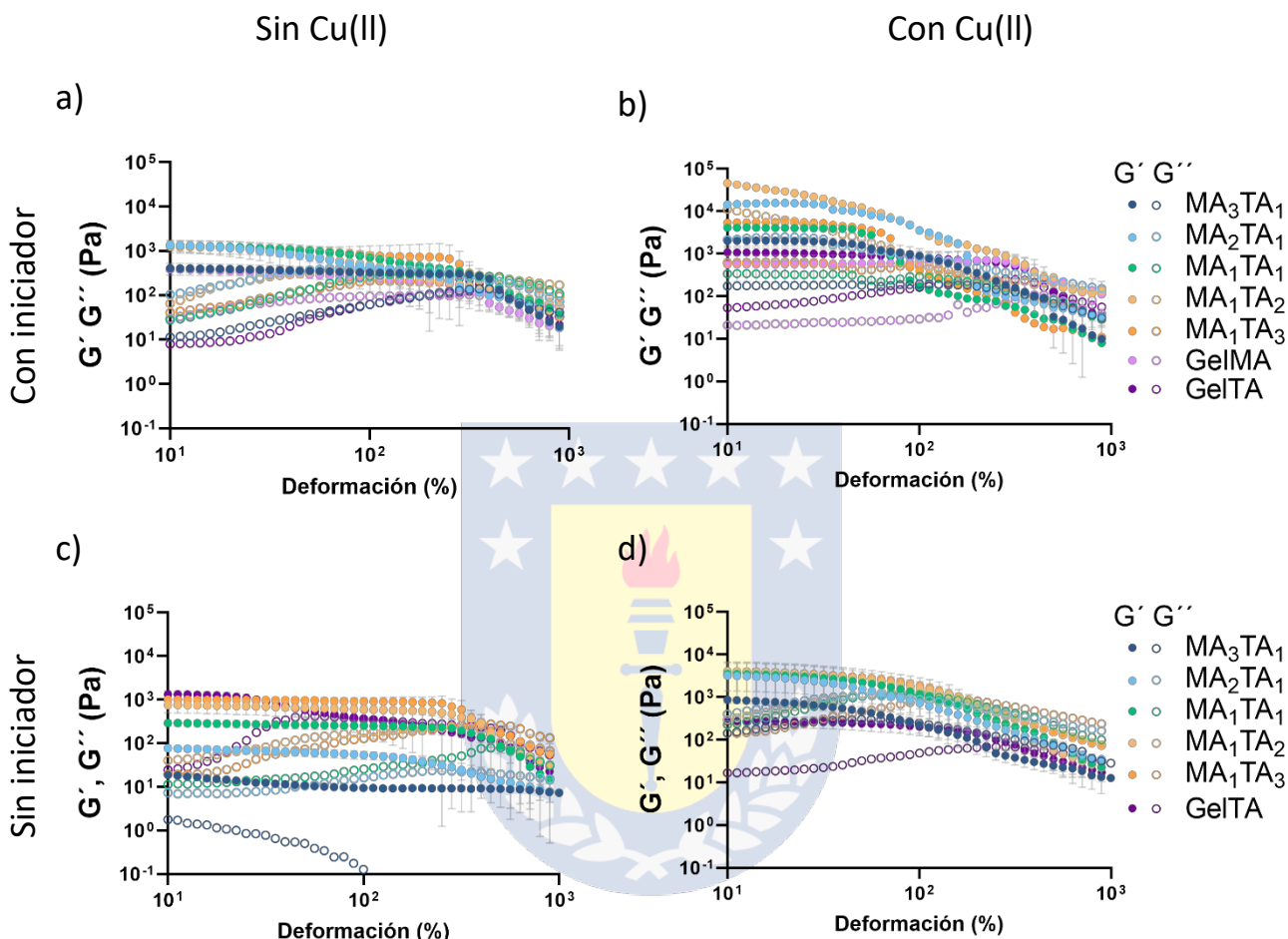


Figura 27: Caracterización de propiedades reológicas de mezclas de gelatinas (GelMA/GelTA) en distintas proporciones a) mezclas con iniciador sin Cu(II), b) mezclas con iniciador con Cu(II), c) mezclas sin iniciador sin Cu(II), d) mezclas sin iniciador con Cu(II).

Las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles se evaluaron mediante ensayos reológicos de amplitud oscilatoria, con el objetivo de determinar la región viscoelástica lineal (LVR) y analizar el efecto de la composición del hidrogel, la fotopolimerización y la incorporación de Cu(II) sobre la estabilidad mecánica de la red. La **Figura 27** presenta las curvas de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') para las diferentes formulaciones preparadas con y sin fotoiniciador, antes y después de la incorporación de Cu(II).

En las formulaciones preparadas con fotoiniciador y sin Cu(II) (**Figura 27a**), todos los hidrogeles presentaron un comportamiento predominantemente elástico ($G' > G''$) en la región viscoelástica lineal, con valores de G' del orden de 10^3 Pa. El plateau se

mantuvo hasta deformaciones de aproximadamente 10^1 - 10^2 %, tras las cuales se observó una disminución progresiva de G' , lo que indica el inicio de la ruptura de la red polimérica. La similitud de los módulos entre las distintas composiciones sugiere que, en ausencia de Cu(II), el comportamiento mecánico está dominado por la red covalente formada mediante la fotopolimerización de GelMA, mientras que la contribución de GelTA es limitada. En ausencia de fotoiniciador (**Figura 27c**), los hidrogeles presentaron valores de G' considerablemente menores, del orden de 10^2 – 10^3 Pa, lo que confirma la importancia de la red covalente permanente de GelMA en el refuerzo mecánico del material. En todas las formulaciones se observó una disminución gradual del módulo una vez superada la región viscoelástica lineal, lo que indica una menor resistencia frente a grandes deformaciones.

En ambos sistemas (con y sin iniciador), los hidrogeles mostraron inicialmente una respuesta similar a un sólido ($G' > G''$). En ausencia de Cu(II), los hidrogeles de control mostraron una región viscoelástica lineal de hasta el 500% de la deformación, mientras que formulaciones con mayores proporciones de GelTA mostraron un G' más alto, de aproximadamente 1,3 kPa. Este resultado sugiere que, además de la red covalente formada por la fotopolimerización de grupos metacrilato GelMA, la fracción de GelTA también contribuye a la conectividad efectiva de la red, probablemente a través de enlaces dinámicos. Además, durante la polimerización con radicales exógenos y la insaturación vinílica, pueden producirse reacciones de adición con alquenos, formando enlaces tioéster irreversibles que contribuyen a un aumento de elasticidad en baja deformación⁵⁵.

La incorporación de Cu(II) produjo un incremento significativo del módulo de almacenamiento en todas las formulaciones (**Figura 27b**). Este efecto fue especialmente evidente en las muestras con mayor contenido de GelTA, en particular MA₁TA₂ y MA₁TA₃, cuyos valores iniciales de G' alcanzaron aproximadamente 10^5 Pa, es decir, cerca de dos órdenes de magnitud superiores a los observados en las formulaciones sin Cu(II). Además, estas muestras mantuvieron la región viscoelástica lineal hasta deformaciones considerablemente mayores, reflejando una mayor capacidad para almacenar energía elástica antes del inicio del daño estructural. En contraste, las formulaciones con mayor proporción de GelMA (MA₃TA₁) mostraron una disminución de G' a deformaciones menores, lo que evidencia una respuesta más

frágil frente a la carga mecánica. En los sistemas sin iniciador, la incorporación de Cu(II) también produjo un incremento significativo de G' (**Figura 27d**). Nuevamente, las formulaciones MA₁TA₂ y MA₁TA₃ alcanzaron los mayores módulos iniciales, del orden de 10^3 – 10^4 Pa, lo que demuestra que las interacciones de coordinación metal-ligando son capaces de reforzar la red polimérica incluso en ausencia de una red covalente fotopolimerizada.

Tras la absorción de Cu(II) se observa un claro desplazamiento de las curvas hacia valores más altos de G' , lo que indica un aumento en la conectividad de la red y la rigidez inicial. El efecto de refuerzo era evidente en todas las composiciones, pero era significativamente más pronunciado en formulaciones que contenían GelTA, especialmente en MA₁TA₂ y MA₁TA₃. Estas formulaciones alcanzaron G' dentro de la región viscoelástica lineal (LVR) de 4,1 y 5,1 kPa, respectivamente, lo que sugiere un mecanismo adicional de reticulación física más allá de los enlaces covalentes de la red GelMA. Esta tendencia es coherente con el papel conocido de los iones divalentes como sitios adicionales de coordinación en los hidrogeles^{91, 100, 101}.

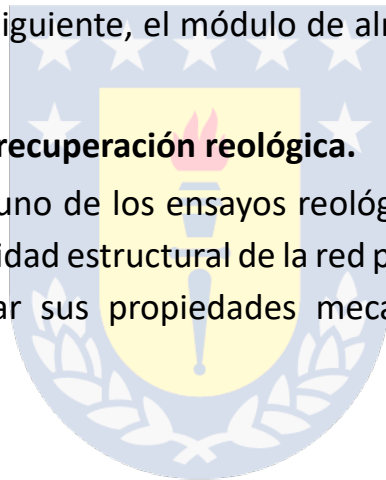
El Cu(II) puede interactuar con grupos donantes de electrones presentes en GelMA, como los grupos amino, carboxilato e hidroxilo, generando así un segundo nivel de reticulación, una subred supramolecular metal-ligando superpuesta a la red covalente original, lo que aumenta la estabilidad mecánica y altera la disipación de energía. Este aumento también es coherente con la coordinación esperada entre Cu(II) y los grupos azufre asociados con el 1,2-ditiolano de GelTA, tal como se informa en sistemas similares basados en ácido tióctico y Cu(II)^{102, 103}, en los que la coordinación actúa como una unión reversible que incrementa la rigidez en pequeñas deformaciones. Simultáneamente, la transición al comportamiento no lineal en geles cargados de Cu(II) tiende a producirse en deformaciones más bajas, seguida de una caída abrupta de G' , lo que sugiere que parte del refuerzo proviene de enlaces de coordinación dinámica que se rompen y reorganizan bajo bajas deformaciones. Curiosamente, GelTA mostró cambios modestos tras la exposición a Cu(II), mientras que GelMA mostró una respuesta no lineal más compleja, con un aumento gradual de G' , lo que sugiere un comportamiento de endurecimiento por deformación. Los resultados apoyan la idea de la reticulación múltiple, una red covalente mediante fotopolimerización, una red covalente dinámica entre 1,2-ditiolano y una red física

mediante Cu(II)-GelTA/GelMA, que puede usarse para explicar el aumento de rigidez durante pequeñas deformaciones y el rendimiento significativo durante deformaciones grandes.

En conjunto, los resultados muestran que el comportamiento mecánico de estos hidrogeles depende tanto de la composición de la red como del mecanismo de reticulación predominante. La fotopolimerización de GelMA proporciona la red covalente permanente responsable de la estabilidad estructural, mientras que GelTA introduce enlaces dinámicos capaces de contribuir a la reorganización de la red. La incorporación de Cu(II) genera un tercer mecanismo de estabilización basado en enlaces de coordinación metal-ligando, aumentando la densidad efectiva de entrecruzamiento y, por consiguiente, el módulo de almacenamiento y la resistencia a la deformación.

5.2.7.2. Ensayo de autorrecuperación reológica.

El ensayo de time sweep es uno de los ensayos reológicos más importantes, el cual nos permite evaluar la estabilidad estructural de la red polimérica a lo largo del tiempo y su capacidad de recuperar sus propiedades mecánicas tras una perturbación mecánica oscilatoria.



Universidad de Concepción

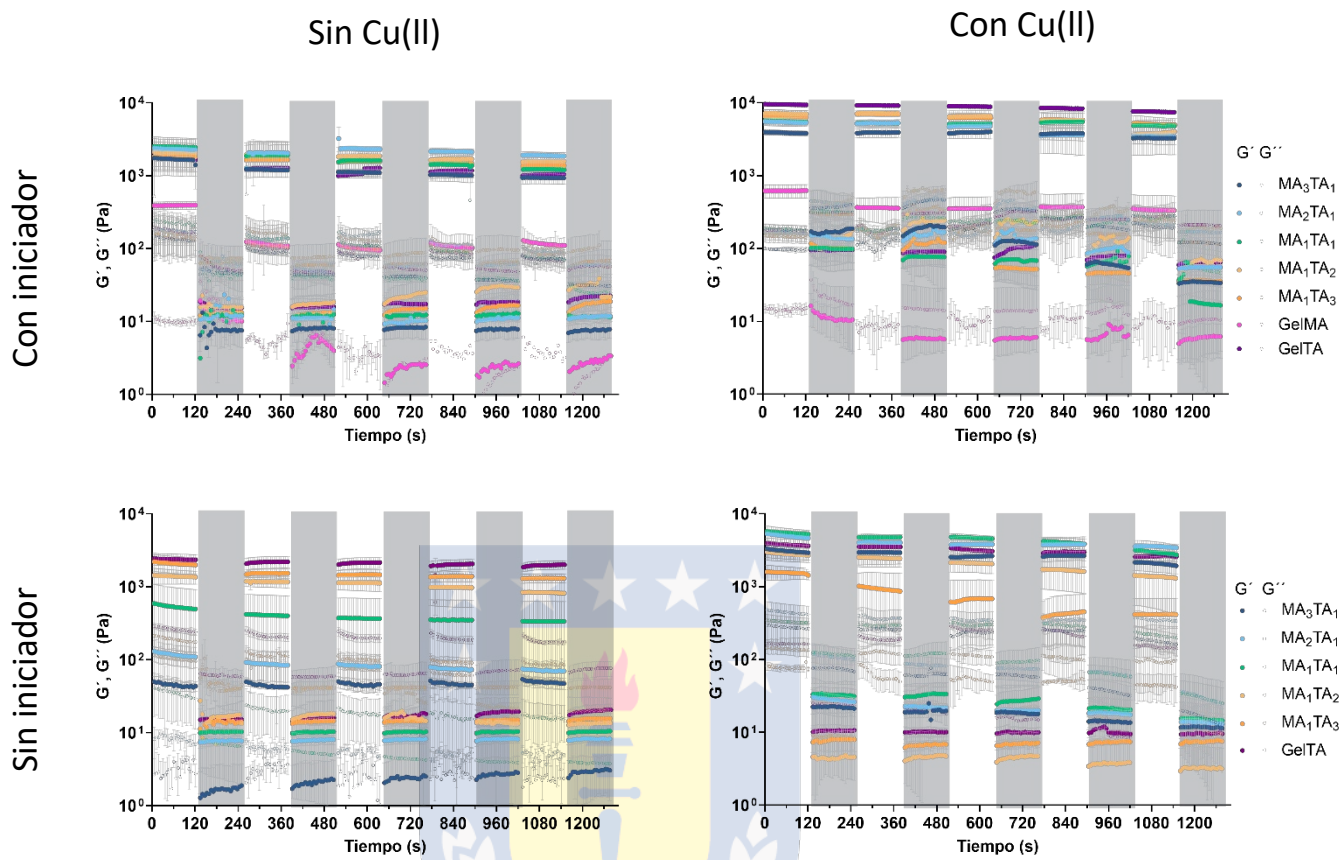


Figura 28. autorrecuperación reológica por time sweep aplicando 1% de deformación (blanco) y 1000% de deformación (celeste).

La capacidad de autorrecuperación reológica de los hidrogeles se evaluó mediante análisis de barrido escalonado en un reómetro de placa paralela, midiendo los módulos de G' y G'' en tensiones del 1% y 1000% (**Figura 28**). Según los resultados de barrido de amplitud, la deformación del 1% se encuentra dentro de la región viscoelástica lineal donde predomina el comportamiento elástico, mientras que la deformación del 1000% se encuentra en la región no lineal donde ocurre la deformación irreversible, lo que permite evaluar la capacidad del material para recuperar su módulo y, en consecuencia, su estructura global. Las pruebas del ciclo reológico muestran que los hidrogeles presentan un comportamiento predominantemente elástico ($G' > G''$) al 1%, pero al 1000% hay una marcada disminución de G' con una inversión de los módulos ($G'' > G'$), lo que indica un comportamiento similar al fluido. Esta situación se repite en el segundo y los siguientes ciclos, pero solo se observa una recuperación parcial del módulo (G') al volver al 1% en ciclos sucesivos. Esto es coherente con daños microestructurales y

reversibilidad limitada de las interacciones físicas en la red dominada por enlaces covalentes fotoinducida. Tras la absorción de Cu(II), se observa un aumento global de G' en el intervalo del 1%, especialmente en formulaciones con mayor contenido de GelTA. También se observa una recuperación más rápida y constante de G' tras cada ciclo del 1000%, lo que sugiere la activación de un mecanismo adicional de reticulación física y dinámica. En este contexto, el Cu(II) parece promover interacciones reversibles que se rompen bajo una deformación extrema para disipar energía y luego reconstituirse cuando la deformación disminuye. En general, la absorción de Cu(II) mejora significativamente la capacidad de autorrecuperación reológica de los hidrogeles, permitiéndoles conservar sus propiedades viscoelásticas incluso bajo deformaciones repetidas y mejorando su resistencia mecánica a ciclos de deformación de gran tamaño.

Sin iniciador se tienen módulos iniciales más dispersos que con iniciador, esto atribuido a que el entrecruzamiento está directamente ligado a la cantidad de disulfuros presentes en las mezclas, ya que son estos los que actúan como fotoiniciadores y provocan el entrecruzamiento de la red

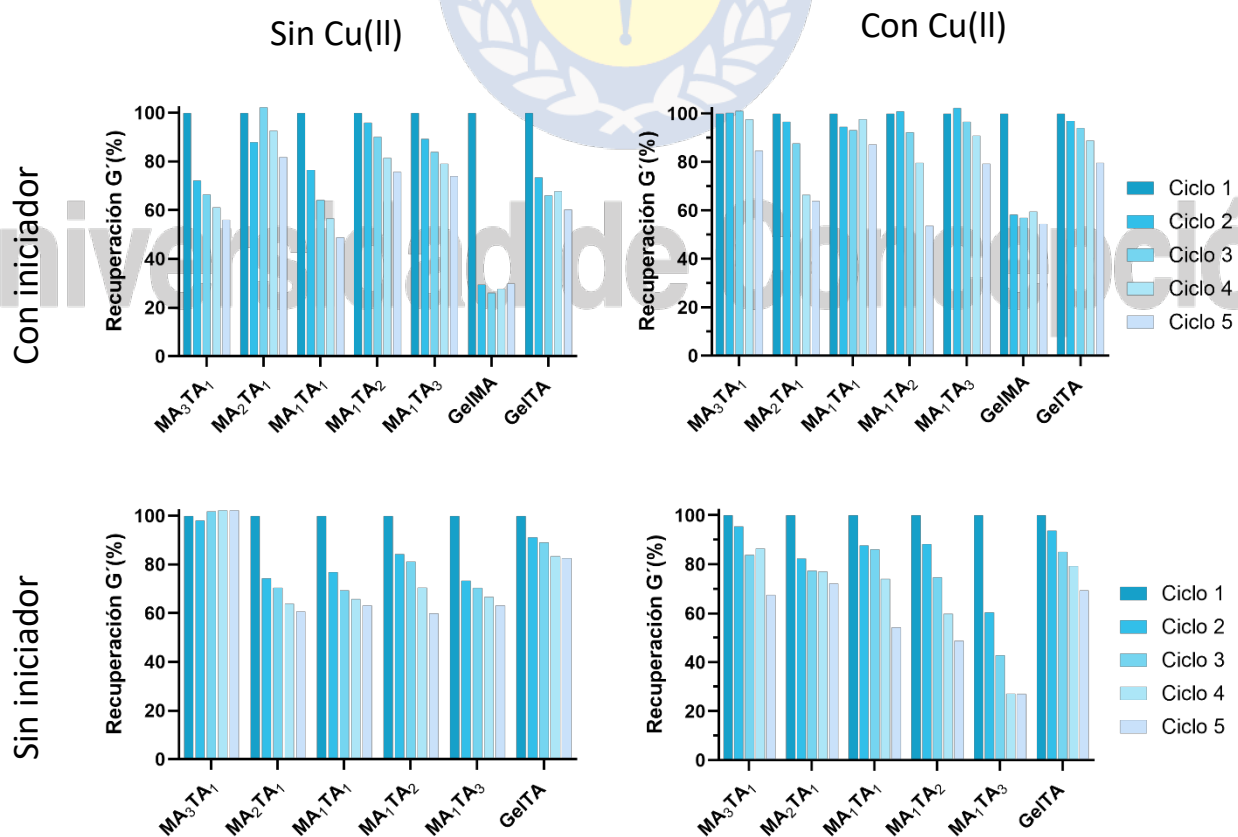


Figura 29: Porcentajes de recuperación reológica de G' de los hidrogeles pormedio de los valores obtenidos de time sweep

En la **Figura 29** se pueden observar la recuperación de los módulos de almacenamiento en porcentajes luego de cada ciclo, estos valores son obtenidos del promedio del módulo de almacenamiento de cada uno de los respectivos ciclos.

