



GOBIERNO DE  
MÉXICO



CONACYT  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN QUÍMICA APLICADA

Saltillo, Coahuila a 10 de noviembre de 2023

**Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros**

**Coordinación de Posgrado**

**Presente**

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por XOCHITL CÁRDENAS VALDÉS titulado Síntesis y caracterización de un hidrogel basado en maltodextrina y quitosano con actividad antimicrobiana el cual fue presentado el día 06 de noviembre de 2023, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

**SINODALES**

**Dra. Rocío Yaneli Aguirre Loredo**  
Presidente

**Dra. Abril Fonseca García**  
Secretario

**Dra. Gethzemani Mayeli Estrada Villegas**  
Vocal

**ASESORES**

**Dra. Rebeca Betancourt Galindo**

**Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz**



## TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

---

AUTOR: XOCHITL CÁRDENAS VALDÉS FIRMA *Xochitl*

TITULO: Síntesis y caracterización de un hidrogel basado en maltodextrina y quitosano con actividad antimicrobiana

ASESORES: Dra. Rebeca Betancourt Galindo

FIRMA *Rebeca*

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

FIRMA *Hector*

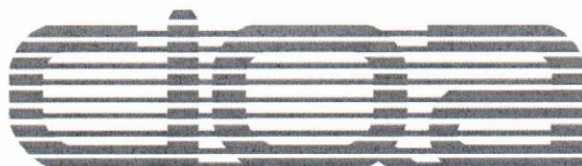
El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 6 de Noviembre de 2023



*Julieta*  
Dra. Julieta Torres González  
Directora General del CIQA



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**  
**Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros**

***TESIS***

**Síntesis y caracterización de un hidrogel basado en maltodextrina y quitosano  
con actividad antimicrobiana**

***Presentada por:***

**XOCHITL CÁRDENAS VALDÉS**

***Para obtener el grado de:***

**Maestro en Tecnología de Polímeros**

***Asesorada por:***

**Dra. Rebeca Betancourt Galindo**  
**Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz**

**Saltillo, Coahuila. México.**

**noviembre, 2023**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**  
**Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros**

***TESIS***

**Síntesis y caracterización de un hidrogel basado en maltodextrina y quitosano  
con actividad antimicrobiana**

**Presentada por:**

**XOCHITL CÁRDENAS VALDÉS**

*Para obtener el grado de:*

**Maestro en Tecnología de Polímeros**

*Asesorada por:*

**Dra. Rebeca Betancourt Galindo  
Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz**

**SINODALES**



**Dra. Rocío Yaneli Aguirre Loredo**  
**Presidente**



**Dra. Abril Fonseca García**  
**Secretario**



**Dra. Gethzemani Mayeli Estrada Villegas**  
**Vocal**



## DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 06 de noviembre de 2023

*Xochitl*

XOCHITL CÁRDENAS VALDÉS

Nombre y Firma

# CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



## TESIS

“Síntesis y caracterización de un hidrogel basado en maltodextrina y quitosano con actividad antimicrobiana”

### **Presentada por:**

Ing. Xochitl Cárdenas Valdés

### **Como requisito para obtener el grado de:**

Maestría en Tecnología de Polímeros

### **Directores de tesis:**

Dra. Rebeca Betancourt Galindo

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

**Saltillo, Coahuila**

**Noviembre del 2023**

## ***Dedicatoria***

*A Dios, por permitirme culminar este proyecto, otorgándome paz, salud y sabiduría.*

*A mis padres, Ana Laura Valdés y Francisco A. Cárdenas, quienes siempre me han amado incondicionalmente y han estado para mí motivándome en todo momento con sus buenos ejemplos, enseñándome a trabajar duro por mis metas y sueños.*

*A mi hermana Paulina Cárdenas, por ser mi fuente de motivación. Gracias por tu confianza, por darme fortaleza y siempre creer en mí.*

*A mi novio Alejandro Fraustro, por alentarme a realizar mi posgrado, por ser una fuente constante de apoyo durante los desafíos de este proyecto. Tu amor y comprensión me sostienen, estoy realmente agradecida por tenerte en mi vida.*

## Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento a mis asesores, la Dra. Rebeca Betancourt Galindo y al Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz por su orientación, disposición, paciencia y enseñanzas que me dieron cada momento para poder realizar este trabajo de investigación.

A el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por permitirme el desarrollo de este proyecto en sus instalaciones.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la oportunidad de realizar este proyecto ciencia de frontera 2019 con No. 6660, que me permitió continuar con mis estudios través de la beca No. 798047 y realizar mi Maestría en Tecnología de Polímeros.

A mis sinodales, Dra. Abril Fonseca García, Dra. Mayeli Estrada Villegas y Dra. Rocío Yaneli Aguirre Loredo, por su tiempo y sus valiosas contribuciones a este trabajo.

También agradezco a QFB. Bertha Puente Urbina y M.C. Gladis Yakeline Cortez Mazatán por enseñarme a realizar correctamente mi trabajo dentro del laboratorio.

A LCQ. Julieta Sánchez por permitirme realizar caracterizaciones en el Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR).

Quiero agradecer a Dra. Mónica Aimee Ceniceros por su apoyo y asistencia en las pruebas de caracterización por Microscopio electrónico de barrido (SEM).

Agradezco a la Dra. Geraldina Rodríguez Riojas por el apoyo con los estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

También al Dr. Roberto Espinosa Neira por su tiempo, explicaciones y aportación en la realización de los ensayos de citotoxicidad.

A L.C.Q Ma. Guadalupe Méndez Padilla por su disponibilidad y colaboración en la caracterización por medio de Análisis termogravimétrico (TGA) y Calorimetría diferencial de Barrido (DSC).



## ÍNDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
CAPITULO I. ANTECEDENTES GENERALES .....	9
1.1 Heridas en la piel.....	9
1.1.1 Tratamientos convencionales de heridas.....	10
1.1.2 Avances en tratamientos para heridas.....	10
1.2 Hidrogeles.....	11
1.3 Hidrogeles basados en polisacáridos .....	13
1.3.1 Maltodextrina .....	14
1.3.2 Quitosano.....	16
1.4 Hidrogeles como transportadores de fármacos .....	20
1.5 Hidrogeles en la liberación de agentes antimicrobianos .....	21
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
JUSTIFICACIÓN .....	27
HIPÓTESIS .....	27
CAPITULO II METODOLOGÍA.....	28
2.1 Síntesis de MD modificada con GMA.....	28
2.2 Síntesis de CS modificado con MA .....	28
2.3 Preparación del hidrogel de poli(maltodextrina-co-quitosano) .....	29
2.4 Estudios de hinchamiento, carga y liberación de vancomicina .....	29
2.4.1 Pruebas de hinchamiento .....	29
2.4.2 Carga y liberación de vancomicina. ....	30
2.5 Actividad antimicrobiana .....	31
2.6 Ensayos de citotoxicidad .....	32
2.7 Caracterización del hidrogel de poli(maltodextrina-co-quitosano).....	33
2.7.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	33
2.7.2 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)....	33
2.7.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	34

2.7.4 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN $^1\text{H}$ ).....	34
CAPITULO III. RESULTADOS.....	35
3.1 Síntesis de modificación de MD con GMA .....	35
3.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	35
3.1.2 Resonancia magnética nuclear de protones (RMN) .....	36
3.2 Síntesis de modificación de CS con AM.....	38
3.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	38
3.2.2 Resonancia magnética nuclear de protones (RMN) .....	39
3.3 Síntesis de hidrogel de poli(maltodextrina-co-quitosano) .....	41
3.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	45
3.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)....	48
3.4 Pruebas de hinchamiento .....	52
3.5 Morfología.....	54
3.6 Estudios de carga y liberación de vancomicina.....	55
3.7 Actividad antimicrobiana .....	57
3.8 Evaluación de citotoxicidad.....	60
4. Conclusiones.....	62
5. REFERENCIAS .....	63

## RESUMEN

En este trabajo se describe la síntesis de un nuevo hidrogel basado en los polisacáridos de maltodextrina (MD) y quitosano (CS), los cuales fueron previamente modificados con metacrilato de glicidilo (GMA) y anhídrido maleico (AM) respectivamente. Este hidrogel se sintetizó con el objetivo de ser probado como un sistema de carga y liberación de vancomicina para su uso como apósito en el tratamiento de heridas crónicas. Durante la síntesis de los hidrogeles de poli(MD-co-CS), se varió la proporción y concentración de MD y CS, así como la concentración de agente entrecruzante (NMBA) y tiempo de reacción. Los hidrogeles obtenidos se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), microscopía electrónica de barrido (SEM). También, se determinó su capacidad de absorción de agua (porcentaje de hinchamiento), alcanzando hinchamientos de hasta 600%. Los perfiles de liberación de vancomicina demostraron que el hidrogel logró liberar hasta 66% de vancomicina durante las primeras 5 horas. Además, se investigó la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediante el método de difusión de disco, presentándose una zona mayor de inhibición contra *E. coli* ( $31 \pm 1$ mm). La zona de inhibición confirmó el efecto antimicrobiano de los hidrogeles cargados con vancomicina. Por último, el hidrogel de poli(MD-co-CS) con 2.5% de NMBA presentó un 100% de viabilidad celular en estudios in vitro en células de fibroblastos humanos 1132SK, con un tratamiento de una duración de 24 h, por lo que se propone que los hidrogeles pueden ser buenos candidatos para usarse potencialmente como apósitos para heridas.