Al comparar las muestras que tienen iniciador se puede notar que la incorporación de GelTA mejora las propiedades de autorrecuperación reológica de más mezclas, además de notar que las mezclas que presentan mayores proporciones de GelTA conservan mayores porcentajes de recuperación, aproximadamente sobre el 50 %. Si a las mismas formulaciones se les agrega Cu(II) se nota un reforzamiento en los materiales además del aumento del porcentaje de recuperación en todos los casos.

Por otro lado, al comparar las formulaciones sin iniciador se observa que el porcentaje de recuperación al final de los ciclos aumenta en comparación al caso anterior teniendo un desempeño de recuperación un 10% superior. La incorporación de Cu(II) produjo una ligera disminución en los porcentajes de recuperación del hidrogel. Este comportamiento podría atribuirse a la formación de puntos adicionales de entrecruzamiento mediante enlaces de coordinación entre los iones metálicos y los grupos funcionales presentes en la red polimérica. Si bien estas interacciones incrementan la rigidez y la estabilidad mecánica del material, también restringen la movilidad de las cadenas de gelatina, limitando la reorganización de los enlaces disulfuro dinámicos responsables del proceso de autorrecuperación reológica. En consecuencia, la capacidad del hidrogel para recuperar completamente sus propiedades viscoelásticas después de la deformación se ve parcialmente reducida.

5.2.7.3. Densidad de entrecruzamiento por frecuencia

La densidad efectiva de reticulación (ν_e) de los hidrogeles se estimó a partir de mediciones reológicas utilizando la teoría de elasticidad del caucho ^{104, 105}(**Ecuación 4**). El módulo de almacenamiento (G') se obtuvo a partir de pruebas de barrido de frecuencia dentro de la región viscoelástica lineal:

$$\nu_e = \frac{G'}{RT} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde R es la constante universal del gas y es la temperatura absoluta. La reometría no mide directamente enlaces químicos, sino la respuesta elástica de la red, por lo que el parámetro obtenido corresponde a una densidad efectiva de

entrecruzamiento.^{106, 107} Los cálculos se realizan a una frecuencia angular de 10 rad/s, en la que se comparan los módulos de almacenamiento de cada una de las mezclas, y el análisis se realiza en 37°C

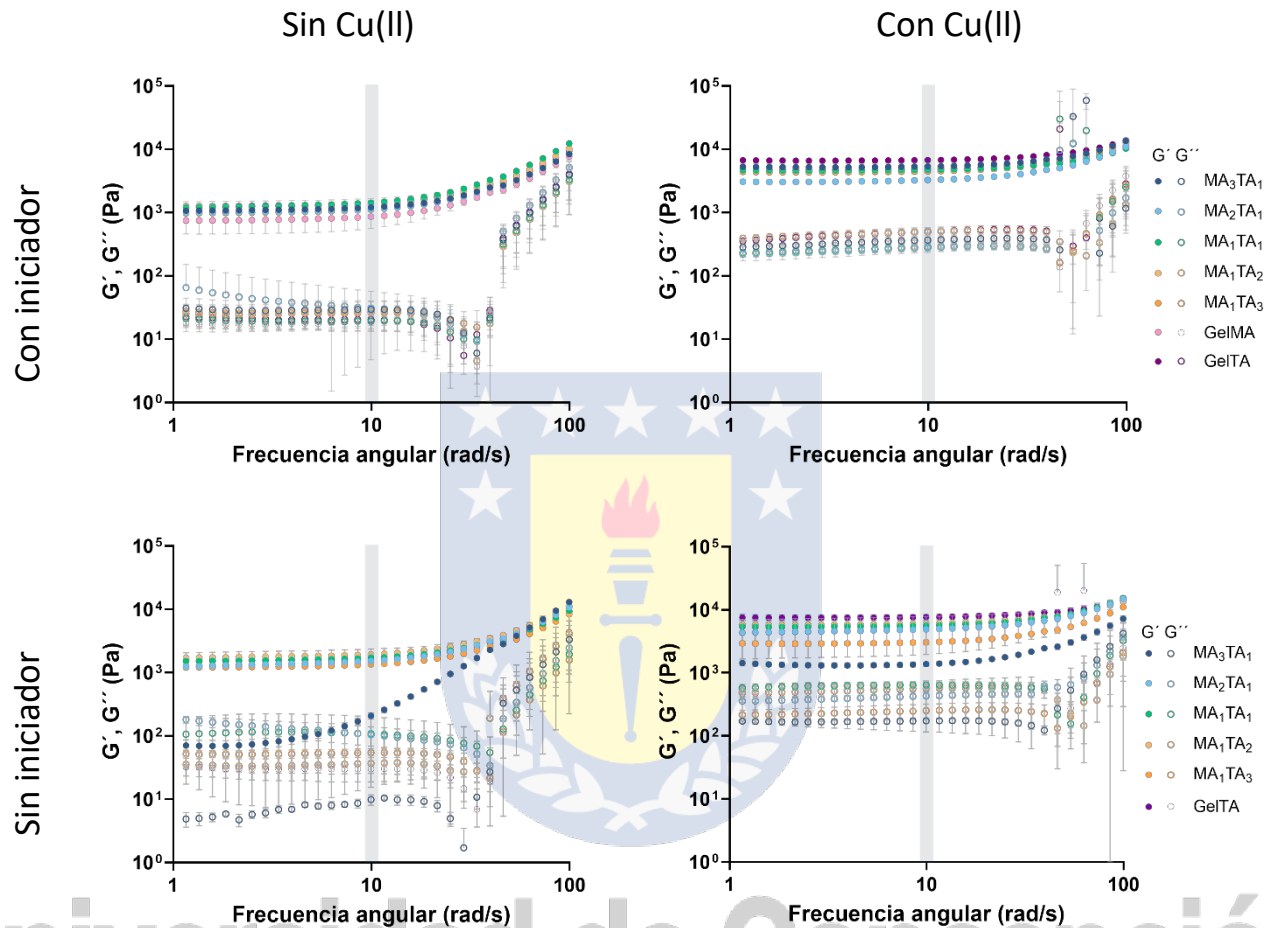


Figura 30: Barridos de frecuencia de G' y G'' de hidrogeles MA_xTA_y con diferentes composiciones, en presencia y ausencia de iniciador y el efecto de la incorporación de $Cu(II)$.

Es necesario seleccionar una frecuencia angular dentro de un plateau de G' , valor que será utilizado para calcular la densidad de entrecruzamiento efectiva. Para que todos los datos comparables se elige una frecuencia angular de 10 rad/s (destacada en celeste, **Figura 30**)

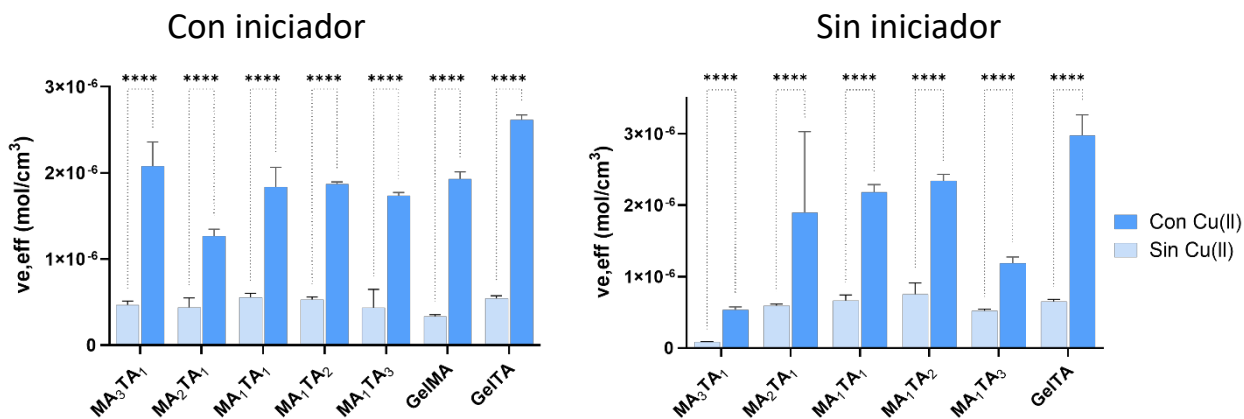


Figura 31: Determinación de densidad de entrecruzamiento efectivo desde análisis de frecuencia. (triplicados, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y $*P < 0,05$).

Con las medidas obtenidas es posible calcular el grado de entrecruzamiento. En la **Figura 31** se muestran los valores obtenidos para las muestras en donde claramente se identifica un aumento de la densidad de entrecruzamiento al incorporar Cu(II) al material, esto verifica la formación de entrecruzamientos físicos por la coordinación de Cu(II) el cual refuerza la red y corrobora los resultados obtenidos y asociados por esta modificación en la composición del gel.¹⁰⁸

5.2.8. Propiedades mecánicas.

La compresión es una herramienta para estudiar cómo responde la estructura del hidrogel cuando se somete a una carga mecánica. El módulo de compresión cuantifica la rigidez del material frente a una deformación uniaxial. Este parámetro refleja la facilidad o dificultad con la que la red polimérica se deforma bajo una carga aplicada. Una mayor rigidez suele indicar una red con una mayor restricción al movimiento de las cadenas poliméricas. Los ensayos de compresión son realizados para los hidrogeles formulados con distintas proporciones de GelMA y GelTA, tanto en presencia como en ausencia de iniciador, además de sin y con Cu(II). Graficando esfuerzo (Pa) v/s deformación (%), permitiendo comparar la rigidez mecánica y el comportamiento elástico de las diferentes formulaciones.

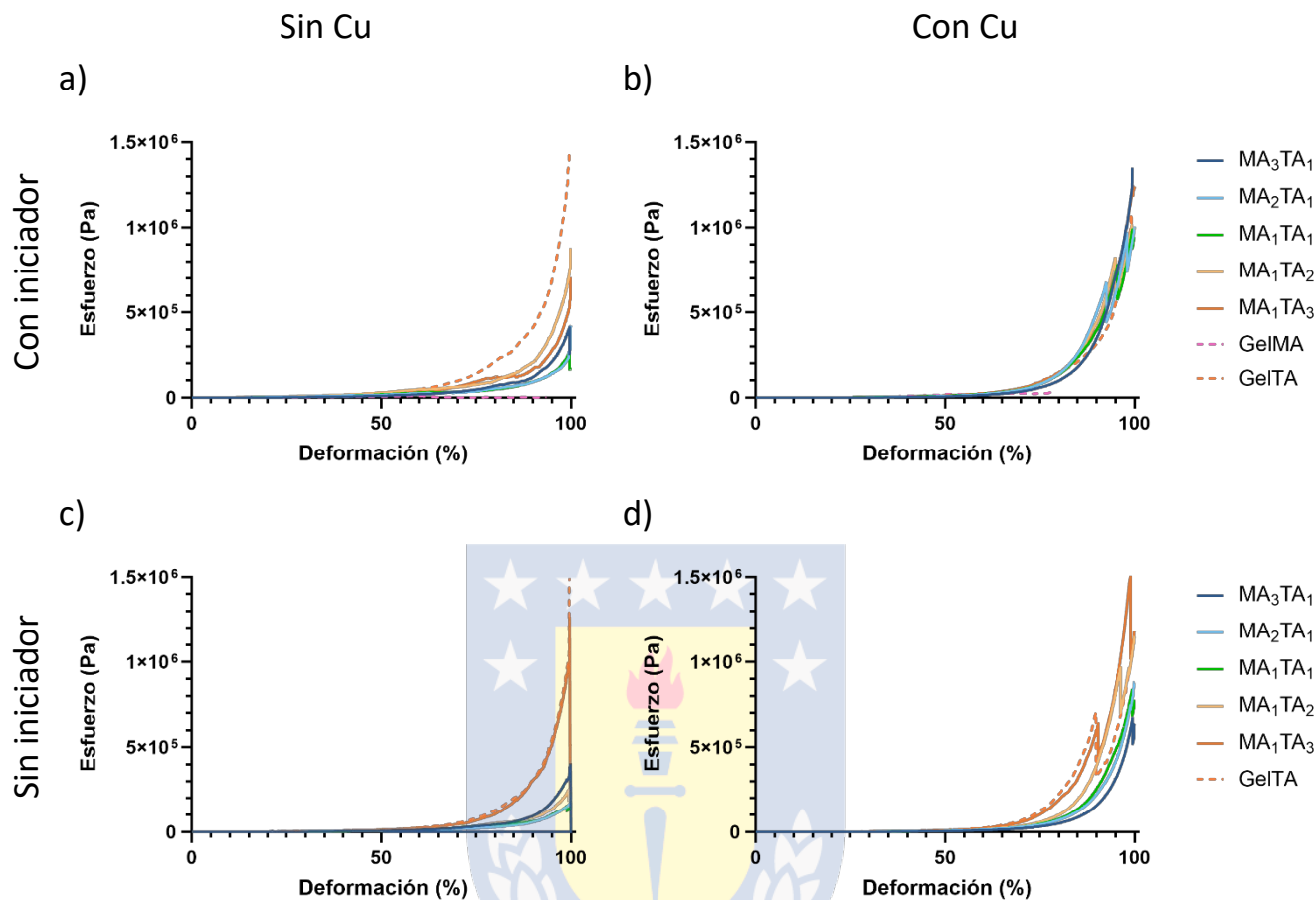


Figura 32: Ensayos de compresión de los hidrogeles a) Con iniciador sin Cu(II), b) Con iniciador Con Cu(II), c) Sin iniciador sin Cu(II) y d) Sin iniciador con Cu(II).

En la **Figura 32a** los hidrogeles con mayores proporciones de GelTA exhiben el mayor esfuerzo máximo, alcanzando valores cercanos a $1,3 \times 10^6$ Pa al 100 % de deformación, lo que indica una red más rígida y resistente a la compresión. A medida que aumenta la proporción de GelMA en las formulaciones se observa una disminución progresiva del esfuerzo requerido, con el sistema MA₃TA₁ presentando los valores más bajos ($\sim 4 \times 10^5$ Pa). En la **Figura 32b**, se observa un incremento generalizado del esfuerzo en todas las formulaciones mixtas respecto a sus análogas sin Cu(II). Este efecto de refuerzo mecánico es particularmente evidente en las formulaciones MA₁TA₂ y MA₁TA₃, que alcanzan esfuerzos cercanos a $1,1 \times 10^6$ Pa, comparado con los $\sim 7 \times 10^5$ Pa observados sin Cu. Este aumento se atribuye a la formación de interacciones de coordinación entre los grupos disulfuros de GelTA y los iones Cu(II) que actúan como puntos de reticulación adicionales, incrementando la resistencia a la compresión. En contraste, el hidrogel de GelMA puro no muestra una variación significativa, lo que

confirma que la contribución del Cu(II) depende directamente de la presencia de GelTA en la red.

En ausencia de iniciador (**Figura 32c y d**), tanto en la condición Sin Cu(II) como Con Cu(II), los esfuerzos máximos son menores en comparación con las formulaciones fotopolimerizadas, reflejando una menor densidad de reticulación. Sin embargo, la tendencia relacionada a la composición se mantiene: los hidrogeles con mayores proporciones de GelTA presentan los mayores esfuerzos. La incorporación de Cu(II) en ausencia de iniciador genera un aumento menos intenso del esfuerzo (aproximadamente un 20–30 %), lo que sugiere que, aunque las interacciones coordinativas contribuyen al refuerzo mecánico, la fotopolimerización es esencial para maximizar la estabilidad estructural y la rigidez de la red.

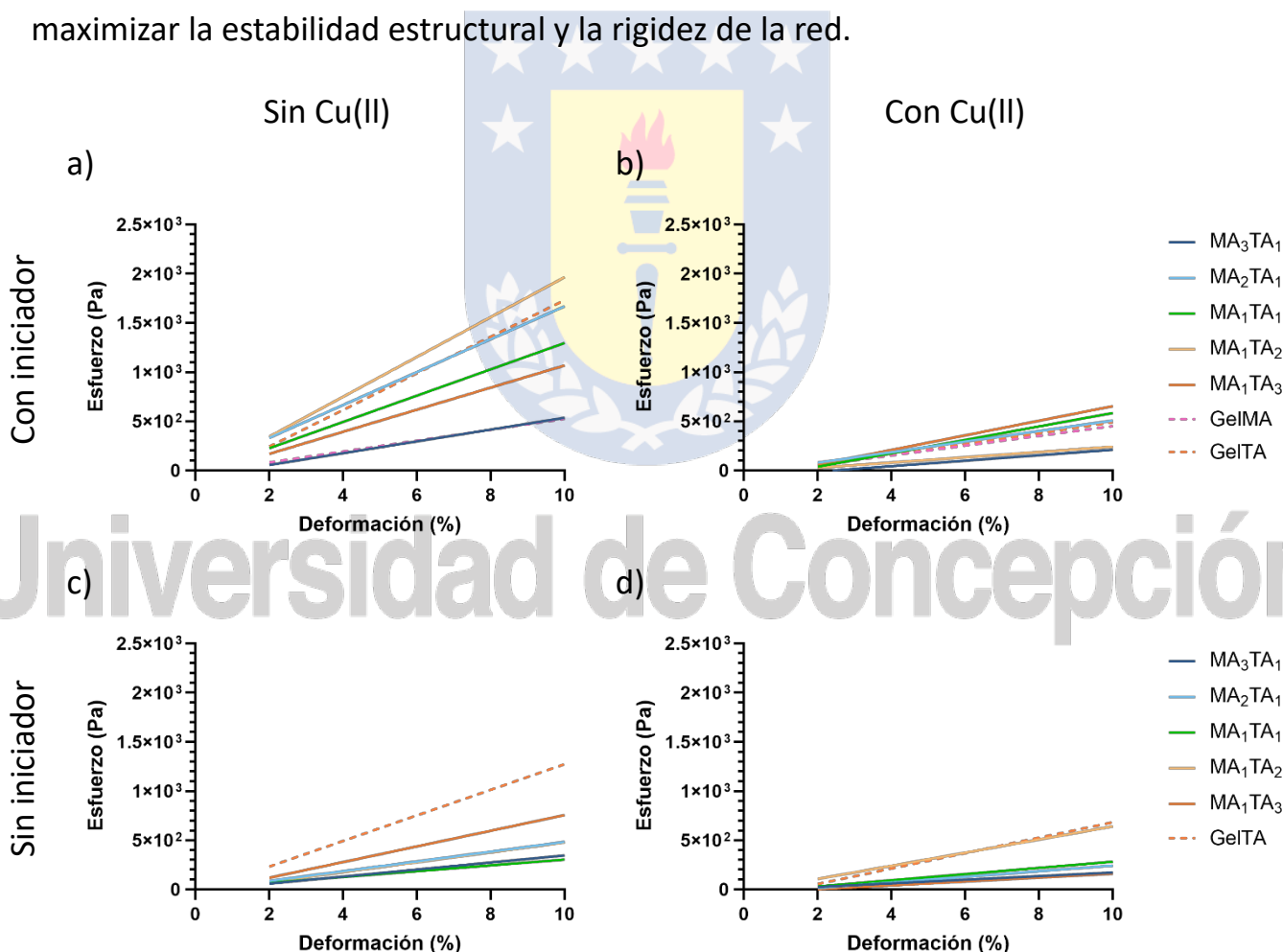


Figura 33: Segmento de las curvas de esfuerzo/deformación del 2 al 10 % de deformación para el cálculo de los módulos de Young, con sus respectivas aproximaciones lineales a) Mezclas con iniciador sin Cu(II), b) Mezclas con iniciador con Cu(II), c) Mezclas sin iniciador sin Cu(II) y d) Mezclas sin iniciador con Cu(II)

Con el objetivo de cuantificar la rigidez inicial de los hidrogeles, se realizó una aproximación lineal entre el 2 y el 10 % de deformación, intervalo correspondiente a la región viscoelástica lineal. En esta región, la relación entre esfuerzo y deformación permanece aproximadamente lineal, permitiendo determinar el módulo de Young de compresión como la pendiente de la curva esfuerzo-deformación. A diferencia de las deformaciones elevadas, donde intervienen fenómenos como el endurecimiento por deformación y el colapso progresivo de la estructura porosa.^{109, 110}

Para realizar el cálculo de la regresión lineal y determinar el módulo de Young de compresión de cada una de las muestras es necesario trabajar los datos para eliminar datos negativos, que son causados cuando la muestra aún no está en completo contacto con el plato de compresión. Luego, en el intervalo elegido, se realiza la regresión lineal, de esta manera con el valor de la pendiente es posible obtener el módulo. **(Figura 33)**



Universidad de Concepción

Tabla 6: Módulo de para hidrogeles con iniciador sin y con Cu(II)

CON IG	Módulo de Young (Pa)	
	Sin Cu	Con Cu
MA ₃ TA ₁	5999 ± 22	2778 ± 28
MA ₂ TA ₁	16720 ± 14	5353 ± 18
MA ₁ TA ₁	13370 ± 54	6833 ± 18
MA ₁ TA ₂	20250 ± 57	2670 ± 19
MA ₁ TA ₃	11230 ± 12	7412 ± 32
GelMA	5532 ± 21	4973 ± 13
GelTA	18600 ± 38	5537 ± 27

Tabla 7: Módulo de para hidrogeles sin iniciador sin y con Cu(II)

SIN IG	Módulo de Young (Pa)	
	Sin Cu	Con Cu
MA ₃ TA ₁	3583 ± 11	1831 ± 14
MA ₂ TA ₁	4958 ± 15	2847 ± 16
MA ₁ TA ₁	2944 ± 12	3138 ± 14
MA ₁ TA ₂	5025 ± 29	6667 ± 16
MA ₁ TA ₃	7959 ± 39	1976 ± 15
GelTA	13010 ± 58	7844 ± 19

En la **Tabla 6** y **Tabla 7** se presentan los valores obtenidos para los módulos de Young en donde se puede observar que en prácticamente todas las formulaciones existe un incremento importante del módulo cuando se incorpora el iniciador, lo que evidencia que la fotopolimerización favorece la formación de una red covalente más rígida y con una mayor capacidad para restringir el movimiento de las cadenas poliméricas. La única muestra en la cual disminuye el módulo con la incorporación de iniciador es en

GelTA lo cual se puede atribuir en que no se alcanza todo el entrecruzamiento por la interacción entre los radicales.

Al comparar las formulaciones muestran una clara dependencia con la relación GelMA/GelTA. En los hidrogeles con iniciador y sin Cu(II), el mayor módulo corresponde a MA_1TA_2 , GelTA y MA_2TA_1 , mientras que GelMA presenta uno de los valores más bajos (5532 Pa). Para las muestras sin iniciador se observa un comportamiento similar, en donde el mayor modulo lo tiene GelTA, MA_1TA_3 y MA_1TA_2 . Esta tendencia indica que el aumento del contenido de GelTA incrementa la rigidez inicial de la red. La modificación con ácido tióctico probablemente introduce interacciones intermoleculares adicionales que restringen la movilidad de las cadenas y favorecen una mayor resistencia frente a pequeñas deformaciones. Mas aún no se logra observar la misma tendencia en todas las composiciones, especialmente para altos contenidos de GelMA, lo cual puede indicar que el refuerzo no depende únicamente de las proporciones de GelTA en los hidrogeles, sino que debe existir una sinergia entre ambas redes para lograr su optimo desempeño.

La incorporación de Cu(II) disminuye significativamente los módulos tanto con o sin iniciador. Para las muestras con iniciador se observa una disminución en los módulos de todas las formulaciones, especialmente las que contienen GelTA, en contraste, GelMA, presenta la menor disminución en el módulo, lo cual en primera instancia nos indica que la disminución está directamente relacionada con la estructura de GelTA, en este caso específicamente con los disulfuros. La disminución en los módulos también se encuentra presente en las muestras sin iniciador, más aún hay 2 muestras que presentan un aumento en los módulos (MA_1TA_1 y MA_1TA_2), lo cual apoya la idea de que hay algunas composiciones con mejor desempeño.

A bajas deformaciones las coordinaciones podrían favorecer una redistribución local de las tensiones o modificar la organización de la red, dando lugar a una respuesta inicial menos rígida. Esto, considerando que el Cu(II) interacciona con los disulfuros de GelTA, y que ambas son interacciones que pueden reordenarse (enlace covalente dinámico y coordinación del ion, respectivamente)¹¹¹.

Al estar expuestos a mayores deformaciones los materiales tienden a mejorar sus propiedades mecánicas al adicionar Cu(II), es decir al estar expuestas a un esfuerzo no

tienen la misma libertad para reordenarse por lo cual actúan como refuerzo mecánico al formar más puntos de entrecruzamiento.

5.2.9. Microscopia electrónica de barrido (SEM).

Para el estudio de la superficie del material obtenido, hidrogel de gelatinas modificadas, se realiza el estudio de la superficie a través de microscopia electrónica de barrido, además de espectroscopia de energía dispersa (EDS) con el cual se realiza el análisis elemental y un mapeo de la superficie para ver la distribución de los elementos asociados a cada superficie de las muestras liofilizadas. Los análisis SEM nos revelan la morfología de los hidrogeles de distintas formulaciones MA_xTA_y con y sin iniciador y aumentos (con barras de aumento de 500, 100 y 50 μm). Las micrografías demuestran claramente que la morfología de los poros está fuertemente influenciada por el contenido relativo de GelMA y GelTA.

Para los hidrogeles sin iniciador **Figura S8**: con un aumento de 500 μm , todas las composiciones exhiben una red porosa bien definida característica de los hidrogeles liofilizados. Se observa que las formulaciones que contienen mayor proporción de GelTA presentan poros más pequeños, lo cual se puede deber a un mayor entrecruzamiento. Y con mayores aumentos de 100 y 50 μm se verifica la tendencia, además de mostrar poros de paredes lisas y algunos interconectados. Para los hidrogeles con iniciador en las micrografías de la **Figura S9**: permiten evaluar el efecto del iniciador en la organización morfológica, la homogeneidad y el desarrollo de la red porosa de los hidrogeles duales. En comparación con las muestras sin iniciador, los hidrogeles aquí analizados exhiben una estructura más definida, con una distribución de poros más uniforme, evidenciando un mayor entrecruzamiento asociada a la fotopolimerización de GelMA. La morfología observada demuestra que la incorporación del fotoiniciador induce una reticulación más eficiente del GelMA, mejorando la uniformidad estructural y la definición de los poros. Las formulaciones con mayor contenido de GelTA logran un balance óptimo entre porosidad y densidad, mientras que aquellas con exceso de GelMA presentan una microestructura más heterogénea, con tendencia a formar dominios. A modo de resumen se presentan las imágenes SEM con un aumento de 50X en la **Tabla 8** con todos los hidrogeles con barras de aumento de 500 μm , por otro lado, se presentan los EDS en la **Tabla 9**.

Tabla 8: SEM de los hidrogeles MA_xTA_y liofilizados

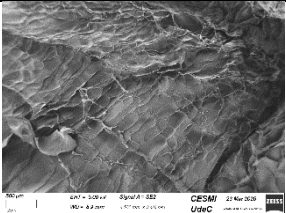
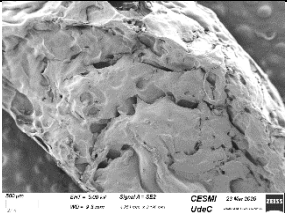
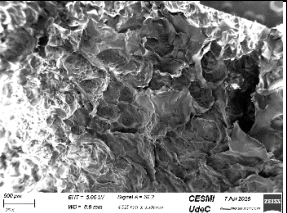
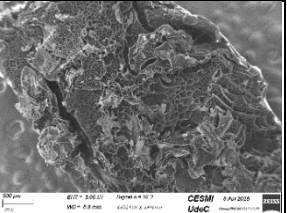
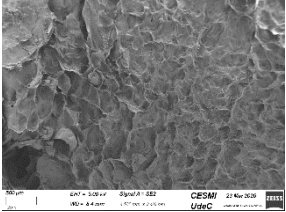
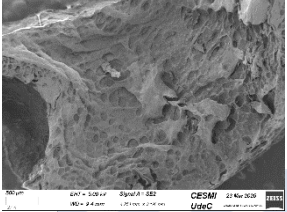
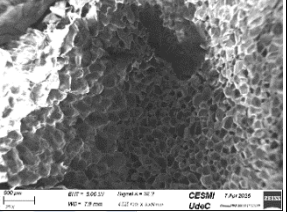
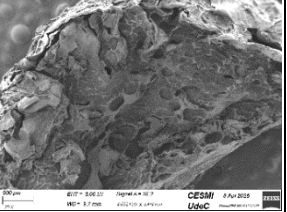
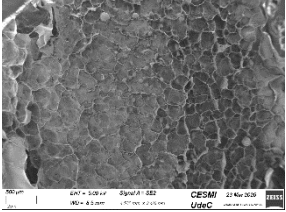
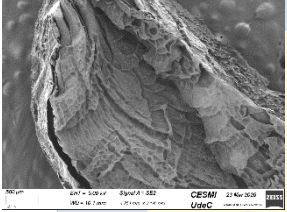
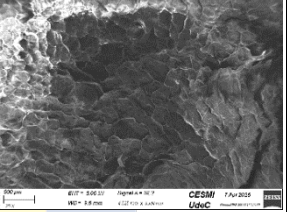
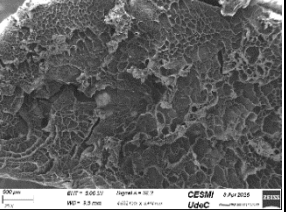
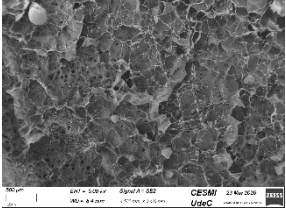
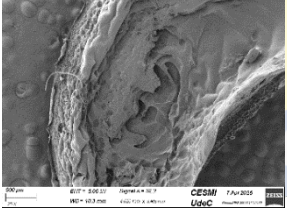
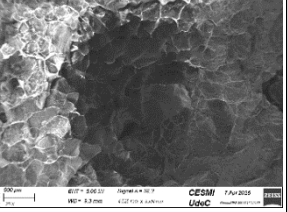
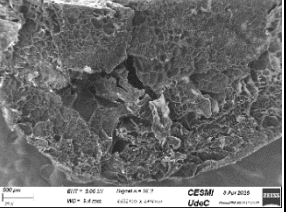
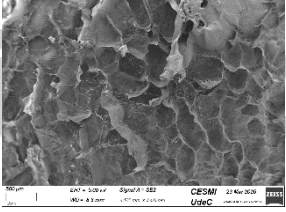
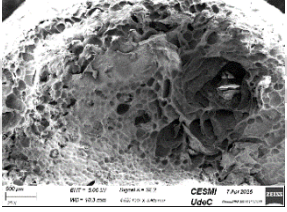
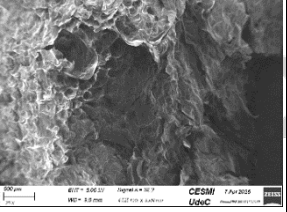
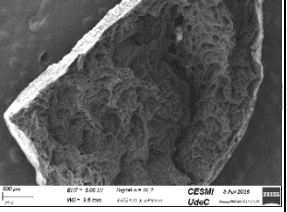
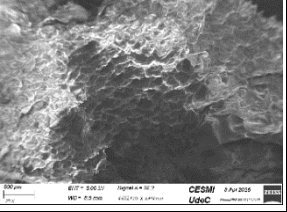
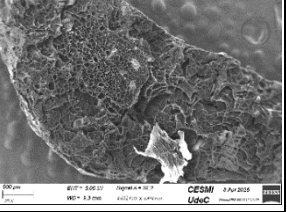
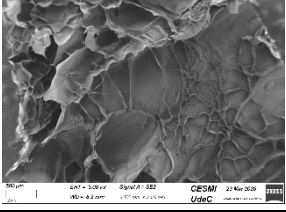
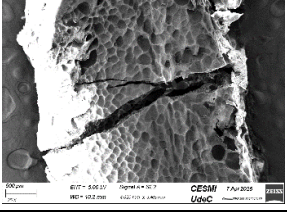
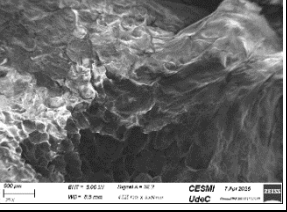
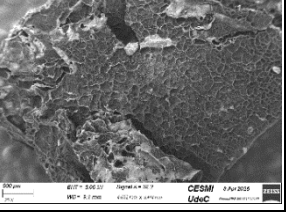
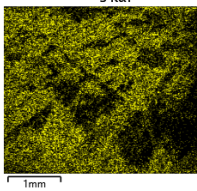
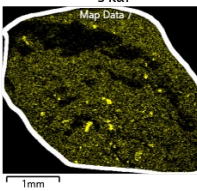
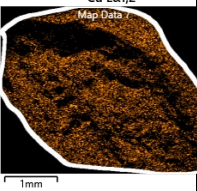
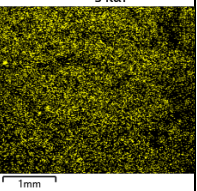
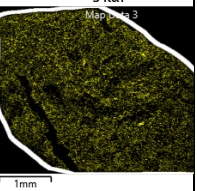
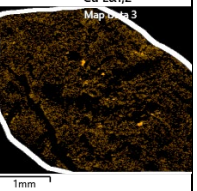
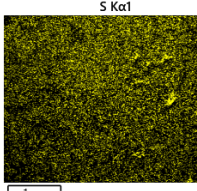
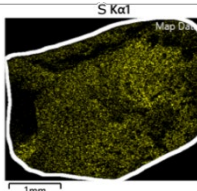
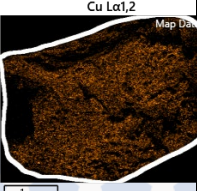
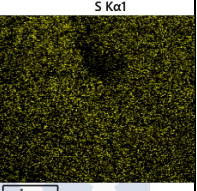
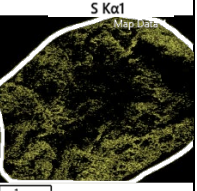
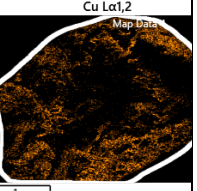
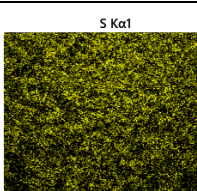
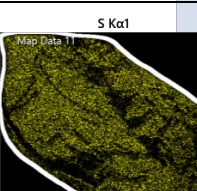
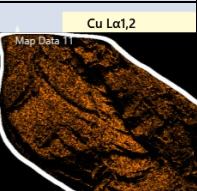
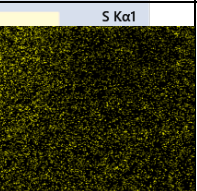
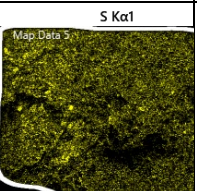
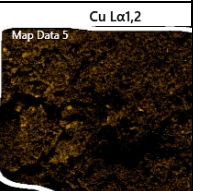
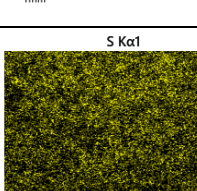
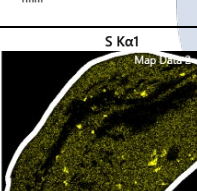
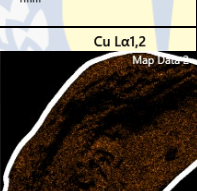
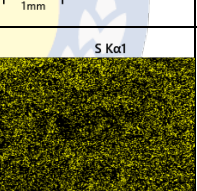
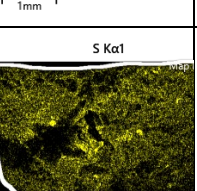
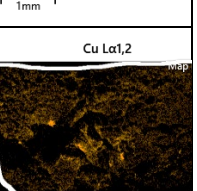
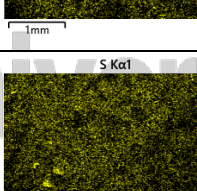
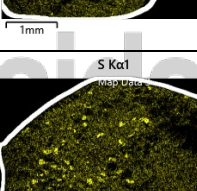
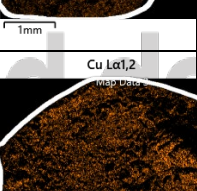
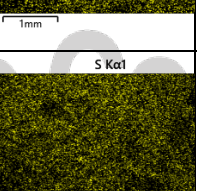
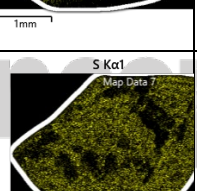
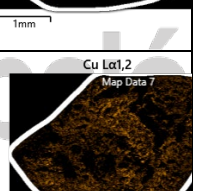
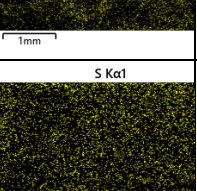
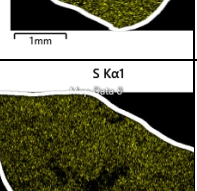
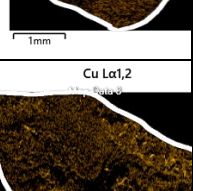
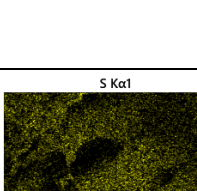
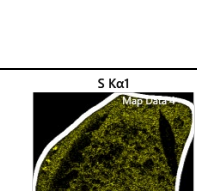
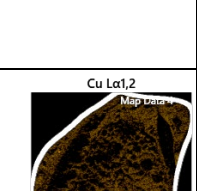
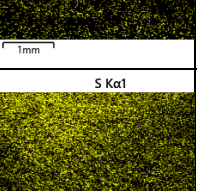
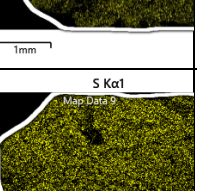
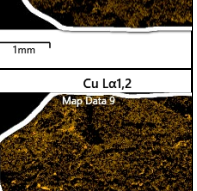
	Sin IG		Con IG	
	Sin Cu(II)	Con Cu(II)	Sin Cu(II)	Con Cu(II)
MA_3TA_1				
MA_2TA_1				
MA_1TA_1				
MA_1TA_2				
MA_1TA_3				
GeIMA				
GeITA				

Tabla 9: Mapeo elemental de S y Cu para los hidrogeles MAXTAy liofilizados.