## INTRODUCCIÓN

Un apósito es definido como un producto sanitario empleado para cubrir y proteger una herida. La finalidad de un apósito es la reepitelización del tejido dañado y en consecuencia la cicatrización de la herida. Para conseguir esto, se deben tener en cuenta los factores que promueven la cicatrización de las heridas. Sin embargo, el uso de estos dispositivos biomédicos implica importantes riesgos de infección [1, 2]. Una vez que el agente patógeno se adhiere a la superficie, prolifera rápidamente creando barreras protectoras en forma de películas compuestas de complejos de mucopolisacáridos conocidas como biopelículas ó “biofilms”. De esta forma se requiere que los biomateriales eviten la proliferación de dichos agentes patógenos, es decir, tengan propiedad antimicrobiana para aumentar su potencial uso como dispositivo biomédico, pero además que sean biocompatibles y que mediante ciertos mecanismos pueda llevar a cabo la función de cargar y liberar de forma prolongada el medicamento.

Especialmente, los hidrogeles basados en polímeros naturales han sido estudiados para el tratamiento de heridas debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antibacteriana, alta capacidad de retención de fluidos, adhesión a tejidos y su fácil disponibilidad [3]. Además, son capaces de actuar como transportadores de fármacos y controlar la liberación de agentes antimicrobianos [4]. Hidrogeles basados en polisacáridos tales como quitosano, celulosa y alginato han sido reportados para este propósito [4–6]. Particularmente, la maltodextrina (MD) es un polisacárido obtenido a partir de la hidrólisis parcial del almidón y es considerada biocompatible, biodegradable y segura para consumo humano y/o sus potenciales aplicaciones [7, 8]. Estas propiedades hacen de la MD un potencial candidato para la preparación de hidrogeles biocompatibles/biodegradables para aplicaciones biomédicas tales como liberación controlada de fármacos, inmovilización de enzimas ingeniería de tejidos, etc. [9, 10].

Por su parte, el quitosano (CS) es un polisacárido pH sensible cuya principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino. Este biopolímero es el más abundante encontrado en la naturaleza después de la celulosa y ha sido usado ampliamente

en la industria de alimento y farmacéutica debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad [11, 12]. Sin embargo, el CS es poco soluble en soluciones acuosas neutras/alcalinas así como en disolventes orgánicos lo cual restringe su aplicación biomédica. No obstante, la presencia de grupos hidroxilo y amino dentro de su estructura permite su modificación mediante el injerto de moléculas funcionales que pudieran mejorar su solubilidad y proveerle de propiedades biológicas específicas. Además, el CS podría proveer propiedades antimicrobianas y antifúngicas como ya ha sido previamente reportado para este polisacárido [13].

Por lo tanto, este proyecto de investigación contempla la síntesis y caracterización de hidrogeles basados en MD y CS para su uso como sistemas de liberación de agentes antimicrobianos en la preparación de apósitos para el tratamiento de heridas. Previamente, MD y CS serán modificados con metacrilato de glicidilo y anhídrido maleico respectivamente para proveerlos de grupos funcionales susceptibles a ser polimerizado vía radicales libres. Los hidrogeles serán cargados con vancomicina (un agente antimicrobiano de amplio espectro) y se llevarán a cabo los estudios de liberación a condiciones de pH y temperatura fisiológicos. (7.4 y 37 °C respectivamente). Se probará su actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y además se realizarán ensayos de citotoxicidad *in vitro* para determinar la viabilidad celular de los hidrogeles en fibroblastos.

## CAPITULO I. ANTECEDENTES GENERALES

### 1.1 Heridas en la piel

La piel, el órgano más grande del cuerpo humano, cumple una función muy importante ya que es fundamental para la supervivencia del sistema biológico. Es un sistema de defensa que ayuda a proteger al cuerpo de infecciones microbianas, actuando como barrera físico-química contra patógenos y daños ambientales externos. Las personas se enfrentan a lesiones que causan defectos en la piel, debido a que es la región del cuerpo más afectada por daño provocando lesiones graves como hematomas, úlceras y cortes profundos, los cuales pueden ser causados por factores físicos, biológicos y químicos [14–16].

Las lesiones cutáneas se dividen en dos tipos: a) agudas, que se curan entre 8 y 12 semanas, y b) crónicas que pueden tardar meses y en algunos casos hasta años en curarse por completo. Las lesiones agudas suelen ser causadas por lesiones como quemaduras, laceraciones o abrasiones, donde los pasos normales de curación en las heridas agudas son la hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación; para una cicatrización satisfactoria es necesario mantener en un ambiente húmedo en la herida y educar bien al paciente para el cuidado de la misma. En este tipo de heridas, la eliminación de desechos dañinos y tejidos necróticos, exploración de lesiones subyacentes, control y cierre de infecciones son pasos importantes en su tratamiento. Además, en algunas ocasiones al haber heridas contaminadas, éstas deben dejarse abiertas para evitar que se desarrollen infecciones anaeróbicas [16, 17].

Por otro lado, las heridas crónicas son causadas por factores como vasculatura inadecuada o cualquier otro factor que impida la curación normal, como diabetes, atención primaria inadecuada e infecciones microbianas causadas por la presencia de patógenos como hongos y bacterias (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, etc.) convirtiéndose en un problema de salud grave, en particular en la cicatrización de heridas. Cabe destacar que las heridas crónicas incluyen úlceras de pie diabético, úlceras por presión y úlceras vasculares, por lo



cual en los últimos años se han desarrollado una amplia variedad de biomateriales para tratarlas [17][18].

### **1.1.1 Tratamientos convencionales de heridas**

El método más común para el cuidado de una herida son los apósitos tradicionales los cuales incluyen gasas, algodón y vendajes; su objetivo es la protección de la herida a contaminaciones externas. Sin embargo, este tipo de apósitos no mantienen un ambiente húmedo en la herida, lo cual causa adherencia a la zona afectada y fibras en las que se envuelve el tejido nuevo a medida que el exudado se coagula y la herida cicatriza de tal manera que no ayuda a acelerar la cicatrización de las heridas. Por lo tanto, en los últimos años se ha implementado el desarrollo de hidrogeles basados en materiales poliméricos que han acelerado el desarrollo de la ingeniería de tejidos de piel [19].

### **1.1.2 Avances en tratamientos para heridas**

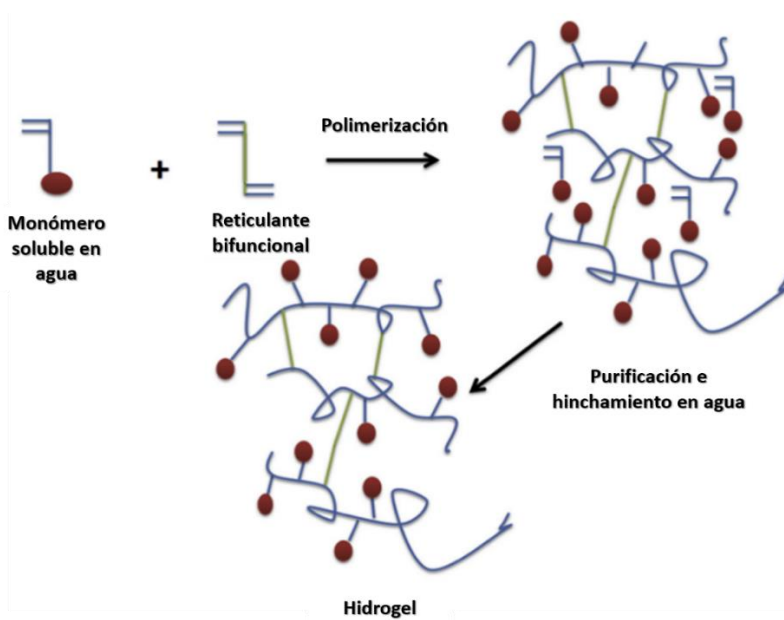
En 1962, Winter estableció uno de los principios fundamentales para el tratamiento de las heridas demostrando que se requiere de un entorno húmedo para tener como resultado una buena y rápida cicatrización de la herida. Dado este descubrimiento, se han utilizado hidrocoloides e hidrogeles en las heridas para proporcionar el ambiente húmedo deseado y así mejorar el desbridamiento [20].