	Sin IG			Con IG		
	Sin Cu(II)	Con Cu(II)		Sin Cu(II)	Con Cu(II)	
	EDS S	EDS S	EDS Cu	EDS S	EDS S	EDS Cu
MA ₃ TA ₁						
MA ₂ TA ₁						
MA ₁ TA ₁						
MA ₁ TA ₂						
MA ₁ TA ₃						
GelMA						
GelTA						

5.2.10. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la estabilidad térmica y la composición de sistemas hidrogel mediante el seguimiento de la pérdida de masa en función de la temperatura. Este método permite identificar distintas etapas de degradación, incluyendo la evaporación del agua y la descomposición de polímeros.

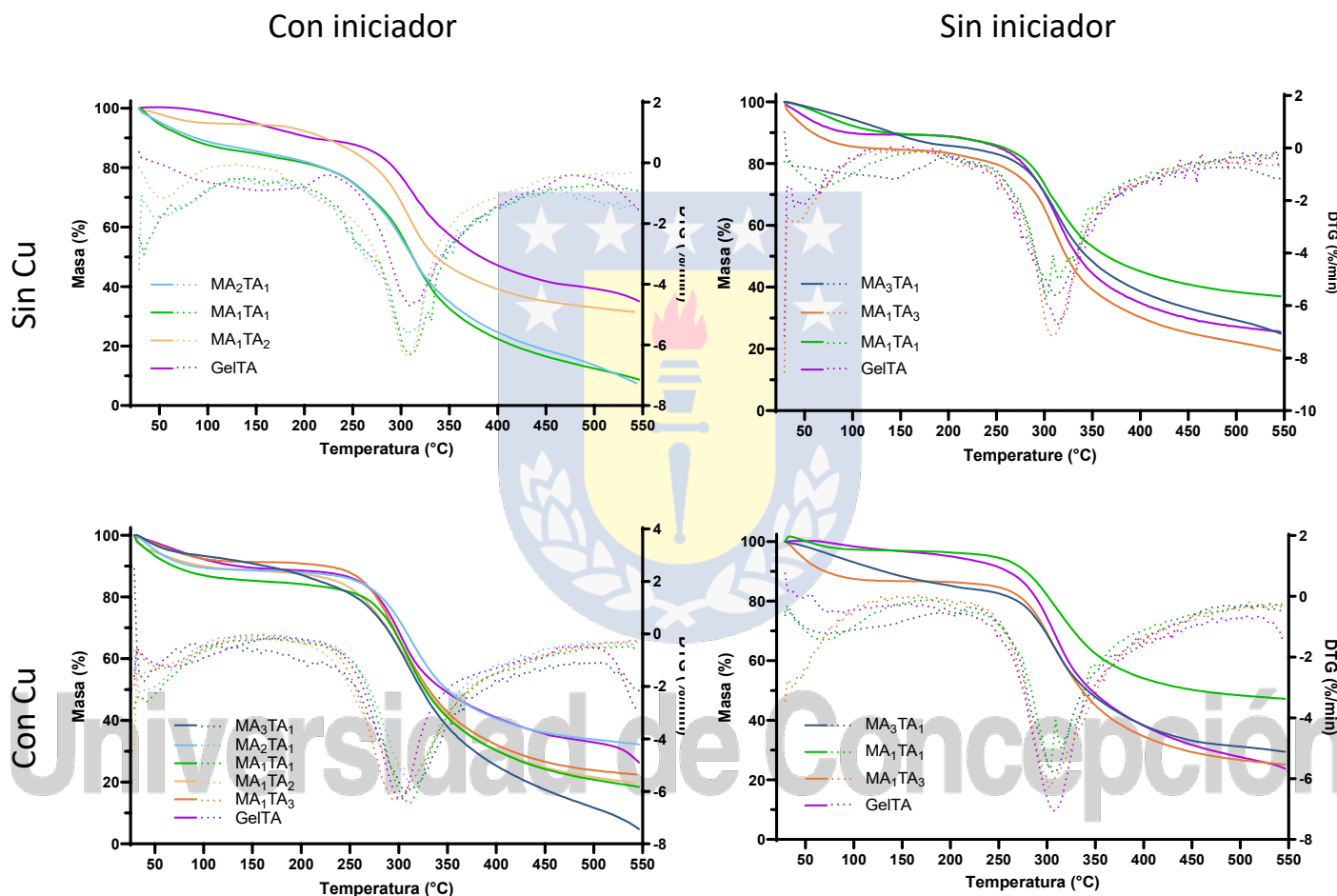


Figura 34: análisis termogravimétrico de los hidrogeles secos por medio de liofilización

El análisis termogravimétrico se realizó con el propósito de evaluar la estabilidad térmica de los hidrogeles liofilizados y determinar el efecto de la composición polimérica, la incorporación de Cu(II) y la fotopolimerización sobre los mecanismos de degradación térmica (**Figura 34**). Las curvas de TGA muestran la pérdida de masa en función de la temperatura, mientras que las curvas derivadas (DTG) permiten identificar con mayor precisión las temperaturas correspondientes a la máxima velocidad de degradación de cada etapa.

La primera pérdida de masa ocurre aproximadamente entre 30 y 120 °C y corresponde principalmente a la eliminación del agua físicamente absorbida y del agua fuertemente asociada mediante enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo, amino y carboxilo presentes en la matriz polimérica. En todas las formulaciones esta pérdida representa una fracción relativamente pequeña de la masa total, indicando que el proceso de liofilización eliminó la mayor parte del agua libre.

Las curvas DTG muestran un único pico dominante centrado aproximadamente entre 300 y 320 °C, correspondiente a la ruptura de la estructura proteica de la gelatina, incluyendo la escisión de enlaces peptídicos, la degradación de las cadenas laterales de aminoácidos y la descomposición progresiva de la red polimérica. La posición relativamente constante del máximo de degradación indica que la modificación química de la gelatina mediante metacrilación o incorporación de ácido tióctico no altera significativamente el mecanismo fundamental de degradación térmica de la proteína.

5.2.11. Citotoxicidad

5.2.11.1. Lixiviado de cada uno de los geles tanto con y sin Cu(II) (Línea celular fibroцитos)

Para este estudio se limitaron las muestras utilizadas, las muestras elegidas son MA₂TA₁, MA₁TA₁, MA₁TA₂, GelMA y GelTA, todas con iniciador. Estas muestras son estudiadas cargadas con Cu(II).

El lixiviado de cada gel se recuperó tras 24, 48 y 72 horas en PBS, y cada muestra se montó por separado para que los cambios de volumen debidos a la ingesta de alícuotas no interfirieran. Asumiendo una liberación máxima de 100 µM de Cu(II) en la solución, se tomaron alícuotas para realizar soluciones de 10, 50 y 100 µM con un control de solo PBS en los cultivos celulares. Las células estuvieron expuestas a las soluciones de lixiviación en las diluciones mencionadas durante 24 horas, 48 horas y 72 horas, y se evaluaron la actividad metabólica y el contenido de ADN dsDNA (**Figura 35**). La actividad metabólica celular se determinó utilizando el reactivo AlamarBlue, que se añadió directamente a los pozos que contenían las células y el medio de cultivo. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la actividad metabólica relativa respecto a la del control no tratado (**Figura 35**). Además, el contenido de ADN determinado mediante el ensayo de Picogreen para evaluar cualquier posible efecto

citotóxico no muestra diferencias significativas entre las concentraciones analizadas. Aunque los hidrogeles cargados de Cu(II) mostraron una clara actividad antibacteriana, el equilibrio entre liberación de iones y citocompatibilidad sigue siendo un parámetro crítico de diseño. Los resultados indican que la viabilidad celular se preserva dentro de una ventana de concentración definida, lo que sugiere que se requiere un control cuidadoso de la carga y liberación de Cu(II) dependiendo de la aplicación biomédica prevista. El comportamiento de liberación a largo plazo y las interacciones célula-material no se abordaron completamente en el presente estudio y merecen una investigación adicional.

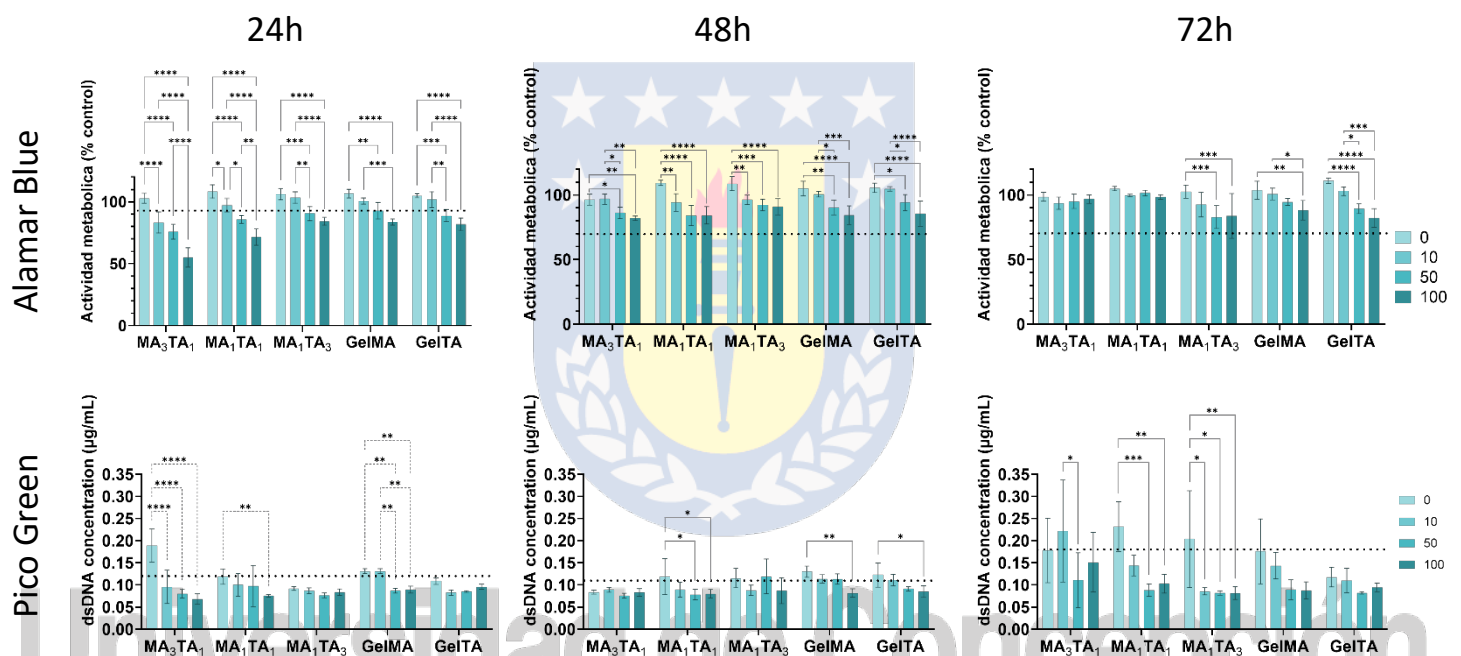


Figura 35: Análisis de citotoxicidad verde a las 24 horas, 48 horas y 72 horas con A) Alamar Blue y B) Pico Green ($n=4$, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y $*P < 0,05$).

Para que el material se considere citocompatible, debe tener una actividad metabólica superior al 70% (ISO 10993-5)¹¹², que es observable para todas las concentraciones de lixiviado utilizadas. Resultados del azul de Alamar presentados a una concentración de 100 mM, cabe mencionar que 24 horas es cuando el gel produce la mayor liberación, siendo este un punto crítico al considerar poner el hidrogel en contacto con células. Cabe señalar que los hidrogeles con un contenido más alto de GelTA son capaces de coordinar el catión metálico y mantenerlo dentro de su estructura, moderando su liberación, lo cual se observa en cada una de las pruebas. Al comparar los tiempos en que se toma cada una de las alícuotas (24, 48 y 72 h)(**Figura 36**) se

observa que el lixiviado tomado tras 24 horas es el que presenta el mayor efecto en las diferentes concentraciones utilizadas en ambos análisis. Este efecto puede interpretarse como resultado del fenómeno de difusión de Cu(II), en primer lugar, durante las primeras 24 horas, la liberación de Cu(II) desde la superficie. Más allá de la difusión y liberación de iones Cu(II) absorbidos hacia el interior, estos iones también se liberan desde la interfaz agua/hidrogel.

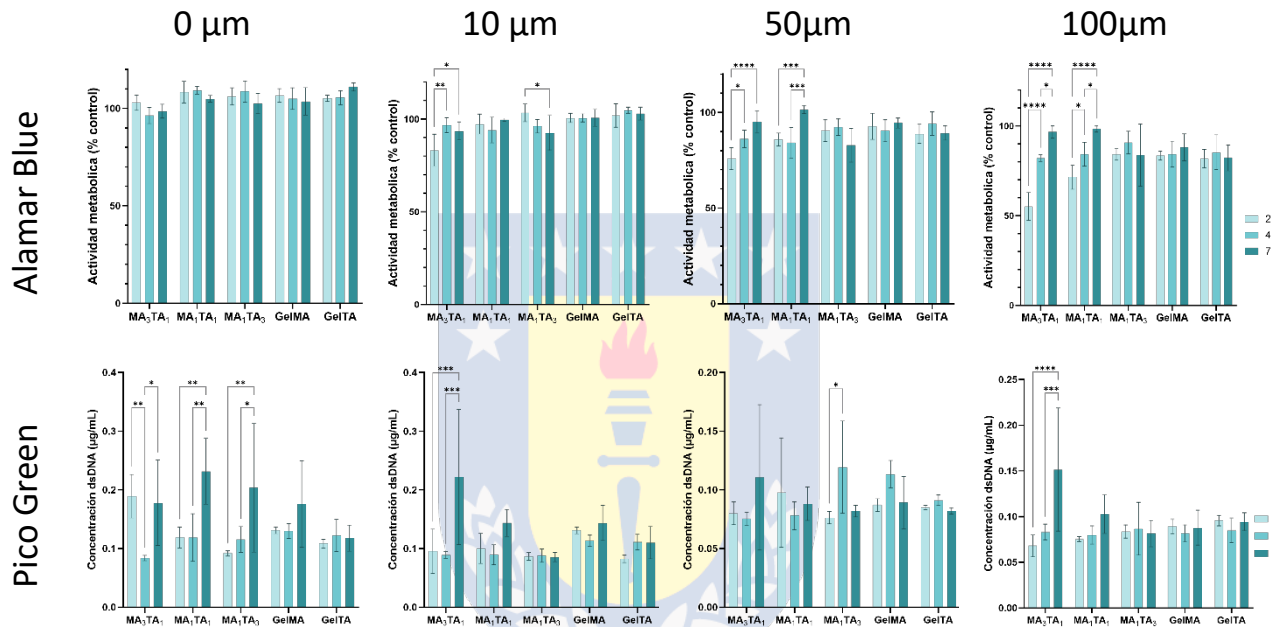


Figura 36: Análisis de citotoxicidad con azul de Alamar a a) 0 μM , b) 10 μM , c) 50 μM y d) 100 μM (cuadruplicados, análisis estadístico: prueba de Tukey ANOVA bidireccional y $*P < 0,05$).

5.2.11.2. Contacto directo y medición por medio de Kit de citotoxicidad LDH (Línea celular SK-1)

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos utilizando la densidad celular previamente optimizada para el modelo experimental y cultivadas durante 24 h en una incubadora a 37 °C con una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂ para permitir su adhesión. Posteriormente, las células fueron expuestas a los extractos de los hidrogeles durante el tiempo establecido para cada condición experimental. Paralelamente, se incluyeron controles de liberación espontánea de LDH, controles de liberación máxima mediante lisis celular y controles del medio de cultivo para corregir la actividad basal de LDH presente en el suero. Al finalizar el período de incubación, los pocillos destinados al control de liberación máxima recibieron 10 μL de buffer de lisis 10X y se incubaron durante 45 min a 37 °C para inducir la liberación total de LDH

intracelular. Posteriormente, se transfirieron 50 µL del sobrenadante de cada muestra (células sin tratamiento, células en contacto con los hidrogeles y solución sin células) a una nueva placa transparente de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 50 µL de la mezcla de reacción del kit a cada pocillo y la placa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, protegida de la luz. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 50 µL de solución de detención (Stop Solution).

La absorbancia se determinó utilizando un lector de microplacas a 490 nm, empleando 680 nm como longitud de onda de referencia para corregir el fondo instrumental. La actividad de LDH se obtuvo restando la absorbancia registrada a 680 nm de la absorbancia medida a 490 nm.

El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante la ecuación propuesta por el fabricante:

$$\% \text{Citotoxicidad} = \frac{\text{LDH}_{\text{muestra}} - \text{LDH}_{\text{espontánea}}}{\text{LDH}_{\text{máxima}} - \text{LDH}_{\text{espontánea}}} \times 100$$

Ecuación 5: Determinación de porcentaje de citotoxicidad por medio del Kit LDH.

donde:

- $\text{LDH}_{\text{muestra}}$ corresponde a la absorbancia de las células tratadas con los hidrogeles;
- $\text{LDH}_{\text{espontánea}}$ corresponde a la liberación basal de LDH de las células no lisadas;
- $\text{LDH}_{\text{máxima}}$ corresponde a la liberación máxima obtenida tras la lisis completa de las células.

Cada condición experimental se evaluó por triplicado

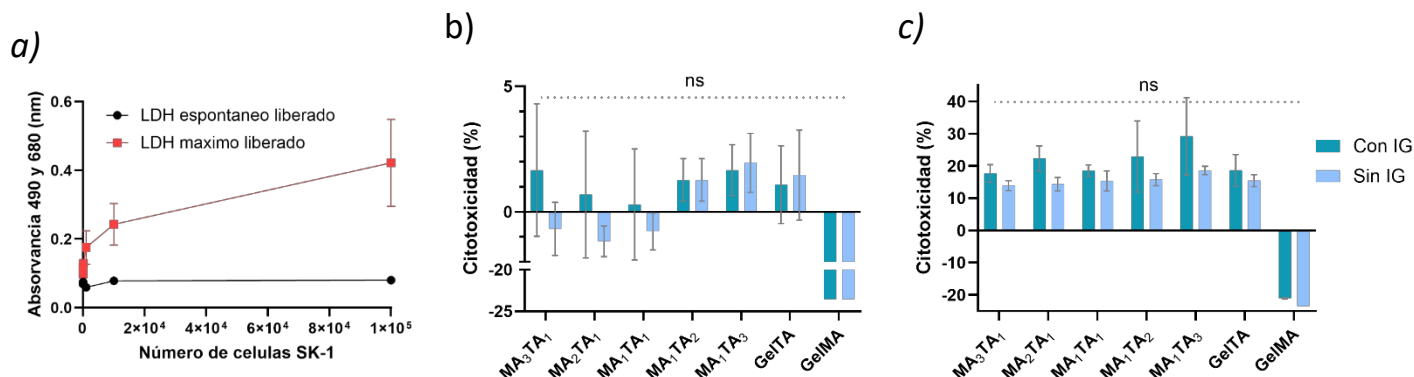


Figura 37: a) Determinación de parámetros de liberación máxima y espontanea de LDH para elección de cantidad de células optimas y la determinación de porcentajes de citotoxicidad de muestras con y sin iniciador medidas luego de sumergir por a) 1h y c) 24h.

Solo se utilizaron muestras sin Cu(II) ya que hidrogeles cargados con 0,01M de Cu(II) mostraron cambios abruptos de pH con el medio, lo cual no permite tener un ambiente adecuado para las células e introduce un factor extra que puede ser causante de muerte celular.

La determinación de los porcentajes de citotoxicidad se lleva a cabo por la medición de la absorbancia de los pocillos con cada una de las muestras y usando ese valor en la **Ecuación 10**, ecuación recomendada por el kit. Los resultados obtenidos muestran que las muestras sin iniciador presentan menores porcentajes de citotóxica en comparación a las que si tienen iniciador. En la **Figura 37** se observa la construcción del grafico con los parámetros de LDH máximo y espontaneo liberado, esto para poder realizar la selección den número de células óptimos para realizar el análisis, a ya tener un número optimo se miden las intensidades de cada una de las muestras y se procesan según el protocolo, de esta manera encontramos que

El ensayo de LDH demostró que todas las formulaciones de hidrogel mostraron una citotoxicidad insignificante luego de 1h (**Figura 37b**), manteniendo la liberación de LDH cerca del control espontáneo. No se observó un aumento significativo en el daño a la membrana con la incorporación del iniciador, lo que indica que no comprometió la citocompatibilidad. Aunque GelMA mostró valores negativos de citotoxicidad tras la normalización, estos valores no representan "citotoxicidad negativa", sino que indican la liberación de LDH por debajo del control espontáneo, lo que comúnmente se atribuye a la variabilidad experimental o a un daño menor en la membrana basal. En general, todas las formulaciones pueden considerarse altamente citocompatibles.

Al evaluar la citotoxicidad luego de 24h (**Figura 37c**), todas las formulaciones mostraron un aumento moderado en la liberación de LDH, alcanzando aproximadamente un 15–30 % de citotoxicidad. Es importante destacar que este aumento se produjo de forma uniforme en todos los grupos experimentales, mientras que el análisis estadístico siguió indicando que no había diferencias significativas entre las formulaciones. Este comportamiento homogéneo sugiere que el aumento de la LDH extracelular está más probablemente asociado a cultivos celulares prolongados, envejecimiento celular o agotamiento de nutrientes, en lugar de con toxicidad inducida por hidrogel, además, que la liberación de Cu(II) en periodos largos se encuentra en valores bajos, los cuales pueden permitir que se tenga baja citotoxicidad. Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas entre hidrogeles con y sin IG confirma que la incorporación de IG no afecta negativamente a la integridad de la membrana, lo que apoya la excelente citocompatibilidad de estos hidrogeles de doble red.

5.2.12. Ensayo antimicrobiano

Para este estudio, se utilizó el ensayo de inhibición de halo, adaptado de la [prueba de Kirby-Bauer](#),¹¹³ con la presencia de un halo de inhibición que indica actividad antibacteriana y la ausencia de halo que indica ausencia de actividad. *E. coli* y *S. epidermidis* fueron seleccionadas como bacterias Gramnegativas y Grampositivas representativas comúnmente asociadas a infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos. Todas las muestras que contenían Cu(II) liberaron estos iones antibacterianos, lo cual fue más visible con *S. epidermidis* en la **Figura 38**. Esto puede deberse a que tiene una membrana bacteriana más sencilla que permite que el Cu(II) penetre y ejerza un efecto antibacteriano. En comparación con *E. coli*, en la que el Cu(II) no penetra y, por tanto, no causa muerte celular⁹³. Este efecto es perceptible en concentraciones más altas de Cu(II). Los antibióticos utilizados como controles fueron penicilina/estreptomicina (*E. coli*) y vancomicina (*S. epidermidis*), que presentaron halos de inhibición como punto de referencia para el efecto de los geles. Todas las muestras estaban dispuestas en la plancha como se muestra en la **Figura 38**. El rendimiento antibacteriano de los hidrogeles fue más pronunciado frente a la cepa Gram positiva *S. epidermidis*, mientras que se observó una eficacia limitada frente a la *E. coli* Gram negativa en las condiciones analizadas. Este comportamiento,

comúnmente informado para sistemas basados en cobre ⁷⁵, pone de manifiesto una limitación de las formulaciones actuales para aplicaciones antibacterianas de amplio espectro y sugiere que podrían ser necesarias estrategias adicionales, como una mayor carga de Cu(II), agentes sinérgicos o modificaciones superficiales, para potenciar la actividad contra bacterias Gram negativas.

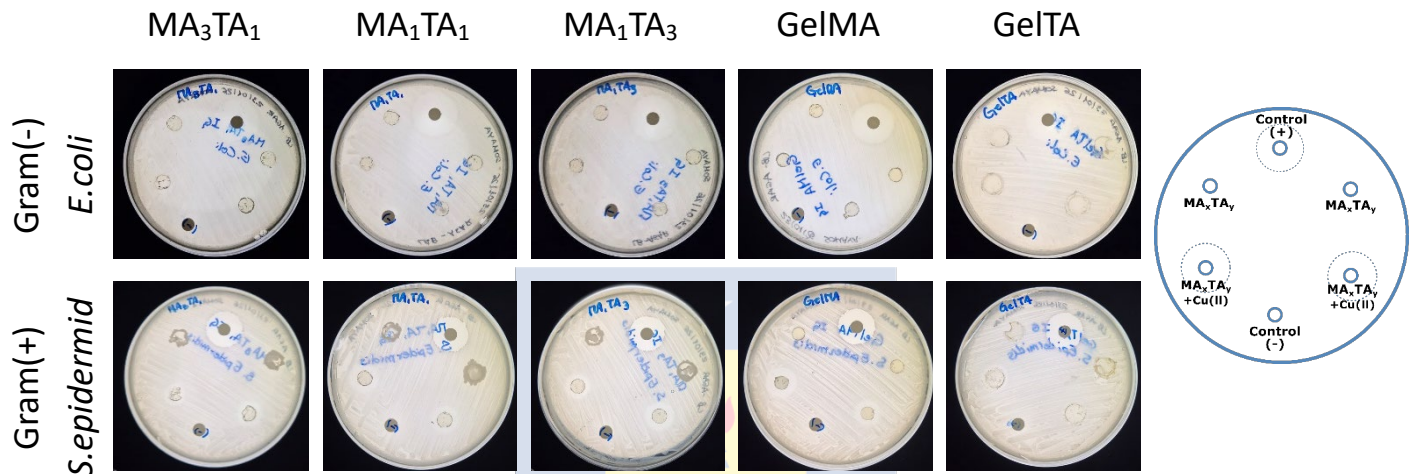


Figura 38: Propiedades antibacterianas por halo de inhibición con *E. coli* y *S. epidermidis* (cuadruplicado).

6. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió desarrollar y caracterizar exitosamente un nuevo sistema de hidrogeles de red dual basado en GelMA y GelTA, incorporando además Cu(II) como agente de coordinación para generar un mecanismo adicional de reforzamiento físico. La estrategia propuesta permitió integrar tres mecanismos de estabilización dentro de una misma arquitectura polimérica: una red covalente permanente formada mediante la fotopolimerización de los grupos metacrilato de GelMA, una red covalente dinámica originada por los grupos 1,2-ditiolano presentes en GelTA y una red de coordinación metal-ligando inducida por la incorporación de Cu(II). La combinación de estos mecanismos dio lugar a hidrogeles con propiedades estructurales, mecánicas y biológicas superiores a las obtenidas mediante redes convencionales de un único tipo de entrecruzamiento.

La síntesis de las gelatinas modificadas fue confirmada mediante espectroscopía ATR-FTIR, resonancia magnética nuclear y análisis de fluorescencia, demostrando la incorporación exitosa de grupos metacrilato y ácido tióctico sobre las cadenas de gelatina. Los grados de funcionalización obtenidos (60%) evidenciaron que ambas modificaciones se realizaron de forma eficiente, proporcionando los grupos reactivos necesarios para la formación de la red dual y estableciendo una plataforma adecuada para el posterior desarrollo de los hidrogeles.

Los estudios de absorción y liberación de Cu(II) demostraron que la composición del hidrogel influye directamente sobre la capacidad de coordinación del catión metálico. Las formulaciones con mayor contenido de GelTA presentaron una mayor capacidad de retención de Cu(II), confirmando que los grupos derivados del ácido tióctico participan activamente en la interacción con el metal. Esta mayor coordinación permitió modular la liberación de Cu(II), aspecto especialmente relevante para aplicaciones biomédicas donde resulta fundamental mantener un equilibrio entre bioactividad y citocompatibilidad.

Los resultados reológicos demostraron que la fotopolimerización constituye el principal mecanismo responsable de la rápida formación de la red covalente y del incremento inicial del módulo de almacenamiento. Sin embargo, la presencia de GelTA aportó un comportamiento adicional asociado a la reorganización dinámica de la red mediante enlaces disulfuro y a la incorporación de radicales por parte de los

azufres, evidenciando que los grupos 1,2-ditiolano contribuyen al desarrollo progresivo de la rigidez del material incluso después de finalizada la irradiación. La combinación de GelMA y GelTA produjo un comportamiento sinérgico característico de arquitecturas de red dual, donde la coexistencia de enlaces permanentes y dinámicos permitió mejorar simultáneamente la estabilidad mecánica y la capacidad de disipación de energía.

La incorporación de Cu(II) produjo un efecto consistente sobre las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de todas las formulaciones. La disminución de la capacidad de absorción de agua, el aumento de la densidad efectiva de entrecruzamiento, el incremento del módulo de almacenamiento y la mejora de las propiedades de compresión confirman que el catión metálico actúa como un mecanismo adicional de reticulación física mediante enlaces de coordinación. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la coordinación Cu(II)-polímero incrementa la restricción del movimiento de las cadenas y refuerza la arquitectura tridimensional del hidrogel sin modificar el mecanismo fundamental de degradación térmica de la matriz proteica.

Los ensayos de autorrecuperación reológica demostraron que los hidrogeles presentan capacidad para recuperar parcialmente sus propiedades viscoelásticas tras deformaciones elevadas. Este comportamiento fue más evidente en las formulaciones que contenían GelTA y Cu(II), indicando que las interacciones dinámicas introducidas por los enlaces disulfuro y los complejos de coordinación favorecen la reorganización de la red después de la deformación. Aunque la recuperación no fue completa, los resultados evidencian que la combinación de enlaces covalentes permanentes y enlaces reversibles constituye una estrategia eficaz para aumentar la resiliencia del material.

Los análisis morfológicos mostraron estructuras porosas e interconectadas adecuadas para aplicaciones en ingeniería de tejidos, mientras que el análisis elemental confirmó una distribución homogénea del azufre y del cobre dentro de la matriz, indicando que tanto la funcionalización química como la incorporación del metal ocurrieron de manera uniforme. Por otra parte, el análisis termogravimétrico demostró que las modificaciones químicas introducidas no alteran significativamente el mecanismo de degradación térmica de la gelatina, manteniendo una estabilidad térmica compatible con las condiciones de procesamiento y aplicación previstas.

Desde el punto de vista biológico, los hidrogeles mostraron un comportamiento altamente prometedor. Los ensayos de citotoxicidad mediante Alamar Blue, PicoGreen y LDH evidenciaron que la viabilidad celular se mantiene dentro de los límites establecidos para biomateriales citocompatibles cuando la liberación de Cu(II) es adecuadamente controlada para fibroцитos humanos y células de pez SK-1. Paralelamente, la incorporación del cobre confirió una actividad antimicrobiana efectiva frente a las cepas evaluadas, demostrando que es posible combinar funcionalidad biológica y citocompatibilidad mediante un adecuado diseño de la red polimérica y de la concentración de Cu(II).

En conjunto, los resultados obtenidos validan la hipótesis planteada y demuestran que la combinación sinérgica de una red covalente fotopolimerizada basada en GelMA, una red dinámica formada por GelTA y un sistema de coordinación con Cu(II) constituye una estrategia eficaz para el desarrollo de hidrogeles multifuncionales. La arquitectura obtenida permitió mejorar simultáneamente las propiedades mecánicas, la estabilidad estructural, la capacidad de reorganización de la red y la funcionalidad biológica, superando varias de las limitaciones asociadas a hidrogeles convencionales basados en un único mecanismo de entrecruzamiento.

Finalmente, esta investigación aporta una nueva estrategia de diseño para biomateriales destinados a ingeniería de tejidos cutáneos, basada en la integración de mecanismos de entrecruzamiento covalente permanente, covalente dinámico y físico dentro de una misma red tridimensional. Los resultados obtenidos posicionan a estos hidrogeles como una plataforma versátil y prometedora para el desarrollo de andamios bioactivos con propiedades mecánicas ajustables, actividad antimicrobiana y potencial aplicación en medicina regenerativa.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Bertsch, P.; Diba, M.; Mooney, D. J.; Leeuwenburgh, S. C. G. Self-Healing Injectable Hydrogels for Tissue Regeneration. *Chemical Reviews* **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00179>
- (2) Zarrintaj, P.; Seidi, F.; Youssefi Azarfam, M.; Khodadadi Yazdi, M.; Erfani, A.; Barani, M.; Chauhan, N. P. S.; Rabiee, N.; Kuang, T.; Kucinska-Lipka, J.; et al. Biopolymer-based composites for tissue engineering applications: A basis for future opportunities. *Composites Part B: Engineering* **2023**, 258, 110701. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.110701>
- (3) Tan, S. H.; Chua, D. A. C.; Tang, J. R. J.; Bonnard, C.; Leavesley, D.; Liang, K. Design of hydrogel-based scaffolds for in vitro three-dimensional human skin model reconstruction. *Acta Biomater* **2022**, 153, 13-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.068>
- (4) Kiradzhyska, D. D.; Mantcheva, R. D. Overview of Biocompatible Materials and Their Use in Medicine. *Folia Med (Plovdiv)* **2019**, 61 (1), 34-40. DOI: 10.2478/folmed-2018-0038
- (5) Concannon, E.; Damkat-Thomas, L.; Coghlan, P.; E. Greenwood, J. Role of Skin Substitutes in Burn Wound Reconstruction. IntechOpen, 2022.
- (6) Savoji, H.; Godau, B.; Hassani, M. S.; Akbari, M. Skin Tissue Substitutes and Biomaterial Risk Assessment and Testing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2018**, 6, Review. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00086
- (7) Chaves-Rodríguez, M. I.; Calvo-Castro, L. A.; Alvarado-Meza, R.; Madrigal-Monge, O.; Ulloa-Fernández, A.; Centeno-Cerdas, C. Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos. *Revista Tecnología en Marcha* **2015**, 28 (5), 46. DOI: 10.18845/tm.v28i5.2219
- (8) Zhang, Z.; Feng, Y.; Wang, L.; Liu, D.; Qin, C.; Shi, Y. A review of preparation methods of porous skin tissue engineering scaffolds. *Materials Today Communications* **2022**, 32, 104109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104109>
- (9) Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (5), 1387-1408. DOI: 10.1021/bm200083n

- (10) Agüero, L.; Alpdagtas, S.; İlhan, E.; Zaldivar-Silva, D.; Gunduz, O. Functional role of crosslinking in alginate scaffold for drug delivery and tissue engineering: A review. *European Polymer Journal* **2021**, *160*, 110807. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110807>
- (11) Katiyar, S.; Singh, D.; Kumari, S.; Srivastava, P.; Mishra, A. Novel strategies for designing regenerative skin products for accelerated wound healing. *3 Biotech* **2022**, *12* (11). DOI: 10.1007/s13205-022-03331-y
- (12) Chelu, M.; Musuc, A. M. Advanced Biomedical Applications of Multifunctional Natural and Synthetic Biomaterials. *Processes* **2023**, *11* (9), 2696.
- (13) Chong, E. T. J.; Ng, J. W.; Lee, P.-C. Classification and Medical Applications of Biomaterials—A Mini Review. *BIO Integration* **2023**, *4* (2), 54-61. DOI: 10.15212/bioi-2022-0009
- (14) Kamata, H.; Li, X.; Chung, U.-i.; Sakai, T. Design of Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4* (16), 2360-2374. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.201500076>
- (15) Yang, J.; Yu, H.; Wang, L.; Liu, J.; Liu, X.; Hong, Y.; Huang, Y.; Ren, S. Advances in adhesive hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal* **2022**, *172*, 111241. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111241>
- (16) Thoniyot, P.; Tan, M. J.; Karim, A. A.; Young, D. J.; Loh, X. J. Nanoparticle–Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Advanced Science* **2015**, *2* (1-2). DOI: 10.1002/advs.201400010
- (17) Bharti, R.; Pal, S.; Prasad, N.; Kumar, Y.; Joseph, B.; Sharma, H.; Sahu, G. K. A Comprehensive Review on Hydrogel. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences* **2024**, 64-75. DOI: 10.31080/asps.2024.08.1070
- (18) Calafel, M. I.; Criado-Gonzalez, M.; Aguirresarobe, R.; Fernández, M.; Mijangos, C. From rheological concepts to additive manufacturing assessment of hydrogel-based materials for advanced bioprinting applications. *Materials Advances* **2025**, *6* (14), 4566-4597. DOI: 10.1039/d5ma00019j (accessed 7/22/2026).
- (19) Wang, S.; Urban, M. W. Basic physicochemical processes governing self-healable polymers†. *Polymer International* **2022**, *71* (5), 508-513, Review. DOI: 10.1002/pi.6321

- (20) Talebian, S.; Mehrali, M.; Taebnia, N.; Pennisi, C. P.; Kadumudi, F. B.; Foroughi, J.; Hasany, M.; Nikkhah, M.; Akbari, M.; Orive, G.; et al. Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering? *Advanced Science* **2019**, *6* (16), 1801664, <https://doi.org/10.1002/advs.201801664>. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.201801664> (accessed 2022/09/09).
- (21) Azmir, M. S. N. A.; Moni, M. N.; Gobetti, A.; Ramorino, G.; Dey, K. Advances in modulating mechanical properties of gelatin-based hydrogel in tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2025**, *74* (3), 215-250. DOI: 10.1080/00914037.2024.2330420
- (22) Wang, Y.; Zhang, W.; Yao, Q. Copper-based biomaterials for bone and cartilage tissue engineering. *J Orthop Translat* **2021**, *29*, 60-71. DOI: 10.1016/j.jot.2021.03.003
- (23) Wang, Z.; Cui, F.; Sui, Y.; Yan, J. Radical chemistry in polymer science: an overview and recent advances. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2023**, *19*, 1580-1603. DOI: 10.3762/bjoc.19.116
- (24) Yan, W.; de la Vega, J.; Eroğlu, Ö.; Heisenberg, L.; Wang, D. High Power Sunlight-Simulated UV-Induced Radical Polymerization: Self-Initiation and Self-Crosslinking. *Macromolecular Materials and Engineering* **2024**, *309* (5), 2300456. DOI: <https://doi.org/10.1002/mame.202300456>
- (25) Xie, H.; Yang, K. K.; Wang, Y. Z. Photo-cross-linking: A powerful and versatile strategy to develop shape-memory polymers. *Progress in Polymer Science* **2019**, *95*, 32-64, Review. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2019.05.001
- (26) Tiwari, S.; Bajpai, R.; Bag, D. S.; Dwivedi, M. Dual Crosslinking Double Network Smart Hydrogels of PVA–Borax and Crosslinked Poly(HEMA-Co-AA) With Self-Healing and Conducting Properties and Also Study of the Effect of First Network on the Double Network. *Journal of Applied Polymer Science* **2025**, *142* (47), e57815. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.57815>
- (27) Khodami, S.; Kaniewska, K.; Romanski, J.; Karbarz, M.; Stojek, Z. Amino Acid-Based Hydrogel with Interpenetrating Gelatin and Cross-Linked by Metal Ions, Providing High Stretchability and Motion Sensitivity. *ACS Omega* **2025**, *10* (12), 12062-12075. DOI: 10.1021/acsomega.4c10083