Los hidrocoloides son apósitos bioactivos con dos capas, una interna con partículas coloidales hidrofílicas y una capa externa de poliuretano resistente a las bacterias; son una combinación de agentes formadores de gel (carboximetilceulosa, gelatina y pectina), elastómeros y recubrimientos adhesivos. Su aplicación se basa en una matriz que forma un gel al entrar en contacto con la superficie de la herida, para proporcionar un entorno húmedo para así proteger el tejido y ayudar en la regeneración del mismo. Es utilizado en heridas crónicas y heridas de gran espesor [21, 22].

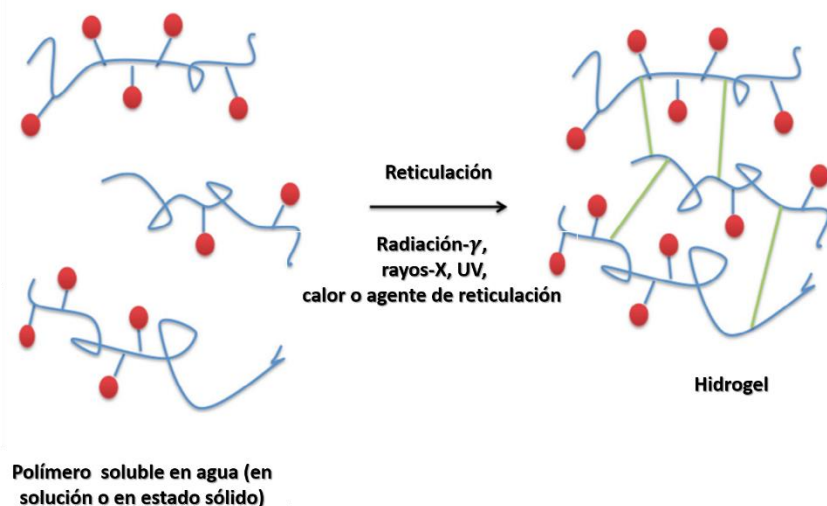
Los apósitos a partir de hidrogeles de igual manera mantienen la humedad en el sitio de la herida, tienen una alta capacidad de absorción del exudado y promueven la proliferación de fibroblastos así como la migración de queratinocitos, los cuales son importantes para la cicatrización de heridas [23]. Se han desarrollado apósitos de hidrogel con mejora en sus propiedades, obteniendo aplicaciones como inyectabilidad [24], adhesividad [25], actividad antibacteriana [26] y liberación de fármacos[27].

## 1.2 Hidrogeles

Los hidrogeles son redes tridimensionales compuestas por cadenas de polímeros hidrofílicos reticulados, las cuales pueden ser moldeadas en cualquier forma o tamaño y pueden absorber hasta mil veces su peso seco de agua o fluidos biológicos [28]. Se preparan de dos formas diferentes: polimerización tridimensional (Figura 1) donde el monómero hidrofílico se polimeriza en presencia de un agente de reticulación polifuncional, o mediante la reticulación directa de polímeros solubles en agua como se muestra en la Figura 2 [29].



**Figura 1.** Síntesis de hidrogeles mediante polimerización tridimensional [29].



**Figura 2.** Síntesis de hidrogeles a partir reticulación de la preparación de polímeros solubles en agua [29].

Los hidrogeles son flexibles, biodegradables, biocompatibles y tienen una estructura blanda muy similar a la de un tejido biológico. Presentan excelentes propiedades mecánicas, físicas y químicas únicas, las cuales los hace muy apropiados para su uso en áreas biomédicas como ingeniería de tejidos, aplicaciones de biosensores medicina regenerativa y sistemas de liberación de fármacos. Con la finalidad de aumentar las propiedades de los hidrogeles en sus distintas aplicaciones, se ha implementado la preparación de mezclas de hidrogel de al menos dos polímeros ya que al mezclarlos se forman interacciones de puentes de hidrogeno, van der Waals y electrostáticas en las cadenas de los polímeros, ayudando a aumentar la densidad del entrecruzamiento y obteniendo propiedades viscoelásticas y tixotrópicas al compuesto final [30].

Los hidrogeles se clasifican como naturales, sintéticos o híbridos, según la naturaleza de sus componentes. Los hidrogeles de origen natural son biocompatibles y promueven procesos biológicos como la unión celular y curación de tejidos, mientras que los hidrogeles puramente sintéticos tienen propiedades bioquímicas y mecánicas más consistentes. Los hidrogeles de origen natural se pueden crear utilizando precursores de biopolímeros de diferentes clases estructurales como los polisacáridos (alginato, ácido hialurónico) y

péptidos/proteínas (colágeno, gelatina, fibrina). También se clasifican según la forma en la que se entrecruzan (Figura 3) [31].



**Figura 3.** Clasificación de hidrogeles.

### 1.3 Hidrogeles basados en polisacáridos

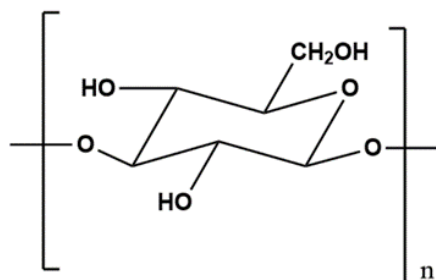
En los últimos años, aumentó el interés por el desarrollo de hidrogeles basados en polisacáridos como biomateriales inteligentes debido a que poseen propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad. Los polisacáridos comúnmente utilizados para preparar hidrogeles para aplicaciones relacionadas con biomateriales incluyen el almidón [32, 33], carboximetilcelulosa [34], alginato [35], quitosano [36], celulosa [37], pectina [38], ácido hialurónico [39], entre otros.

Los diversos grupos funcionales de los polisacáridos policatiónicos pueden modificarse con una amplia gama de ligandos, en las cuales se encuentran reacciones con aldehídos y cetonas (base de Schiff), quelación de metales, alquilación, sulfonación, carboximetilación, acetilación por injerto, cuaternización y de la misma manera los grupos hidroxilo (-OH) los cuales dan como resultado modificaciones químicas como la sulfonación, carboximetilación, fosforilación o hidroxietilación [40]. Las modificaciones dan como

resultado el proveer grupos funcionales susceptibles para los distintos tipos de obtención de los hidrogeles a partir de polisacáridos.

### 1.3.1 Maltodextrina

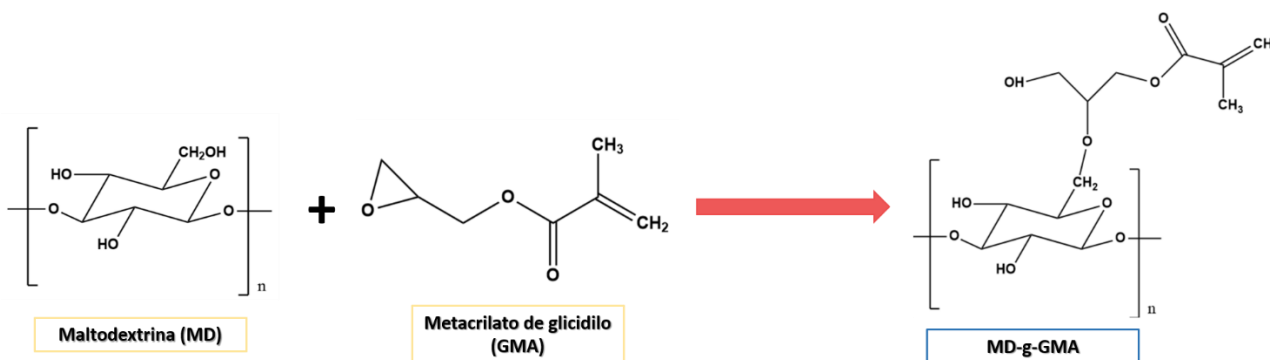
La maltodextrina (MD) es un polisacárido producido a partir de hidrólisis parcial del almidón. Su estructura química (Figura 4) es formada a partir de unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de  $\alpha$ -1,4 o  $\alpha$ -1,6, siendo una mezcla de cadenas que varían de 3 a 17 unidades de glucosa. La MD es segura, económica y muy soluble en agua; ha sido ampliamente utilizada en industria biomédica y alimentaria debido a su alta biocompatibilidad y degradabilidad. En los últimos años, se ha implementado la preparación de hidrogeles para aplicaciones biomédicas como liberación controlada de fármacos, inmovilización de enzimas, ingeniería de tejidos, entre otros [9, 41–43].