- (28) Tan, T.; Hou, Y.; Zhang, Y.; Wang, B. Double-Network Hydrogel with Strengthened Mechanical Property for Controllable Release of Antibacterial Peptide. *Biomacromolecules* **2024**, 25 (3), 1850-1860. DOI: 10.1021/acs.biomac.3c01290
- (29) Sinad, K. V. G.; Ebubechukwu, R. C.; Chu, C. K. Recent advances in double network hydrogels based on naturally-derived polymers: synthesis, properties, and biological applications. *Journal of Materials Chemistry B* **2023**, 11 (48), 11460-11482. DOI: 10.1039/d3tb00773a
- (30) Rapp, T. L.; DeForest, C. A. Visible Light-Responsive Dynamic Biomaterials: Going Deeper and Triggering More. *Advanced Healthcare Materials* **2020**, 9 (7), Review. DOI: 10.1002/adhm.201901553
- (31) Quan, L.; Xin, Y.; Wu, X.; Ao, Q. Mechanism of Self-Healing Hydrogels and Application in Tissue Engineering. *Polymers* **2022**, 14 (11), Review. DOI: 10.3390/polym14112184
- (32) Gharakhloo, M.; Karbarz, M. Autonomous self-healing hydrogels: Recent development in fabrication strategies. *European Polymer Journal* **2022**, 165, Review. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111004
- (33) Webber, M. J.; Tibbitt, M. W. Dynamic and reconfigurable materials from reversible network interactions. *Nature Reviews Materials* **2022**, 7 (7), 541-556. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00412-x>.
- (34) Dufort, B. M.; Tibbitt, M. W. Design of moldable hydrogels for biomedical applications using dynamic covalent boronic esters. *Materials Today Chemistry* **2019**, 12, 16-33. DOI: 10.1016/j.mtchem.2018.12.001
- (35) Strachota, B.; Morand, A.; Dybal, J.; Matějka, L. Control of gelation and properties of reversible diels-alder networks: Design of a self-healing network. *Polymers* **2019**, 11 (6), Article. DOI: 10.3390/polym11060930
- (36) Das, M.; Parathodika, A. R.; Maji, P.; Naskar, K. Dynamic chemistry: The next generation platform for various elastomers and their mechanical properties with self-healing performance. *European Polymer Journal* **2023**, 186, Review. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2023.111844
- (37) Zheng, S.; Liu, G. Polymeric Emissive Materials Based on Dynamic Covalent Bonds. *Molecules* **2022**, 27 (19), 6635. DOI: 10.3390/molecules27196635

- (38) Zheng, N.; Xu, Y.; Zhao, Q.; Xie, T. Dynamic Covalent Polymer Networks: A Molecular Platform for Designing Functions beyond Chemical Recycling and Self-Healing. *Chemical Reviews* **2021**, 121 (3), 1716-1745. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00938>
- (39) Podgórski, M.; Fairbanks, B. D.; Kirkpatrick, B. E.; McBride, M.; Martinez, A.; Dobson, A.; Bongiardina, N. J.; Bowman, C. N. Toward Stimuli-Responsive Dynamic Thermosets through Continuous Development and Improvements in Covalent Adaptable Networks (CANs). *Advanced Materials* **2020**, 32 (20). DOI: 10.1002/adma.201906876
- (40) Yoon, J. A.; Kamada, J.; Koynov, K.; Mohin, J.; Nicolaÿ, R.; Zhang, Y.; Balazs, A. C.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K. Self-Healing Polymer Films Based on Thiol–Disulfide Exchange Reactions and Self-Healing Kinetics Measured Using Atomic Force Microscopy. *Macromolecules* **2012**, 45 (1), 142-149. DOI: <https://doi.org/10.1021/ma2015134>
- (41) Accardo, J. V.; McClure, E. R.; Mosquera, M. A.; Kalow, J. A. Using Visible Light to Tune Boronic Acid–Ester Equilibria. *Journal of the American Chemical Society* **2020**, 142 (47), 19969-19979. DOI: 10.1021/jacs.0c08551
- (42) Joseph; Kalow, J. A. Reversibly tuning hydrogel stiffness through photocontrolled dynamic covalent crosslinks. *Chemical Science* **2018**, 9 (27), 5987-5993. DOI: 10.1039/c8sc02093k
- (43) Zhao, W.; Li, Y.; Zhang, X.; Zhang, R.; Hu, Y.; Boyer, C.; Xu, F. J. Photo-responsive supramolecular hyaluronic acid hydrogels for accelerated wound healing. *Journal of Controlled Release* **2020**, 323, 24-35, Article. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.04.014
- (44) Zhai, L.; Narkar, A.; Ahn, K. Self-healing polymers with nanomaterials and nanostructures. *Nano Today* **2020**, 30, 100826. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100826>
- (45) Zhao, X.; Chen, X.; Yuk, H.; Lin, S.; Liu, X.; Parada, G. Soft Materials by Design: Unconventional Polymer Networks Give Extreme Properties. *Chemical Reviews* **2021**, 121 (8), 4309-4372. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01088>
- (46) Zhang, K.; Feng, Q.; Fang, Z.; Gu, L.; Bian, L. Structurally Dynamic Hydrogels for Biomedical Applications: Pursuing a Fine Balance between Macroscopic Stability and

Microscopic Dynamics. *Chemical Reviews* **2021**, 121 (18), 11149-11193. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00071>

(47) Muir, V. G.; Burdick, J. A. Chemically Modified Biopolymers for the Formation of Biomedical Hydrogels. *Chemical Reviews* **2021**, 121 (18), 10908-10949. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00923>

(48) Yang, Y.; Ding, X.; Urban, M. W. Chemical and physical aspects of self-healing materials. *Progress in Polymer Science* **2015**, 49-50, 34-59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.06.001>

(49) Zhang, A.; Liu, Y.; Qin, D.; Sun, M.; Wang, T.; Chen, X. Research status of self-healing hydrogel for wound management: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, 164, 2108-2123. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.109>

(50) Yang, Q.; Wang, P.; Zhao, C.; Wang, W.; Yang, J.; Liu, Q. Light-Switchable Self-Healing Hydrogel Based on Host–Guest Macro-Crosslinking. *Macromolecular Rapid Communications* **2017**, 38 (6), Article. DOI: 10.1002/marc.201600741

(51) Okay, O. Self-healing hydrogels formed via hydrophobic interactions. *Advances in Polymer Science* **2015**, 268, 101-142, Article. DOI: 10.1007/978-3-319-15404-6_3

(52) Niu, P.; Liu, B.; Li, H. Room-Temperature Self-Healing Elastomer based on Van der Waals Forces in Air and under Water. In *Journal of Physics: Conference Series*, 2021; Vol. 2083. DOI: 10.1088/1742-6596/2083/2/022066.

(53) Hia, I. L.; Vahedi, V.; Pasbakhsh, P. Self-Healing Polymer Composites: Prospects, Challenges, and Applications. *Polymer Reviews* **2016**, 56 (2), 225-261, Review. DOI: 10.1080/15583724.2015.1106555

(54) Naeimipour, S.; Rasti Borojeni, F.; Selegård, R.; Aili, D. Enzymatically Triggered Deprotection and Cross-Linking of Thiolated Alginate-Based Bioinks. *Chemistry of Materials* **2022**, 34 (21), 9536-9545. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.2c02037>

(55) Bongiardina, N. J.; Soars, S. M.; Podgorski, M.; Bowman, C. N. Radical-disulfide exchange in thiol–ene–disulfidation polymerizations. *Polymer Chemistry* **2022**, 13 (27), 3991-4003, 10.1039/D2PY00172A. DOI: <https://doi.org/10.1039/D2PY00172A>

- (56) Chakma, P.; Konkolewicz, D. Dynamic Covalent Bonds in Polymeric Materials. *Angewandte Chemie - International Edition* **2019**, 58 (29), 9682-9695, Review. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201813525>
- (57) Sieredzinska, B.; Zhang, Q.; Berg, K. J. v. d.; Flapper, J.; Feringa, B. L. Photocrosslinking polymers by dynamic covalent disulfide bonds. *Chemical Communications* **2021**, 57 (77), 9838-9841. DOI: 10.1039/d1cc03648c (accessed 7/23/2026).
- (58) Maes, S.; Scholiers, V.; Du Prez, F. E. Photo-Crosslinking and Reductive Decrosslinking of Polymethacrylate-Based Copolymers Containing 1,2-Dithiolane Rings. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2023**, 224 (1), 2100445. DOI: <https://doi.org/10.1002/macp.202100445>
- (59) Spessa, A.; Bongiovanni, R.; Vitale, A. A novel disulfide-containing monomer for photoinitiator-free self-healable photocured coatings. *Progress in Organic Coatings* **2024**, 187, 108098. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2023.108098>
- (60) Zhang, Q.; Qu, D.-H.; Feringa, B. L.; Tian, H. Disulfide-Mediated Reversible Polymerization toward Intrinsically Dynamic Smart Materials. *Journal of the American Chemical Society* **2022**, 144 (5), 2022-2033. DOI: 10.1021/jacs.1c10359
- (61) Tan, P.; Gu, W.; Zou, Y.; Song, X.; Huang, Z.; Liu, J.; Lei, I. M. Harnessing dynamic covalent chemistry in sustainable biomass-based polymers: Synthesis, dynamic functionalities and potential of dithiolane-containing supramolecular polymers. *Progress in Polymer Science* **2025**, 160, 101920. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2024.101920>
- (62) Wang, B.-S.; Qu, D.-H. The Many Ways for Reversible Polymerization of 1,2-Dithiolanes. *Chemistry Letters* **2023**, 52 (6), 496-502. DOI: 10.1246/cl.230142
- (63) Nelson, B. R.; Kirkpatrick, B. E.; Miksch, C. E.; Davidson, M. D.; Skillin, N. P.; Hach, G. K.; Khang, A.; Hummel, S. N.; Fairbanks, B. D.; Burdick, J. A.; et al. Photoinduced Dithiolane Crosslinking for Multiresponsive Dynamic Hydrogels. *Advanced Materials* **2023**, n/a (n/a), 2211209. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.202211209>
- (64) Afolabi, F. O.; He, L. Y.; Lin, C. C. Dynamic Gelatin Hydrogels Crosslinked by Dithiolane-Norbornene Click Chemistry. *Macromol Biosci* **2026**, 26 (2), e00400. DOI: 10.1002/mabi.202500400

- (65) Liu, D.; Nikoo, M.; Boran, G.; Zhou, P.; Regenstein, J. M. Collagen and Gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology* **2015**, 6 (1), 527-557. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
- (66) Hernandez-Adame, L. Nanogelatina: Sistemas de transporte y liberación de fármacos y biomoléculas. **2022**. DOI: 10.18846/renaysoc.2021.07.07.03.0008
- (67) Ramos, M.; Valdés, A.; Beltrán, A.; Garrigós, M. Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings* **2016**, 6 (4), 41. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>
- (68) Tonicioli Riguetto, C. V.; Rosseto, M.; Alessandretti, I.; de Oliveira, R.; Wohlmuth, D. A. R.; Ferreira Menezes, J.; Loss, R. A.; Dettmer, A.; Pizzutti, I. R. Gelatin films from wastes: A review of production, characterization, and application trends in food preservation and agriculture. *Food Research International* **2022**, 162, 112114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112114>
- (69) Sheokand, B.; Vats, M.; Kumar, A.; Srivastava, C. M.; Bahadur, I.; Pathak, S. R. Natural polymers used in the dressing materials for wound healing: Past, present and future. *Journal of Polymer Science* **2023**, Review. DOI: <https://doi.org/10.1002/pol.20220734>
- (70) Pepelanova, I.; Kruppa, K.; Scheper, T.; Lavrentieva, A. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering* **2018**, 5 (3), 55. DOI: 10.3390/bioengineering5030055
- (71) Cui, J.; Su, X.; Jiao, B.; Liao, Y.; Xiang, W.; Fang, Y. Preparation and application of recyclable multifunctional self-healing thioctic acid-based materials. *European Polymer Journal* **2022**, 181, Review. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111695>
- (72) Lv, S.-y.; He, S.; Ling, X.-l.; Wang, Y.-q.; Huang, C.; Long, J.-r.; Wang, J.-q.; Qin, Y.; Wei, H.; Yu, C.-Y. Review of lipoic acid: From a clinical therapeutic agent to various emerging biomaterials. *International Journal of Pharmaceutics* **2022**, 627, 122201. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122201>
- (73) Levkovskyi, I. O.; Mochizuki, S.; Zheng, A.; Zhang, X.; Zhang, F. Lipoic acid-based poly(disulfide)s: Synthesis and biomedical applications. *Nano TransMed* **2023**, 2 (2), 100006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ntm.2023.100006>

- (74) Zhao, X. Multi-scale multi-mechanism design of tough hydrogels: building dissipation into stretchy networks. *Soft Matter* **2014**, *10* (5), 672-687, <https://doi.org/10.1039/c3sm52272e>. DOI: 10.1039/c3sm52272e
- (75) Salah, I.; Parkin, I. P.; Allan, E. Copper as an antimicrobial agent: recent advances. *RSC Advances* **2021**, *11* (30), 18179-18186. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1RA02149D>
- (76) Loessner, D.; Meinert, C.; Kaemmerer, E.; Martine, L. C.; Yue, K.; Levett, P. A.; Klein, T. J.; Melchels, F. P.; Khademhosseini, A.; Hutmacher, D. W. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nature Protocols* **2016**, *11* (4), 727-746. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.037> (accessed 2020/01/31/02:26:47).
- (77) Ruiz, C.; Vera, M.; Rivas, B. L.; Sánchez, S.; Urbano, B. F. Magnetic methacrylated gelatin-g-polyelectrolyte for methylene blue sorption. *RSC Advances* **2020**, *10* (71), 43799-43810. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0RA08188D>
- (78) Su, J.; Rao, M.; Dai, H.; Cai, L.; Ye, F.; Ye, L.; Hu, Y.; Chen, B.; Guo, X. Dual stimuli-responsive polymeric prodrug consisting of reversible covalent bonded celastrol for tumor targeted delivery. *Macromolecular Research* **2024**, *32* (2), 173-186. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13233-023-00218-6>
- (79) Martin-Saldaña, S.; De León, A.; De La Mata, M.; Politakos, N.; Olmedo-Martínez, J. L.; Müller, A. J.; Belouqui, A.; Calderón, M.; Picchio, M. L. Multifunctional Protein Eutectogels Based on Polyphenolic: Zwitterionic Low-Transition-Temperature Mixtures. *Advanced Functional Materials* **2026**, *36* (9). DOI: 10.1002/adfm.202514002
- (80) Naffeti, M.; Ramírez-Jiménez, R. A.; Chtourou, R.; Postigo, P. A.; Aguilar, M. R.; Rojo, L. Bismuth-enhanced silicon nanowires: exploring their antimicrobial potential. *Materials & Design* **2026**, *262*, 115470. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2026.115470>
- (81) Luo, Q.; Han, Q.; Chen, L.; Fan, X.; Wang, Y.; Fei, Z.; Zhang, H.; Wang, Y. Redox response, antibacterial and drug package capacities of chitosan- α -lipoic acid conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *154*, 1166-1174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.271>
- (82) Yang, S.; Bai, J.; Sun, X.; Zhang, J. Robust and healable poly(disulfides) supramolecular adhesives enabled by dynamic covalent adaptable networks and

noncovalent hydrogen-bonding interactions. *Chemical Engineering Journal* **2023**, 461, 142066. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142066>

(83) Albanese, K. R.; Read de Alaniz, J.; Hawker, C. J.; Bates, C. M. From health supplement to versatile monomer: Radical ring-opening polymerization and depolymerization of α -lipoic acid. *Polymer* **2024**, 304, 127167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2024.127167>

(84) Hevia, K.; Arancibia, V.; Rojas-Romo, C. Levels of copper in sweeteners, sugar, tea, coffee and mate infusions. Determination by adsorptive stripping voltammetry in the presence of α -lipoic acid. *Microchemical Journal* **2015**, 119, 11-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.10.004>

(85) Yang, X.; Jiang, L.; Zhang, B.; Hu, J.; Cui, X.; Zhang, Q. Ratiometric fluorescent probe for continuous detection of copper ions and lipoic acid in spinach using gold-silver bimetallic nanoclusters grown in situ on Zn MOF. *Talanta* **2025**, 295, 128304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128304>

(86) Cao, B.; Zheng, Y.; Xi, T.; Zhang, C.; Song, W.; Burugapalli, K.; Yang, H.; Ma, Y. Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices. *Biomedical Microdevices* **2012**, 14 (4), 709-720. DOI: 10.1007/s10544-012-9651-x

(87) Kumari, M.; Chauhan, G. S. Adsorption capacity, kinetics, and mechanism of copper(II) uptake on gelatin-based hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* **2011**, 119 (1), 363-370. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.32632>

(88) Aliaga, M. E.; Andrade-Acuña, D.; López-Alarcón, C.; Sandoval-Acuña, C.; Speisky, H. Cu(II)-disulfide complexes display simultaneous superoxide dismutase- and catalase-like activities. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2013**, 129, 119-126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.09.006>

(89) Pieniężna, A.; Witak, W.; Szymańska, A.; Brasuń, J. The Role of the Disulfide Bridge in the Copper (II) Binding by the Cyclic His4-Peptide. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22 (12), 6458. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22126458>

(90) Baumgartner, M. R.; Schmalle, H.; Dubler, E. The interaction of transition metals with the coenzyme alpha-lipoic acid: Synthesis, structure and characterization of copper and zinc complexes. *Inorganica Chimica Acta* **1996**, 252 (1-2), 319-331. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(96\)05331-5](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(96)05331-5)

- (91) Abu Elella, M. H.; Aamer, N.; Mohamed, Y.; Nazer, H. High-Potential Removal of Copper (II) Ions from Aqueous Solution Using Antimicrobial Crosslinked Grafted Gelatin Hydrogels. *Journal of Polymers and the Environment* **2022**, *31*, 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02658-0>
- (92) Chiou, H.-Y. C.; Wang, C.-W.; Chen, S.-C.; Tsai, M.-L.; Lin, M.-H.; Hung, C.-H.; Kuo, C.-H. Copper Exposure Induces Epithelial-Mesenchymal Transition-Related Fibrotic Change via Autophagy and Increase Risk of Lung Fibrosis in Human. *Antioxidants* **2023**, *12* (2), 532. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox12020532>
- (93) Giachino, A.; Waldron, K. J. Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. *Molecular Microbiology* **2020**, *114* (3), 377-390. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.14522>
- (94) Rajawasam, C. W. H.; Dodo, O. J.; Weerasinghe, M. A. S. N.; Raji, I. O.; Wanasinghe, S. V.; Konkolewicz, D.; De Alwis Watuthanthrige, N. Educational series: characterizing crosslinked polymer networks. *Polymer Chemistry* **2024**, *15* (4), 219-247, 10.1039/D3PY00914A. DOI: 10.1039/D3PY00914A
- (95) Bernal-Ortega, P.; Anyszka, R.; Morishita, Y.; Di Ronza, R.; Blume, A. Determination of the crosslink density of silica-filled styrene butadiene rubber compounds by different analytical methods. *Polymer Bulletin* **2024**, *81* (1), 995-1018. DOI: 10.1007/s00289-023-04749-x
- (96) Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P. A.; Mooney, D. J.; Shenoy, V. B. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* **2020**, *584* (7822), 535-546. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2612-2>
- (97) Guimarães, C. F.; Gasperini, L.; Marques, A. P.; Reis, R. L. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nature Reviews Materials* **2020**, *5* (5), 351-370. DOI: 10.1038/s41578-019-0169-1
- (98) Qin, X. H.; Torgersen, J.; Saf, R.; Mühleder, S.; Pucher, N.; Ligon, S. C.; Holnthoner, W.; Redl, H.; Ovsianikov, A.; Stampfl, J.; et al. Three-dimensional microfabrication of protein hydrogels via two-photon-excited thiol-vinyl ester photopolymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **2013**, *51* (22), 4799-4810, Article. DOI: 10.1002/pola.26903
- (99) Pezzana, L.; Sangermano, M. Fully biobased UV-cured thiol-ene coatings. *Progress in Organic Coatings* **2021**, *157*, Article. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2021.106295

- (100) Shen, J.; Dai, Y.; Xia, F.; Zhang, X. Role of divalent metal ions in the function and application of hydrogels. *Progress in Polymer Science* **2022**, *135*, 101622. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2022.101622>
- (101) Stojkov, G.; Niyazov, Z.; Picchioni, F.; Bose, R. K. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels* **2021**, *7* (4), 255. DOI: 10.3390/gels7040255
- (102) Castañeda-Arriaga, R.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Mora-Diez, N. Theoretical study of copper complexes with lipoic and dihydrolipoic acids. *RSC Advances* **2016**, *6* (109), 107924-107932, 10.1039/C6RA23553K. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA23553K>
- (103) Ou, P.; Tritschler, H. J.; Wolff, S. P. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochemical Pharmacology* **1995**, *50* (1), 123-126. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00116-H](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00116-H)
- (104) Richbourg, N. R.; Peppas, N. A. The swollen polymer network hypothesis: Quantitative models of hydrogel swelling, stiffness, and solute transport. *Progress in Polymer Science* **2020**, *105*, 101243. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101243>
- (105) Sekkar, V.; Narayanaswamy, K.; Scariah, K. J.; Nair, P. R.; Sastri, K. S.; Ang, H. G. Evaluation by various experimental approaches of the crosslink density of urethane networks based on hydroxyl-terminated polybutadiene. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *103* (5), 3129-3133. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.24751>
- (106) Kopač, T.; Abrami, M.; Grassi, M.; Ručigaj, A.; Krajnc, M. Polysaccharide-based hydrogels crosslink density equation: A rheological and LF-NMR study of polymer-polymer interactions. *Carbohydrate Polymers* **2022**, *277*, 118895. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118895>
- (107) Hiranobe, C. T.; Ribeiro, G. D.; Torres, G. B.; Reis, E. A. P. D.; Cabrera, F. C.; Job, A. E.; Paim, L. L.; Santos, R. J. D. Cross-Linked Density Determination of Natural Rubber Compounds by Different Analytical Techniques. *Materials Research* **2021**, *24* (suppl 1). DOI: 10.1590/1980-5373-mr-2021-0041
- (108) Ding, Y.; Tang, K.; Zhang, Y.; Yang, L.; Zhang, B.; Zhang, X.; Wang, J. Sustained copper-releasing adhesive hydrogel patch promotes optimized scarless tongue wound healing via antioxidative, angiogenic and antifibrotic synergy. *Journal of Materials*

Chemistry B **2026**, 14 (13), 4018-4036. DOI: 10.1039/d5tb02753e (accessed 7/31/2026).