**Figura 4.** Estructura química de la maltodextrina.

#### 1.3.1.1 Modificación de maltodextrina.

La formación de hidrogeles a base de MD presenta limitantes por su alta solubilidad en agua, por lo que es necesario realizar una previa modificación para llevar a cabo la polimerización; el metacrilato de glicidilo (GMA) le da la propiedad de dotar sus restos metacrílicos y así obtener una reacción de reticulación (ver la Figura 5) [44, 45].



*Figura 5. Modificación de MD con metacrilato de glicidilo.*

### 1.3.1.2 Hidrogeles basados en maltodextrina

Nickerson y col. (2006) crearon un sistema compuesto de biopolímero utilizando gelatina y maltodextrina (MD) entrecruzada con fijadores no tóxicos, para mejorar su biocompatibilidad en nuevas aplicaciones alimentarias, investigando sus propiedades físicas (resistencia mecánicas y capacidad de hinchamiento) y cambios en su morfología. Ellos encontraron que, mediante el control de la composición, pH y agente de entrecruzamiento se obtienen las morfologías y propiedades físicas correspondientes a un hidrogel de gelatina-MD personalizado [9].

Por su parte, Khan y col. (2010) desarrollaron hidrogeles de gelatina-MD entrecruzados con genipina los cuales fueron cargados con fluoróforos de dextranos (FTIC-dextrano) para el estudio de su comportamiento en pruebas de hinchamiento, carga y liberación. Concluyeron que la composición del hidrogel afecta significativamente el comportamiento de la liberación de FTIC-dextrano y que un incremento del contenido de MD aumenta la velocidad de liberación del mismo. Además, observaron que al tener una combinación adecuada de densidad de entrecruzamiento, pH del disolvente y microestructura del hidrogel se puede modular el hinchamiento lo cual permite obtener hidrogeles de gelatina-MD que resultan ser una opción viable para plataformas de liberación controlada [46].



Paulino y col. (2011) sintetizaron un hidrogel magnético (ferrogel) a base de MD modificada con GMA. El ferrogel fue sintetizado a partir de métodos convencionales con un encapsulado de nanopartículas de magnetita en una matriz polimérica. De acuerdo a los métodos de caracterización utilizados, se confirmó el entrecruzamiento del hidrogel y una excelente adherencia de las nanopartículas en la estructura del hidrogel. Sus propiedades como la alta elasticidad y sensibilidad a los campos magnéticos permitirían su aplicación como liberadores de fármacos, proteínas, etc., en sitios específicos del cuerpo humano [44].

Recientemente, Zuo y col. (2023), presentaron la síntesis de hidrogeles de MD, alcohol polivinílico (PVA) y ácido tánico (TA) a partir de la técnica de ciclo de congelación y descongelación. Los resultados a través de DRX y FTIR demostraron una estructura de red tridimensional formada por interacciones de hidrogeno entre MD, PVA y TA. La MD fue utilizada debido a su capacidad de promover la proliferación de los fibroblastos y ejercer un efecto quimiotáctico sobre los leucocitos polimorfonucleares. También, observaron que el TA no solo actuó como agente entrecruzante, sino que también dotó a los hidrogeles de propiedades antioxidantes y antibacterianas. Además, reportaron que el hidrogel con contenido de TA del 0.5%, mostró un potencial prometedor como materiales biomédicos con efectos terapéuticos en la cicatrización de heridas [47].

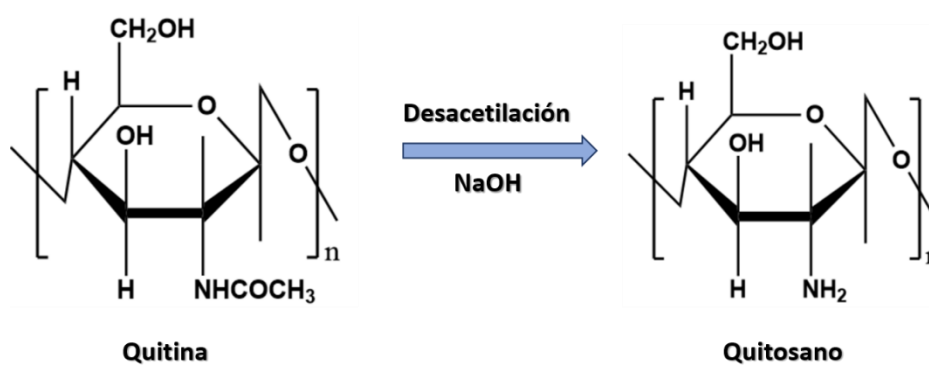
### 1.3.2 Quitosano

El quitosano (CS) (Figura 6) es un biopolímero natural que presenta grupos amino reactivos que ayudan a la aceleración de cicatrización de heridas, antimicrobiano, anticoagulante, antibacteriano, antifúngico, antitumoral, y hemostático. Representa a la familia de polisacáridos de poli-(beta-1-4) *N*-acetil-D-glu-cosamina, donde sus propiedades dependen del grado de desacetilación, peso molecular promedio, polidispersidad y estructura [4].

El CS se puede producir mediante la hidrólisis de quitina alcalina o enzimática, un proceso conocido como desacetilación. Los invertebrados (conchas de crustáceos o cutículas de insectos) y los hongos (envolturas de champiñones, algas verdes, paredes celulares y levaduras) contienen quitina. El proceso de desacetilación implica la eliminación de los

grupos aceto del quitosano utilizando soluciones de hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), mezclas de hidracina anhidra y sulfato de hidracina [48].

Las interesantes propiedades del CS como la biocompatibilidad, no toxicidad, baja alergenicidad y la biodegradabilidad, permiten su uso en aplicaciones biológicas y biomédicas como por ejemplo materiales para la cicatrización de heridas, excipiente farmacéutico o portador de fármacos, tratamiento de la obesidad y como andamio para ingeniería de tejidos [49].



**Figura 6.** Representación de la reacción de desacetilación de quitina para formar quitosano [50].

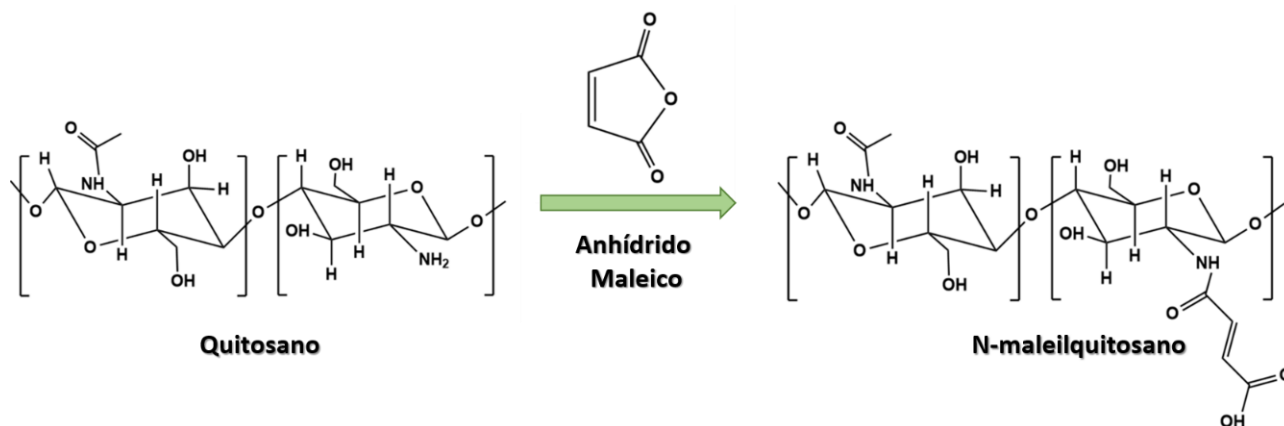
Sin embargo, el CS es poco soluble en soluciones acuosas neutras/alcalinas así como en disolventes orgánicos lo cual restringe su aplicación biomédica. No obstante, la presencia de grupos hidroxilo y amino dentro de su estructura permite su modificación mediante el injerto de moléculas funcionales que pueden mejorar su solubilidad y dotarlo de propiedades biológicas específicas [13].

### 1.3.2.1 Modificación de quitosano

Debido a su naturaleza hidrofílica e insolubilidad en ciertas condiciones fisiológicas, los hidrogeles de CS tienen aplicaciones limitadas en la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos, sin embargo, las propiedades del hidrogel se pueden cambiar

modificando el polímero, obteniendo dicha modificación mediante reacciones en sus grupos amino e hidroxilo [51].

El anhídrido maleico (AM) contiene grupos carboxilo que aumentan las propiedades hidrofílicas de CS, el cual al contener grupos carboxilo aumenta la capacidad del intercambio iónico y solubilidad, siendo una buena opción para modificar este polisacárido (Figura 7) [52].



**Figura 7.** Modificación de CS con anhídrido maleico.

### 1.3.2.2 Hidrogeles de quitosano

Zhang y col. (2018) prepararon un hidrogel compuesto de CS, heparina y poli(ácido  $\gamma$ -glutámico), el cual fue cargado de antioxidantes para la cicatrización de heridas crónicas como úlceras del pie diabético. El hidrogel presentó una buena capacidad de hinchamiento, comportamiento viscoelástico típico y apropiadas propiedades mecánicas. En modelos de ratas diabéticas, el hidrogel exhibió buenas propiedades físicas y pudo promover la reparación del trauma crónico de manera efectiva, por lo cual se concluyó que es un apósito prometedor para la cicatrización de heridas [53].

Por su parte, Zhang y col. (2019) sintetizaron un hidrogel basado en lignina-CS-PVA como apósito para heridas con actividad bactericida y antioxidante, alta resistencia mecánica y gran deformación por tracción. Añadieron lignina para una mejora en la capacidad de absorción y resistencia mecánica del hidrogel y comprobaron que los grupos sulfonato de

la lignina formaron enlaces iónicos con los grupos amino del CS, aumentando así la resistencia mecánica del hidrogel. Se demostró que acelera la cicatrización de heridas en comparación con un hidrogel de CS y PVA y puede ser utilizado en una amplia variedad de aplicaciones médicas [54]. Ese mismo año, Xue y col. (2019) reportaron la preparación de un hidrogel de quitosano-Matrigel-poliactamida (CS-M-PAM), donde el CS dotó de actividad antimicrobiana para promover la regeneración tisular y acelerar el proceso de cicatrización de heridas. Además, este hidrogel presentó propiedades hemostáticas y adhesivas, las cuales le confieren excelentes propiedades para ser usado como apósito bioactivo en heridas de piel [55]. Por otro lado, Iqbal y col. (2020) sintetizaron un hidrogel a partir de una mezcla de quitosano/poli(alcohol vinílico)/goma guar (CS/PVA/GG) utilizando como agente entrecruzante formaldehído. La mezcla fue caracterizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), FT-IR y DRX. Por otro lado, las pruebas de hinchamiento sugirieron que la reticulación afecta la hidrofilia de los hidrogeles. Además, los resultados del estudio de la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis* indicaron que los hidrogeles podrían ser adecuados para su uso en aplicaciones biomédicas [56].

Fu y col. (2021) prepararon perlas antibacterianas a base de hidrogel de quitosano-gelatina (CS/GE), a partir de una reacción de reticulación entre ellos, desencadenada por radicales foto inducidos generados por riboflavina, la cual, en compañía de CS y GE, le proporcionan al hidrogel actividad antibacteriana contra *E. coli*. [57]. Recientemente, Wei y col. (2022) desarrollaron hidrogeles de (CS) y alginato de sodio (SA). El CS dotó propiedades hemostáticas, antimicrobianas y de citocompatibilidad, las cuales resolvieron dos dificultades claves en las primeras etapas de cicatrización de heridas (hemostasia e inflamación). A través de la investigación histológica de cicatrización de heridas *in vivo*, los resultados muestran que los hidrogeles de CS/SA tienen un gran potencial como apósitos de hidrogel multifuncionales para la regeneración de piel con citocompatibilidad hemostática, antibacteriana y sostenida para la reparación normal de la piel [58]. En ese mismo año, Lungu y col. (2022), entrecruzaron CS con ácido 2-formil-fenil-borónico para producir un hidrogel, determinaron su biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas. El

hidrogel demostró carecer de toxicidad contra fibroblastos dérmicos humanos y presentó actividad antimicrobiana contra patógenos como *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* [59].

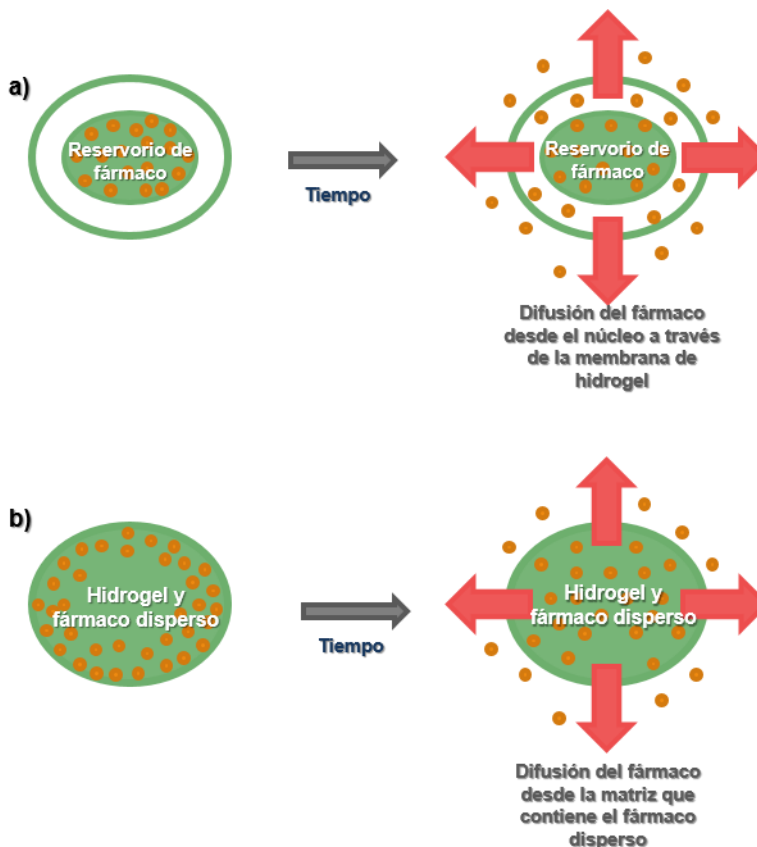
Más recientemente, Tatarusanu y col. (2023), desarrollaron nuevos hidrogeles inteligentes, a base de diferentes relaciones de CS, CS oxidado (oxCS) y ácido hialurónico (oxAH) como agentes entrecruzantes. Mediante métodos espectrales confirmaron la presencia de enlaces imino dinámicos en la estructura de los hidrogeles, los cuales respaldaron sus propiedades de autocuración y autoadaptación. Fueron caracterizados mediante SEM, grado de hinchamiento, pH y su matriz 3D por comportamiento reológico. Los hidrogeles demostraron no ser citotóxicos y presentaron efectos antibacterianos sobre *S. aureus* [60].

#### **1.4 Hidrogeles como transportadores de fármacos**

Las propiedades físicas de los hidrogeles, como lo es su porosidad, le imparte beneficios muy importantes en la aplicación de administración de fármacos. La porosidad depende de la densidad de entrecruzamiento en la matriz del hidrogel y afinidad por el medio acuoso en el que se hincha. Su porosidad y compatibilidad con medios acuosos les confieren el potencial de ser vehículos de administración de fármacos biocompatibles. Su velocidad de liberación depende de la difusión de la molécula o macromolécula a través de la red del hidrogel. La estructura del hidrogel le da la capacidad de deformarse dándole la ventaja de adaptarse a diferentes geometrías de superficie en su aplicación, esto combinado con sus propiedades bioadhesivas, le da la ventaja de quedar fijo en el sitio aplicado y al no existir una superficie horizontal se puede mantener en esa posición. [61–63].