(109) Lee, R.; Hall, E. K.; Aljohani, B. A.; McClements, J.; Peeters, M.; Geoghegan, M. Elastic modulus of hyaluronic acid hydrogels by compression testing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2025**, 36 (1). DOI: 10.1007/s10856-025-06878-3

(110) Shin, Y.; Lee, H. S.; Jeong, H.; Kim, D.-H. Recent advances in conductive hydrogels for soft biointegrated electronics: Materials, properties, and device applications. *Wearable Electronics* **2024**, 1, 255-280. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wees.2024.10.004>

(111) Rong, L.; Guan, T.; Fan, X.; Zhi, W.; Zhou, R.; Li, F.; Liu, Y. Fe(3+)-Modulated In Situ Formation of Hydrogels with Tunable Mechanical Properties. *Gels* **2025**, 11 (8). DOI: 10.3390/gels11080586

(112) Gruber, S.; Nickel, A. Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. *Front Med Technol* **2023**, 5, 1195529. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmedt.2023.1195529>

(113) Schiller, H.; Young, C.; Schulze, S.; Tripepi, M.; Pohlschroder, M. A Twist to the Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test: an Accessible Laboratory Experiment Comparing *Haloferax volcanii* and *Escherichia coli* Antibiotic Susceptibility to Highlight the Unique Cell Biology of Archaea. *J Microbiol Biol Educ* **2022**, 23 (1). DOI: 10.1128/jmbe.00234-21

8. ANEXOS

8.1. Ácido tióctico

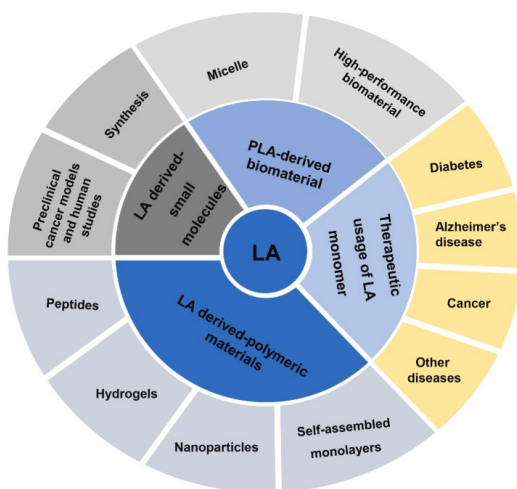
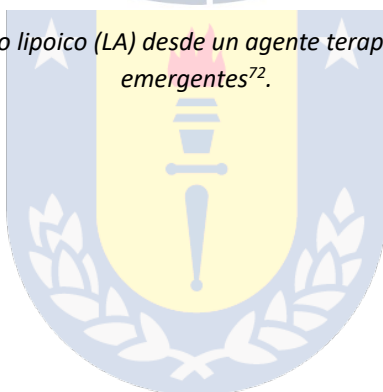


Figura S1: Aplicaciones del ácido tióctico o lipoico (LA) desde un agente terapéutico clínico hasta diversos biomateriales emergentes⁷².



Universidad de Concepción

8.2. Metodología de análisis de fluorescencia

La solución de reactivo de fluoraldehído contiene OPA (o-ftalaldehído), que reacciona con aminas primarias de aminoácidos, péptidos y proteínas para permitir la detección y cuantificación fluorescente. Esto produce derivados fluorescentes o coloreados ideales para su cuantificación rápida de proteínas o péptidos.

Se mide la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 340 nm. Los valores obtenidos se comparan contra una curva de calibración estándar preparada con un aminoácido de referencia

Propiedades del reactivo:

- Formulación: 0,8 mg/ml de o-ftalaldehído (OPA) en tampón patentado, pH 10
- Forma: Líquido ligeramente amarillo, transparente e incoloro
- Reactivo hacia: Aminas primarias (—NH_2)
- Detección: Fluorescencia (excitación/emisión = 340 nm/455 nm)

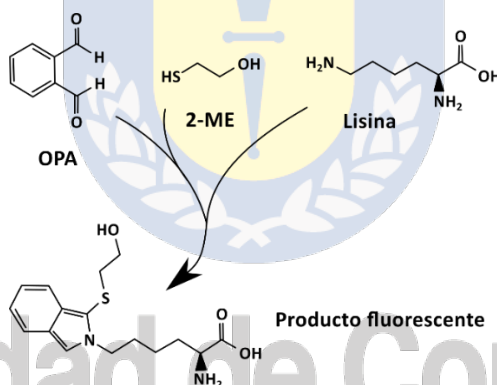


Figura S2. Reacción de marcado de los grupos aminos con la sonda fluorescente (fluoraldehído)⁷⁶

8.3. Determinación de aminoácidos

Las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida con 6 N HCl durante 22 horas en condiciones de vacío. Los hidrolizados se analizaron utilizando un analizador automático Biochrom Biochrom30. Los aminoácidos se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico y se detectaron mediante la reacción de ninhidrina post-columna.

La cromatografía se hizo a un flujo de 20ml/hora. Se preparó una solución de la muestra a una concentración de 5 mg/ml de la cual se hidrolizaron 20 μ l. El hidrolizado seco se suspendió en 100 μ L buffer de carga de los cuales se inyectaron 10 μ l, un 10%. El detector es de absorbancia, el eluido de la columna se hace reaccionar con ninhidrina y los complejos resultantes absorben a 440 nm para la prolina y a 570 nm para el resto de los aminoácidos.



Universidad de Concepción

Nombre completo del aminoácido	Abreviatura	(nmoles))	CML(ug
4-hidroxiprolina (Hydroxyproline)	OHpro	9,3280	0,8806
Ácido aspártico (Aspartic acid)	Asp	4,3357	0,4022
Treonina (Threonine)	Thr	1,6030	0,1434
Serina (Serine)	Ser	3,3373	0,3054
Ácido glutámico (Glutamic acid)	Glu	7,1303	0,6129
Prolina (Proline)	Pro	11,8297	0,9969
Glicina (Glycine)	Gly	32,4537	2,6406
Alanina (Alanine)	Ala	11,1820	0,9269
Cisteína (Cysteine)	Cys	0,1827	0,0183
Valina (Valine)	Val	1,8830	0,1677
Metionina (Methionine)	Met	0,6637	0,0694
Isoleucina (Isoleucine)	Ile	0,8127	0,0409
Leucina (Leucine)	Leu	2,2687	0,1720
Norleucina (Norleucine)	Nleu	1,0520	0,0347
Tirosina (Tyrosine)	Tyr	0,4640	0,0252
Fenilalanina (Phenylalanine)	Phe	1,5050	0,1242
Hidroxilisina (Hydroxylysine)	OHlys	0,6070	0,0431
Histidina (Histidine)	His (Hls)	0,4307	0,0400
Lisina (Lysine)	Lys	2,6140	0,2305
Arginina (Arginine)	Arg	4,6873	0,3984

Tabla S1: determinación de cantidad de aminoácidos presentes en la gelatina.

8.4. Diseño de moldes

Considerando que la síntesis del hidrogel se realiza en moldes de teflón fue necesario diseñar las geometrías necesarias para realizar los distintos estudios planteados (**Figura S3**), por ejemplo, para los estudios de reometría se utiliza una geometría de disco con distintas profundidades que luego se definirán como el GAP del equipo. Por otro lado, geometrías rectangulares serán utilizadas para los ensayos de tensión del material, y las geometrías con áreas más grandes están pensadas para los análisis de estría y, en fin, la geometría de hueso para ensayos de tensión según la norma ASTM D638. De esta forma se consideran 4 geometrías y 3 profundidades distintas (1, 2 y 3 mm) además de tener como limitación el tamaño del portaobjeto utilizado para la preparación del hidrogel. En este diseño también es necesario considerar las limitaciones al momento de realizar el molde, en donde la principal es que todos los bordes deben ser redondeados.

El criterio para la selección de los hidrogeles que continuarán a los siguientes estudios será el módulo de almacenamiento por cizalla. Inicialmente se evalúa el hidrogel formado por la mezcla de gelatinas modificadas. Para ello es necesario realizar un diseño experimental para intentar evaluar la mayor cantidad de variables sin tener que realizar experimentos por separado para cada una de ellas.

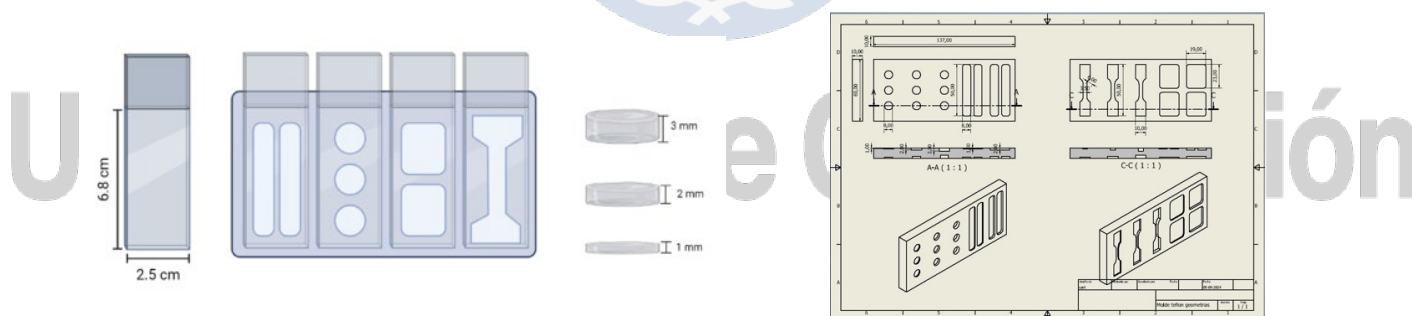


Figura S3. Diseño de moldes de teflón para síntesis de hidrogeles.

8.5. Síntesis de gelatinas modificadas

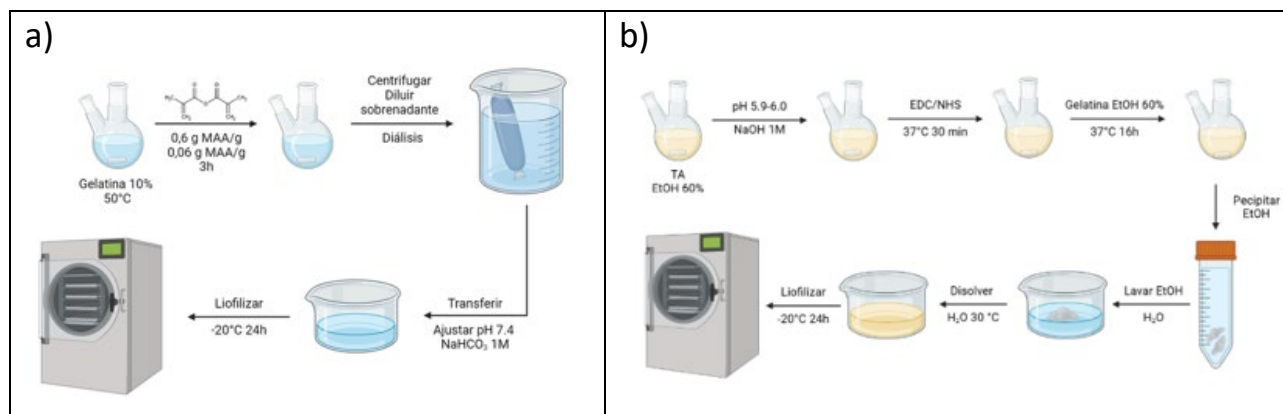


Figura S4. Esquemas de las metodologías de síntesis de las gelatinas modificadas a) GelMA y b) GelTA.

8.6. Preparación de hidrogeles.



Figura S5. imágenes de hidrogeles luego de la fotopolimerización.

8.7. Absorción de Cu(II) por ICP.

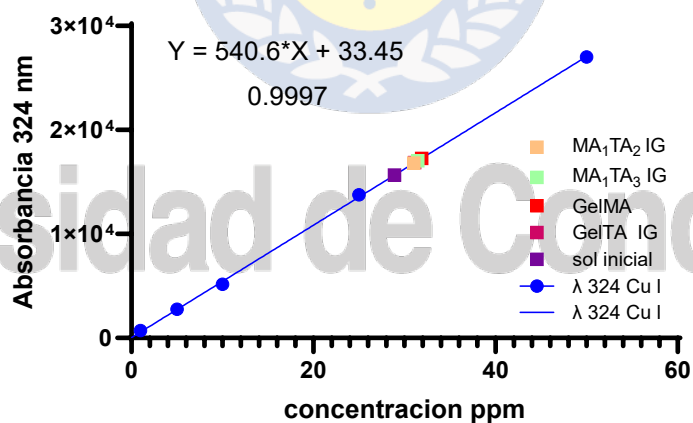


Figura S6. Curva de calibración por medio de ICP para la determinación de Cu(II).

8.8. Reometría cíclica.

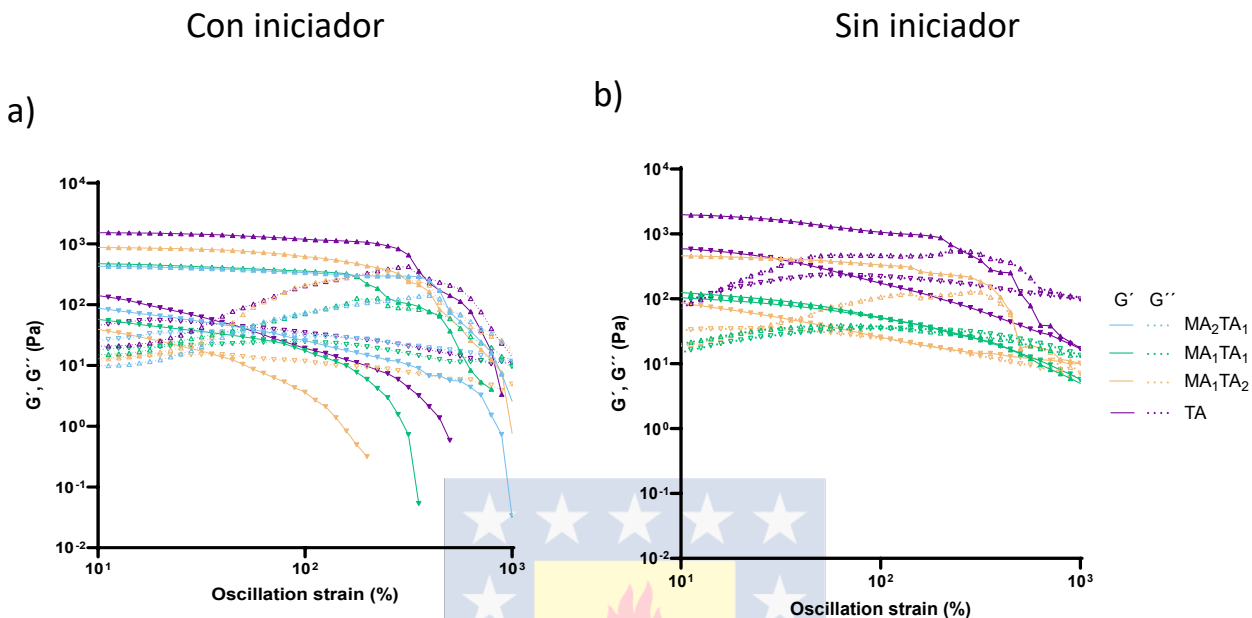


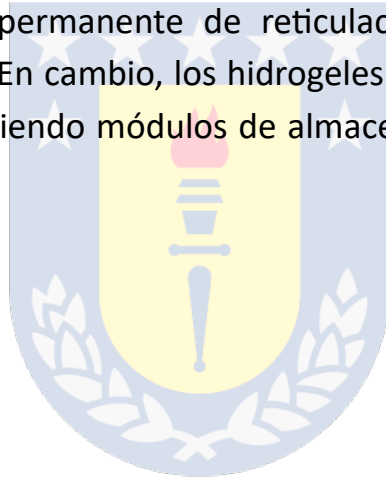
Figura S7: La amplitud cíclica oscila entre el 10% y el 1000% de deformación a) con iniciador y b) Sin iniciador.

La **Figura S7** muestra barridos cíclicos de amplitud (10–1000% de deformación) para hidrogeles MAXTay, con y sin iniciador, evaluando la variación en los módulos elásticos (G') y viscosos (G''). Esta prueba permite analizar la estabilidad estructural, la resistencia al colapso de la red y la capacidad de recuperación de los hidrogeles bajo sucesivos ciclos de deformación. En ambos casos, se observa el comportamiento típico de materiales viscoelásticos reticulados, con $G' > G''$ en el régimen lineal inicial, predominando la respuesta elástica sobre la respuesta viscosa. Sin embargo, la magnitud de los módulos y la extensión del régimen elástico dependen fuertemente de la presencia del fotoiniciador y de la relación MAXTay.

En sistemas con iniciador (**Figura S7a**), los valores de G' en el rango lineal inicial (10–50% de deformación) están entre 10^3 y 10^4 Pa, lo que representa un aumento de hasta un orden de magnitud en comparación con formulaciones sin iniciador. (**Figura S7b**) Este aumento se atribuye a la fotopolimerización de los grupos metacrilato en GelMA. A medida que aumenta la deformación, G' disminuye gradualmente, lo que indica la ruptura progresiva de enlaces físicos y la pérdida parcial de la estructura elástica. Sin embargo, los sistemas con un iniciador mantienen una meseta más extendida, resistiendo deformaciones de hasta aproximadamente un 300–400% antes de que G' y G'' se intercepten, reflejando el límite de integridad de la red.