El método de liberación de fármacos en hidrogeles se realiza mediante dispositivos o matrices que permitan su liberación, ya sea a través de la red del hidrogel o a través de poros llenos de agua. Uno de los sistemas consta de una membrana de hidrogel que cubre un núcleo, creando una cápsula o esfera con una alta concentración de fármaco en el centro del sistema, esto para facilitar una tasa sostenida de liberación de fármaco. De manera similar, existe un sistema que produce una liberación sostenida e independiente del fármaco, donde el sistema matricial opera a través de poros o de su red macromolecular y

tiene una liberación dependiente del tiempo, donde su liberación inicial es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo constante como en el caso anterior, estos dos sistemas se muestran en la Figura 8 [63].



**Figura 8.** (a) Sistema donde el núcleo que contiene el fármaco está recubierto de una membrana de hidrogel y la concentración del fármaco es mayor en el centro del sistema para su liberación constante. (b) Dispersión o disolución uniforme del fármaco en toda la estructura tridimensional del hidrogel mediante el suministro de matriz donde la liberación es dependiente del tiempo [63].

## 1.5 Hidrogeles en la liberación de agentes antimicrobianos

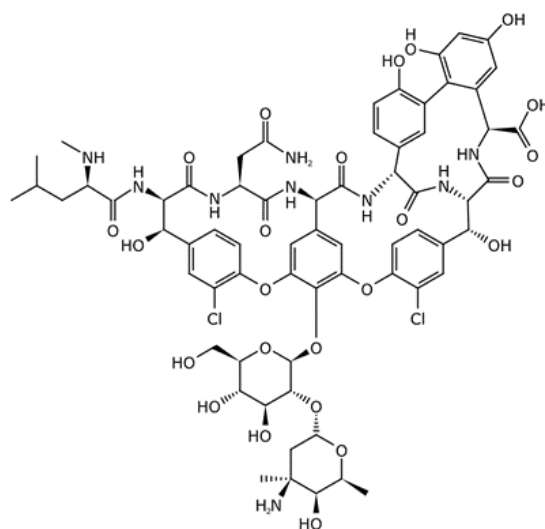
Los hidrogeles son una alternativa para la preparación de materiales antimicrobianos usados como apósitos para heridas. Esto se debe a su gran capacidad de absorber grandes cantidades de agua que facilita la actividad inmunológica de las células, lo que es importante en una buena cicatrización de heridas. No obstante, el mismo ambiente hidratado puede promover infección bacteriana, por lo cual, se desean hidrogeles que



proporcionen una acción antimicrobiana además de sus funciones principales (cicatrización y suministro de fármacos) [18, 64].

Los agentes antimicrobianos más comúnmente utilizados en años recientes son los extractos biológicos (extracto de algas marinas, aloe vera, aceites esenciales, etc.) y los antibióticos, siendo estos últimos los más efectivos hasta ahora. Dentro de los antibióticos de uso común utilizado para hidrogel antimicrobianos se encuentran amoxicilina, ampicilina, celosporina, gentamicina, ciprofloxacino, vancomicina, entre otros [65].

La Vancomicina (Figura 9) es un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana y es utilizada para tratar infecciones graves y potencialmente mortales causadas por bacterianas Gram-positivas y bacterias *S. aureus* resistentes a meticilina. Sin embargo, la vancomicina en dosis altas (30 mg/kg/día para adultos) tiene efectos secundarios negativos y puede causar nefrotoxicidad, ototoxicidad y reacciones de hipersensibilidad. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de administración de antibióticos que disminuyan los efectos secundarios ocasionados por los tratamientos convencionales. Recientemente, se ha reportado que los hidrogel son candidatos muy prometedores para la entrega controlada de vancomicina en la zona afectada [65–68].



**Figura 9.** Estructura de la vancomicina.

Villanueva y col. (2016) prepararon un hidrogel a base de almidón reforzado con nanopartículas de cobre recubiertas de sílice (Cu NPs). El hidrogel se sintetizó utilizando urea y agua como plastificantes y distintas concentraciones de nanopartículas de sílice (SiCu NP). Se analizó la actividad antimicrobiana de especies bacterianas Gram-negativas (*E. coli*) y Gram-positivas (*S. aureus*); demostrando que los hidrogeles conservan una buena actividad antimicrobiana por lo que tiene un alto potencial para aplicaciones en diversos campos clínicos, como apósitos y rellenos para heridas [69].

Por su parte, Kumar y col. (2019) desarrollaron hidrogeles de PEG-CS para la administración controlada del antibiótico ciprofloxacino y albúmina de suero bovino (BSA, proteína modelo para aplicaciones antibacterianas) para prevenir infecciones y acelerar cicatrización de heridas crónicas. Se encontró que los hidrogeles eran citocompatibles y no citotóxicos para las células de mamíferos y que tenían resiliencia mecánica. Estos biomateriales inhibieron el crecimiento bacterial debido a la presencia del CS en las redes del hidrogel. Del mismo modo, el hidrogel demostró una liberación sostenida de antibióticos por hasta 24 h y una actividad bactericida contra *E. coli* por hasta 12 h. Por otro lado, los estudios con BSA revelaron que proporcionan una liberación sostenida de proteínas [70]. Ese mismo año, Fun-Chin y col. (2019) reportaron la síntesis de un hidrogel antimicrobiano de citrato de almidón, a partir del entrecruzamiento físico del almidón, alcohol polivinílico (PVA) y polietilenglicol (PEG) por medio de la técnica de congelación y descongelación. El hidrogel demostró una excelente actividad antimicrobiana contra bacterias como *E. coli*, *Staphylococcus pyogenes* (bacterias Gram-negativo), *Salmonella thypimurium* y *Streptococcus aureus* (bacterias Gram-positivo). Del mismo modo, el hidrogel de citrato de almidón cargado con penicilina G mostró actividad antimicrobiana sinérgica contra bacterias resistentes a múltiples antibióticos (*Salmonella thypimurium*, *E. coli* (O15:H7) y *Control de E. coli* (ATC 2925)). Los autores concluyeron que el hidrogel posee un alto potencial aplicación como vehículo de administración de fármacos antimicrobianos y podría mejorar la eficacia de los antibióticos [71].

Pino-Ramos y col. (2021) reportaron la fabricación de hidrogeles altamente entrecruzados con excelentes propiedades mecánicas a partir de agar y ácido acrílico por medio de

radiación gamma el cual promovió la reticulación. De igual manera, se investigó su capacidad de absorción de agua y pH crítico; realizaron pruebas *in vitro* contra *E. coli* y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) revelando que el hidrogel tiene una capacidad considerable para cargar nanopartículas de plata (AgNP), lo que le confiere actividad antimicrobiana. Como resultado, estos hidrogeles sintéticos pueden ser utilizados para aplicaciones biomédicas como apósitos para heridas por quemaduras y prevención de infecciones bacterianas en la piel afectada [72].

Por su parte, Mallick y col. (2021) combinaron el oligosacárido de CS (CO) con carboximetilcelulosa (CMC) para crear un hidrogel biocompatible y una eficiente administración de fármacos. El hidrogel de CO y CMC fue combinado con glutaraldehído, alcohol y agua destilada como agente entrecruzante y caracterizado mediante microscopía óptica y resistencia mecánica. Además, los autores determinaron la composición ideal para sus funciones en la liberación de ácido salicílico como agente antimicrobiano [73].

Meléndez-Ortiz y col. (2021) crearon hidrogeles antimicrobianos basados en MD mediante copolimerización con ácido acrílico (AAc) o acrilamida (AAM) con nanopartículas de ZnO. Las pruebas de hinchamiento revelaron que los hidrogeles con poliacrilamida tienen mayor capacidad de hincharse que los que contenían ácido poliacrílico. De igual manera, demostraron actividad antimicrobiana en los hidrogeles cargados con ZnO contra *E. coli* y *S. aureus* y concluyeron que debido a sus propiedades antimicrobianas y de hinchamiento, estos hidrogeles podrían usarse en el campo biomédico, particularmente como apósitos para heridas [45]. Los mismos autores llevaron a cabo el injerto de un hidrogel de MD y poli (ácido acrílico) (PAAc) utilizando N-maleilquitosano como reticulante en gasas de algodón. Las gasas injertadas fueron capaces de cargar vancomicina e inhibir el crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* y el uso del CS como reticulante tuvo un efecto sinérgico favorable contra las bacterias. [74].

Por su parte, Wang y col. (2022), sintetizaron un hidrogel a base de CS, tioacetal a base de cinamaldehído (CTA) y genipina (G) como agente entrecruzante para su uso como apósito de heridas agudas. El objetivo de este apósito fue tratar las heridas asociadas a MRSA. Descubrieron que el hidrogel CS-CTA-G cargado con vancomicina mostró una rápida

cicatrización de heridas asociadas a *MRSA* en pruebas *in vivo* e *in vitro*. También, el hidrogel presentó propiedades superiores en morfología, reología, hinchamiento, biocompatibilidad siendo un excelente vehículo para la liberación controlada de fármacos para infecciones bacterianas en la piel [75].

Más recientemente, Akhlaghi y col. (2023) prepararon y caracterizaron un hidrogel de CS con nanopartículas de ZnO, el cual fue cargado con vancomicina para mejorar su efecto antimicrobiano. Demostraron que el hidrogel fue capaz de mantener y controlar la liberación de la vancomicina en respuesta a medios ácidos durante 96 h. También, emplearon el método de “Kirby-Bauer” de difusión de disco en agar para sus estudios antimicrobianos, los cuales demostraron una actividad antibacteriana eficaz contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*. [76].

En base a los antecedentes reportados anteriormente, en este trabajo se pretende sintetizar un nuevo hidrogel basado en MD y CS el cual no ha sido reportado hasta la fecha de acuerdo a una revisión bibliográfica exhaustiva hecha recientemente. Este hidrogel será cargado con un agente antimicrobiano (vancomicina) para evaluar su actividad antimicrobiana. Además, estos hidrogeles serán evaluados como sistemas de carga y liberación para determinar su potencial uso como apósitos en el tratamiento de heridas.

## OBJETIVO GENERAL.

Preparar un hidrogel basado en los polisacáridos de maltodextrina (MD) y quitosano (CS) mediante polimerización por radicales libres que presente propiedades antimicrobianas.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Modificar MD con metacrilato de glicidilo (GMA) y CS con anhídrido maleico (AM) para proveerles de grupos susceptibles a polimerizar vía radicales libres.
- 2) Copolimerizar los polisacáridos modificados mediante polimerización por radicales libres para obtener un hidrogel variando diversos parámetros de reacción tales como relación molar, concentración de comonómeros y tiempo de reacción.
- 3) Caracterizar los materiales preparadas mediante diversas técnicas físico-químicas tales como espectroscopia de infrarrojo (FT-IR), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopia electrónica de barrido (SEM).
- 4) Estudiar el comportamiento de hinchamiento en agua de los hidrogeles, así como la carga y los perfiles de liberación de vancomicina a pH 7.4.
- 5) Determinar la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas (*E. coli*) y Gram-positivas (*S. aureus*) a los hidrogeles previamente cargados con el agente antimicrobiano.
- 6) Evaluar la viabilidad celular de los hidrogeles frente a la línea celular de fibroblastos humanos sanos.

## JUSTIFICACIÓN

La preparación de hidrogeles basados en materiales biocompatibles es una estrategia importante para la preparación de apósitos en el tratamiento de heridas. Particularmente, la MD es considerada biocompatible, biodegradable y segura para consumo humano y/o sus potenciales aplicaciones biomédicas. Estas propiedades hacen de la MD un potencial candidato para la preparación de hidrogeles biocompatibles/biodegradables. Sin embargo, este tipo de polisacárido no pueden formar hidrogeles por sí solos, necesitan previa funcionalización, así como el uso de agentes entrecruzantes y/o co-monómeros para su formación.

Por otro lado, la modificación del CS planteada en la propuesta permitirá su uso como comonómero en la formación de hidrogeles con MD. Aunado a esto, debido a las propiedades intrínsecas del CS, este puede contribuir a la actividad antimicrobiana del hidrogel que será sintetizado. Sin embargo, estos polisacáridos no pueden entrecruzarse por sí solos, por lo cual es necesario el uso de un agente entrecruzante que les permita reaccionar químicamente entre sí para formar una red sólida, obtener el entrecruzamiento de estos biomateriales poliméricos y lograr la formación de un hidrogel con interés biomédico.

Además, los resultados obtenidos a partir de esta investigación podrían marcar pauta para extrapolarlos hacia el estudio en la copolimerización con otros polisacáridos de interés biomédico (alginatos, xilanos, carrageninas, etc).

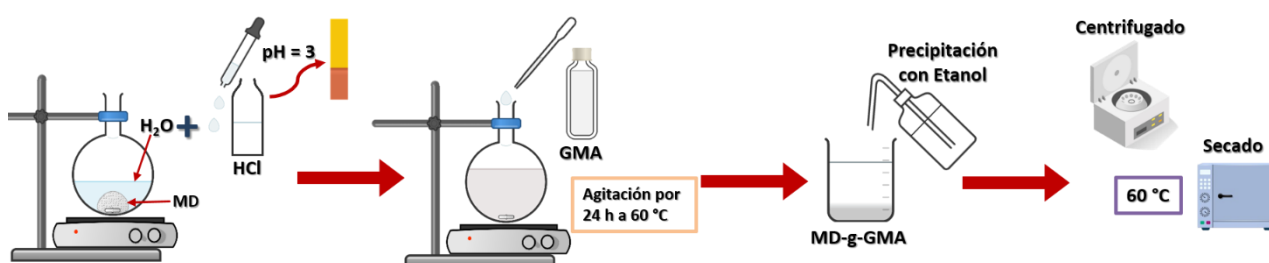
## HIPÓTESIS

Es posible la preparación de hidrogeles basados en maltodextrina y quitosano mediante polimerización por radicales libres capaces de cargar y liberar un agente antimicrobiano de amplio espectro (vancomicina). Además, el quitosano modificado puede contribuir a la actividad antimicrobiana del propio hidrogel. Se espera que el hidrogel presente un efecto noble en fibroblastos humanos y por tanto no sea un material citotóxico.

## CAPITULO II METODOLOGÍA

### 2.1 Síntesis de MD modificada con GMA

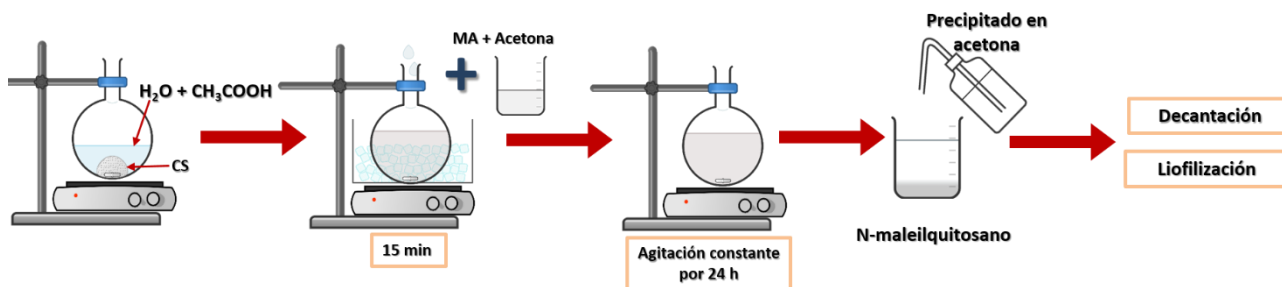
Primeramente, una cantidad determinada de MD (4 g) se disolvió en 10 mL de agua desionizada. Entonces, se añadió una solución de HCl (1.6 M) gota a gota hasta que se alcanzó un valor aproximado de pH 3. Luego, se añadió GMA (8 g) y la solución se dejó en agitación por 24 h a 60 °C. La MD modificada con GMA se obtuvo mediante la precipitación en etanol, fue centrifugada y secada a 60 °C (Figura 10).