En cambio, los hidrogeles sin iniciadores tienen valores iniciales de G' entre 10^2 y 10^3 Pa, lo que evidencia una red más débil que depende principalmente de interacciones físicas y ECD. En este grupo, las formulaciones con proporciones más altas de GelTA muestran una transición hacia menores deformaciones hacia un comportamiento viscoso ($G'' > G'$) alrededor del 150–200% de deformación. Este fenómeno sugiere una red menos entrecruzada y más propensa al deslizamiento de cadenas.

Durante el ciclo de deformación inversa (reducción del 1000% al 10%), los valores de G' y G'' no se recuperan completamente a sus niveles iniciales. Esta respuesta irreversible, que es más pronunciada en sistemas con iniciadores, indica ruptura parcial de enlaces y reconfiguración incompleta de la red tras la deformación, considerando que el nivel permanente de reticulación no se recupera, solo el entrecruzamiento dinámico. En cambio, los hidrogeles sin iniciadores presentan una recuperación superior, obteniendo módulos de almacenamiento más cercanos a los iniciales.



Universidad de Concepción

8.9. Propiedades mecánicas.

Al trabajar los datos es necesario hacer un tratamiento se eliminan todos los datos negativos ya que son un error de la medición en donde el plato aun no toca bien la muestra, por lo cual la medición real se ve la medida real al momento en que se tienen esfuerzos positivos.

CON IG	Regresión lineal			
	Sin Cu	R ²	Con Cu	R ²
MA ₃ TA ₁	Y = 59,99*X - 63,84	0,962	Y = 27,78*X - 66,88	0,869
MA ₂ TA ₁	Y = 167,2*X - 2,577	0,998	Y = 53,53*X - 27,14	0,984
MA ₁ TA ₁	Y = 133,7*X - 40,85	0,953	Y = 68,33*X - 98,70	0,981
MA ₁ TA ₂	Y = 202,5*X - 60,12	0,977	Y = 26,70*X - 25,57	0,929
MA ₁ TA ₃	Y = 112,3*X - 55,22	0,997	Y = 74,12*X - 87,20	0,974
GelMA	Y = 55,32*X - 28,10	0,960	Y = 49,73*X - 45,67	0,990
GelTA	Y = 186,0*X - 128,0	0,988	Y = 55,37*X - 63,79	0,933

Tabla S2: Ecuaciones de la curva de las regresiones lineales para el cálculo del módulo de Young.

SIN IG	Regresión lineal			
	Sin Cu	R ²	Con Cu	R ²
MA ₃ TA ₁	Y = 35,83*X - 12,37	0,972	Y = 18,31*X - 10,90	0,921
MA ₂ TA ₁	Y = 49,58*X - 12,32	0,974	Y = 28,47*X - 42,15	0,953
MA ₁ TA ₁	Y = 29,44*X + 8,953	0,977	Y = 31,38*X - 31,68	0,946
MA ₁ TA ₂	Y = 50,25*X - 24,91	0,911	Y = 66,67*X - 25,95	0,992
MA ₁ TA ₃	Y = 79,59*X - 39,79	0,903	Y = 19,76*X - 37,32	0,924
GelTA	Y = 130,1*X - 27,25	0,945	Y = 78,44*X - 101,1	0,991

Tabla S3: Ecuaciones de la curva de las regresiones lineales para el cálculo del módulo de Young.

8.10. SEM

Figura S8: SEM hidrogeles GelMA/GelTA sin iniciador.

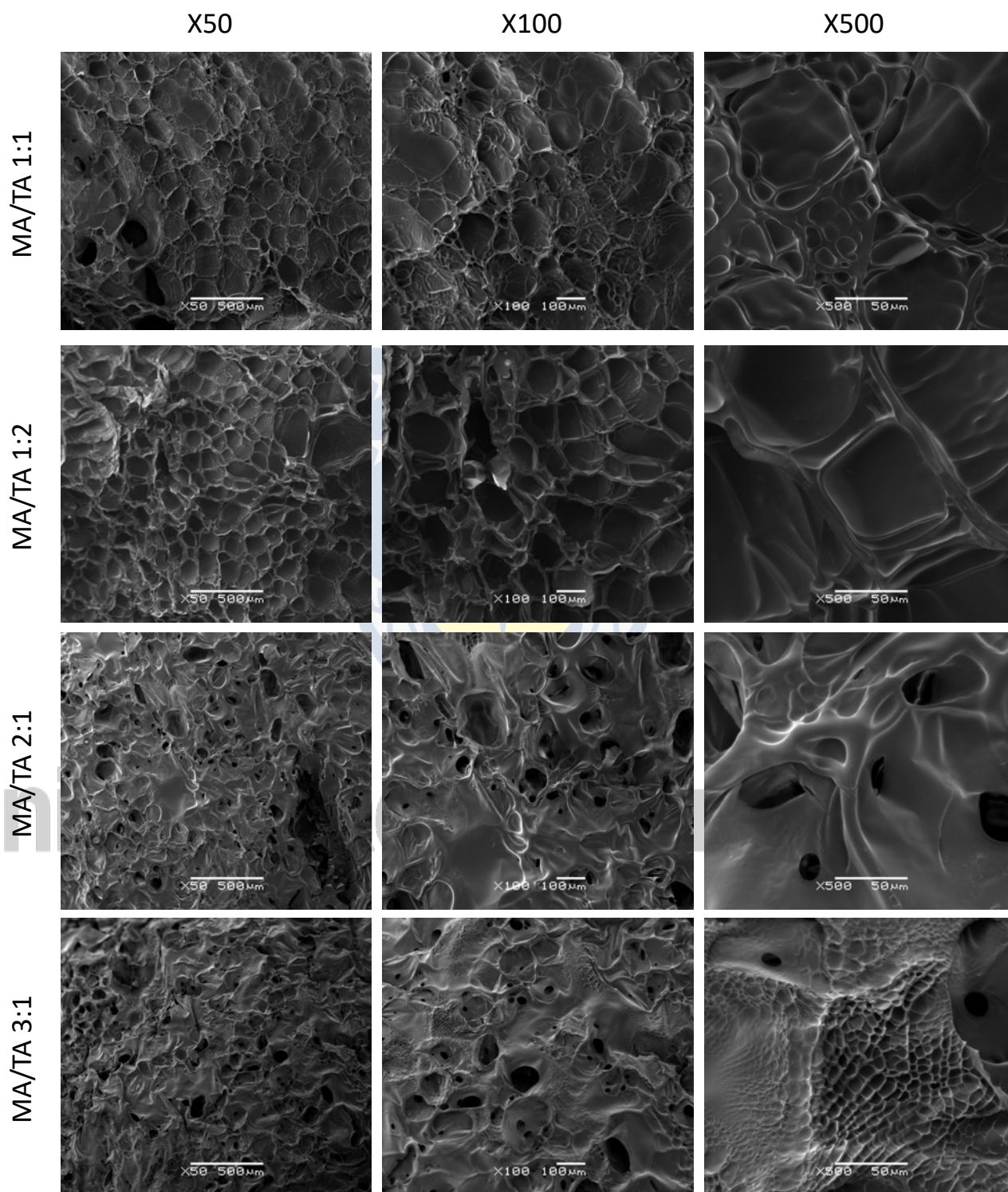
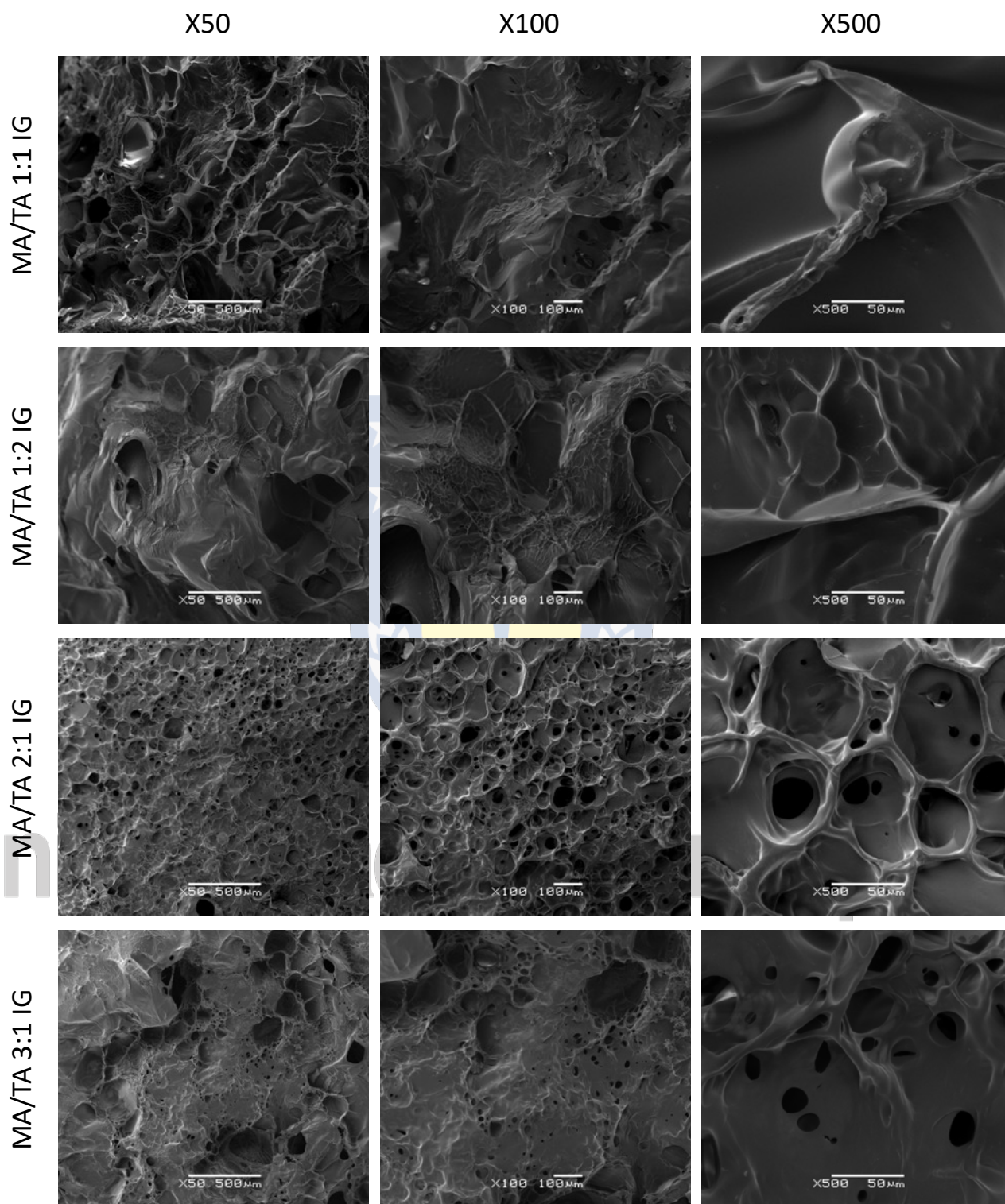


Figura S9: SEM hidrogel GelMA/GelTA con iniciador



En la **Tabla S4** se tiene los porcentajes de S obtenidos del análisis superficial por medio de EDS concuerdan con lo esperado, ya que en las mezclas que tienen una

menor proporción de GelTA se tienen menores porcentajes, considerando que la gelatina modificada con ácido tióctico es la que aporta el S, además de ver que este se encuentra disperso por toda la superficie tanto para los hidrogeles con y sin iniciador.

Tabla S4: Porcentajes elementales por medio de EDS de los hidrogeles con y sin iniciado.

Muestra		MA ₃ TA ₁	MA ₂ TA ₁	MA ₁ TA ₁	MA ₁ TA ₂
Porcentajes en peso de S (%)	Con iniciador	0,23	0,45	0,69	1,32
	Sin iniciador	0,27	0,66	1,83	1,99



Universidad de Concepción

8.11. Citotoxicidad

Las muestras fueron acotadas ya que al momento de poner en contacto con el medio de cultivo cambio inmediatamente la coloración por el indicador pH que tiene, lo cual nos indica que las muestras no están en un pH apto para ser trabajadas con las células, es decir, que solo por el efecto de pH se puede producir un error en la medición ya que la muerte estaría asociada al factor pH y no al contacto directo con el hidrogel.

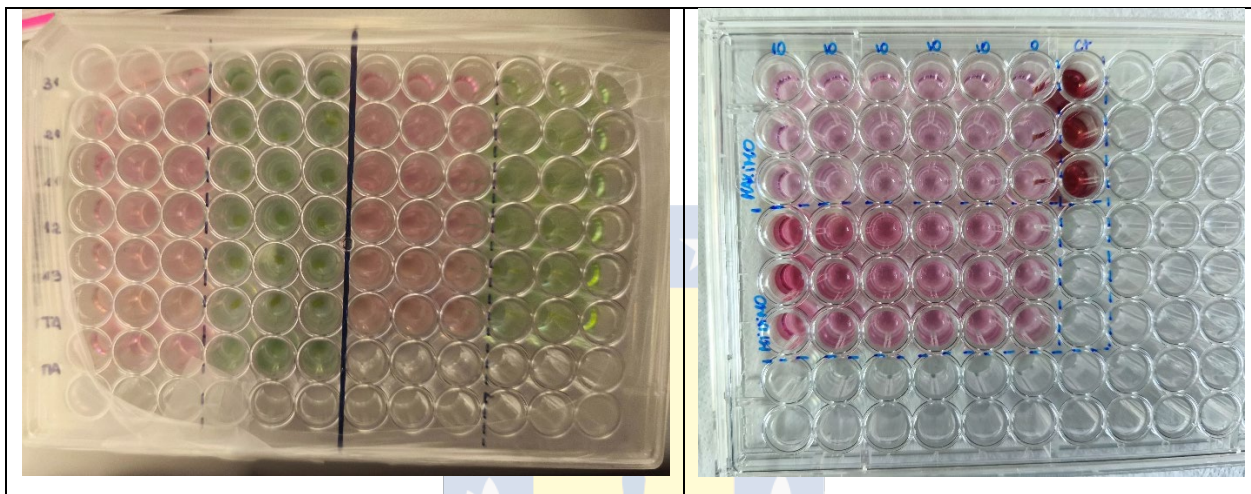


Figura S 10: Determinación del porcentaje de citotoxicidad por medio del kit de citotoxicidad LDH.

8.12. Propiedades antibacterianas

Para obtener imágenes adecuadas es necesario realizar una siembra de bacterias homogénea, las cuales estén dispersas por toda la palca de agar y así las interpretaciones de los halos sean correctas, es decir que la inhibición se de por el material y no por una siembra defectuosa con algún área en donde no hayan logrado crecer las bacterias, por lo cual se siembran como muestra la **Figura S12**, con el cuidado de que toda el área de la placa de agar quede cubierta.

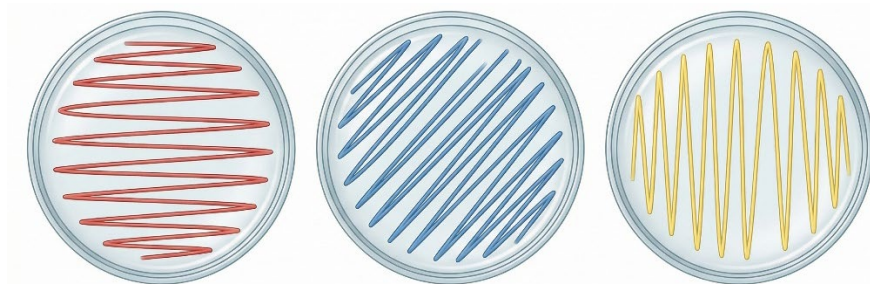


Figura S11. Ángulos(0°, 45° y 90°) de inoculación de Agar para los análisis de halos de inhibición.

Tabla S5: Ensayos de difusión de disco para capacidad antibacteriana de geles con Cu(II)

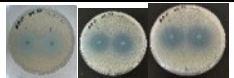
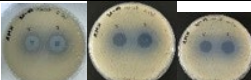
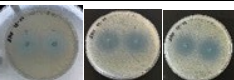
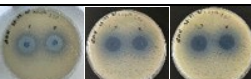
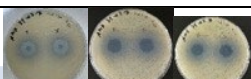
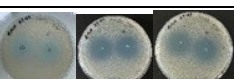
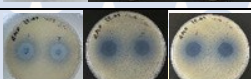
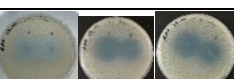
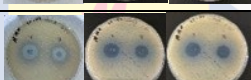
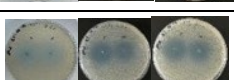
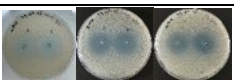
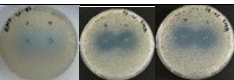
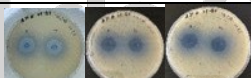
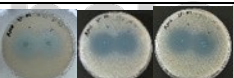
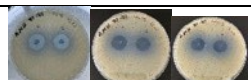
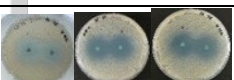
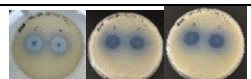
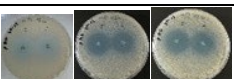
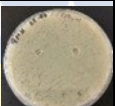
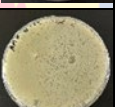
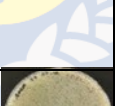
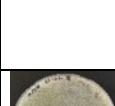
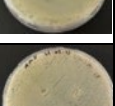
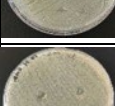
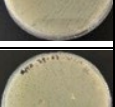
Formulación n Con Cu(II)	N°	Cepa 1 I UCO 538 (mm)	Cepa 1 II UCO 538 (mm)		Cepa 2 I UCO 99 (mm)	Cepa 2 II UCO 99 (mm)	
MA1TA3	1	16.7	16.7		22	23	
MA1TA3 IG	2	13.7	14.7		20.2	20.7	
MA1TA2	3	17.2	16.5		23	21.7	
MA1TA2 IG	4	14.3	14.3		21.8	21.8	
MA1TA1	5	17.6	17.3		24.8	20.5	
MA1TA1 IG	6	16.3	14.8		21.4	19.1	
MA2TA1	7	Sin muestra	Sin muestra		Sin muestra	Sin muestra	
MA2TA1 IG	8	14.7	13.6		19.3	20.9	
MA3TA1	9	Sin muestra	Sin muestra		Sin muestra	Sin muestra	
MA3TA1 IG	10	15.2	14.5		20.2	20.6	
MA IG	11	16	15.4		23.7	22.5	
TA	12	17	16.1		22	23.1	
TA IG	13	17.8	17.6		23.6	23.7	
Gentamicin a 10 µg CN 10 µg	14	6	6		27.1	27.2	
TGC 15	15	13.7	14.8		25.2	25.5	

Tabla S6: Ensayos de difusión de disco para capacidad antibacteriana de geles sin Cu(II).

Formulación Sin Cu(II)	N°	Cepa 1 I UCO 538 (mm)	Cepa 1 II UCO 538 (mm)		Cepa 2 I UCO 99 (mm)	Cepa 2 II UCO 99 (mm)	
MA1TA3	1	SECO	SECO		Por contacto	Por contacto	
MA1TA3 IG	2	Por contacto	Por contacto		Por contacto	SECO	
MA1TA2	3	SECO	SECO		SECO	SECO	
MA1TA2 IG	4	Por contacto	Por contacto		SECO	SECO	
MA1TA1	5	Por contacto	SECO		SECO	SECO	
MA1TA1 IG	6	SECO	SECO		Por contacto	Por contacto	
MA2TA1	7	Sin muestra	Sin muestra		Sin muestra	Sin muestra	
MA2TA1 IG	8	SECO	Por contacto		SECO	Por contacto	
MA3TA1	9	Sin muestra	Sin muestra		Sin muestra	Sin muestra	
MA3TA1 IG	10	SECO	Por contacto		SECO	Por contacto	
MA IG	11	SECO	SECO		SECO	Por contacto	
TA	12	SECO	SECO		SECO	SECO	
TA IG	13	SECO	SECO		SECO	SECO	