**Figura 10.** Procedimiento experimental de la síntesis de MD modificada con GMA.

### 2.2 Síntesis de CS modificado con MA

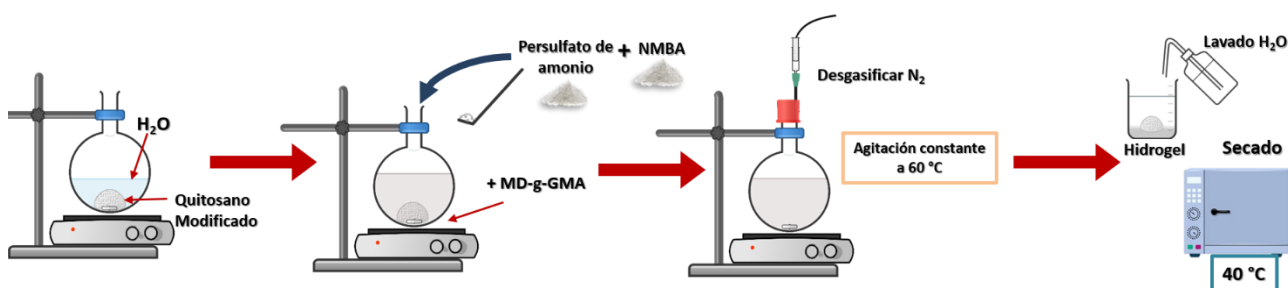
El CS se modificó con anhídrido maleico como sigue: 1.0 g de CS se disolvió en 33 mL de agua y 0.3 mL de ácido acético. Posteriormente, 2 mL de una solución de MA en acetona (2.0 g) se añadió gota a gota a la solución de CS con agitación en un baño de hielo. Después de 15 min de reacción, la mezcla se colocó a temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. El producto se precipitó en 100 mL de acetona, se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior uso (Figura 11).



**Figura 11.** Procedimiento experimental de la síntesis de CS modificada con AM.

## 2.3 Preparación del hidrogel de poli(maltodextrina-co-quitosano)

En un matraz bola se disolvieron 500 mg de CS modificado en un volumen de 10 mL de agua desionizada. Una vez disuelto se añadieron, 500 mg de MD modificada con GMA hasta su disolución total. Entonces, se agregó como agente entrecruzante N,N'-metilen-bis-acrilamida (NMBA) y el iniciador persulfato de amonio (APS, 5% en peso con respecto a la cantidad de comonomeros). El matraz se selló con una septa y se desgasificó con nitrógeno durante 20 min para posteriormente colocarse en baño de temperatura controlada a 60 °C y agitación constante por un tiempo determinado hasta la formación del hidrogel. El hidrogel fue lavado con agua para eliminar residuos de monómeros sin reaccionar y se secó en una estufa de vacío a 40 °C para su posterior caracterización. En esta parte se varió la proporción en peso de MD y CS (3:1, 1:1 y 1:3), cantidad de agente entrecruzante (2.5, 5, 10 y 20%), así como el tiempo de reacción (0.5, 1 y 4 h) para determinar su efecto en la formación del hidrogel (Figura 12).



**Figura 12.** Procedimiento experimental de la síntesis de un hidrogel de poli(MD-co-CS).

## 2.4 Estudios de hinchamiento, carga y liberación de vancomicina

### 2.4.1 Pruebas de hinchamiento

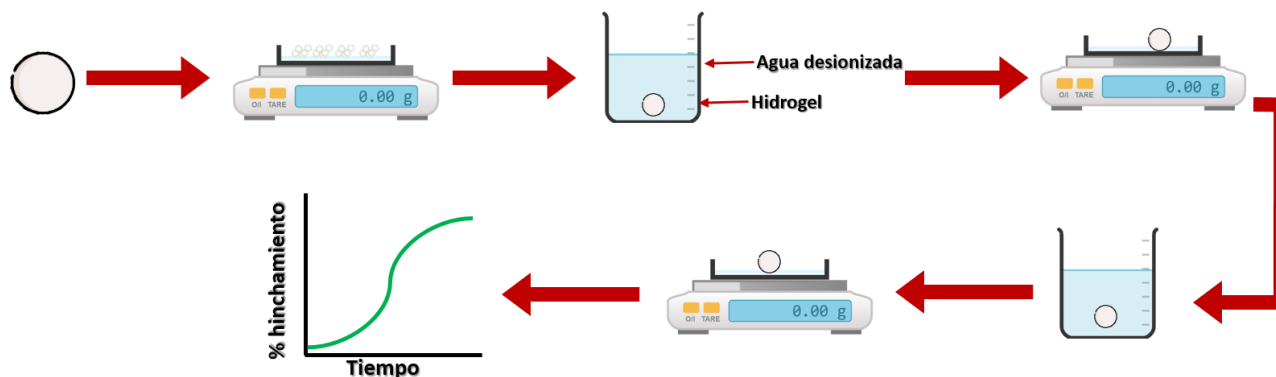
Se llevaron a cabo pruebas de hinchamiento para determinar la capacidad de retención de agua de los hidrogeles preparados. Para esto, los hidrogeles sintetizados (previamente secados y pesados), se sumergieron en agua desionizada a temperatura ambiente y un tiempo determinado. Transcurrido este tiempo, la muestra se sacó, se eliminó el exceso de



agua y se pesó la muestra para posteriormente sumergirla nuevamente en agua. Se construyeron gráficas de la dependencia del porcentaje de hinchamiento con respecto al tiempo (Figura 13). El tiempo de hinchamiento límite es determinado por el punto en el cual el porcentaje de hinchamiento es constante. El porcentaje de hinchamiento se determina con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hinchamiento} = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100$$

Donde  $W_s$  = peso del hidrogel hinchado,  $W_0$  = peso inicial del hidrogel.

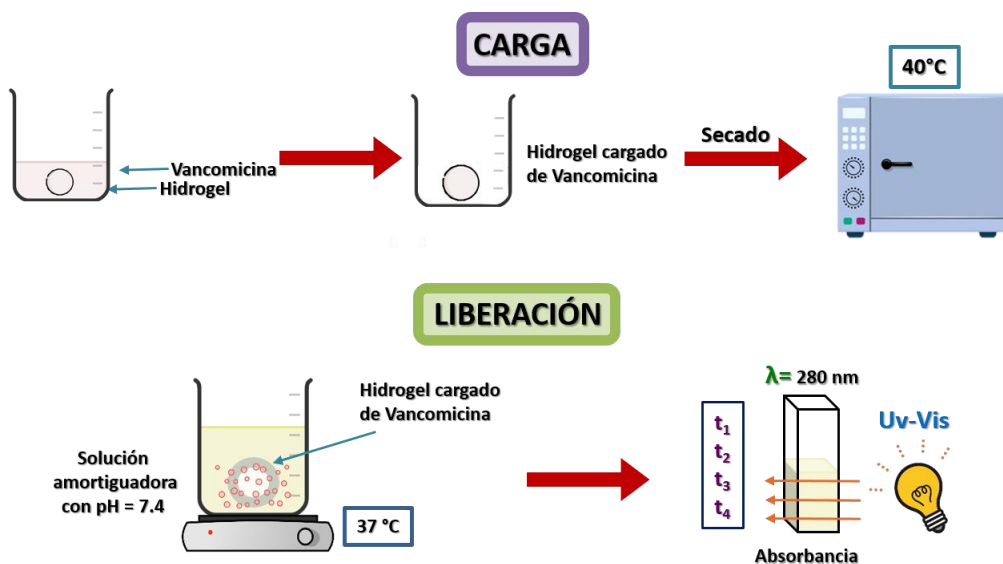


**Figura 13.** Procedimiento experimental de pruebas de hinchamiento para los hidrogel de poli(MD-co-CS).

### 2.4.2 Carga y liberación de vancomicina.

Para la carga del agente antimicrobiano, una muestra de hidrogel (previamente pesada ~30-50 mg) se sumergió en 0.5 mL de una solución de vancomicina (2 mg/mL), hasta alcanzar el máximo de adsorción. Una vez cargado el fármaco, el material se secó en una estufa de vacío a 40 °C. Para los estudios de liberación, una muestra de hidrogel cargada previamente con vancomicina se sumergió en 10 mL de una solución amortiguadora de pH 7.4 a 37 °C con agitación moderada. La liberación del agente antimicrobiano se monitoreó a intervalos de tiempo determinados mediante espectrofotometría de UV a 280 nm (UV-vis

JENWAY 7305). Para esto se tomó una alícuota de 2 mL al tiempo determinado y posteriormente se devolvió al medio de liberación. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado (Figura 14).

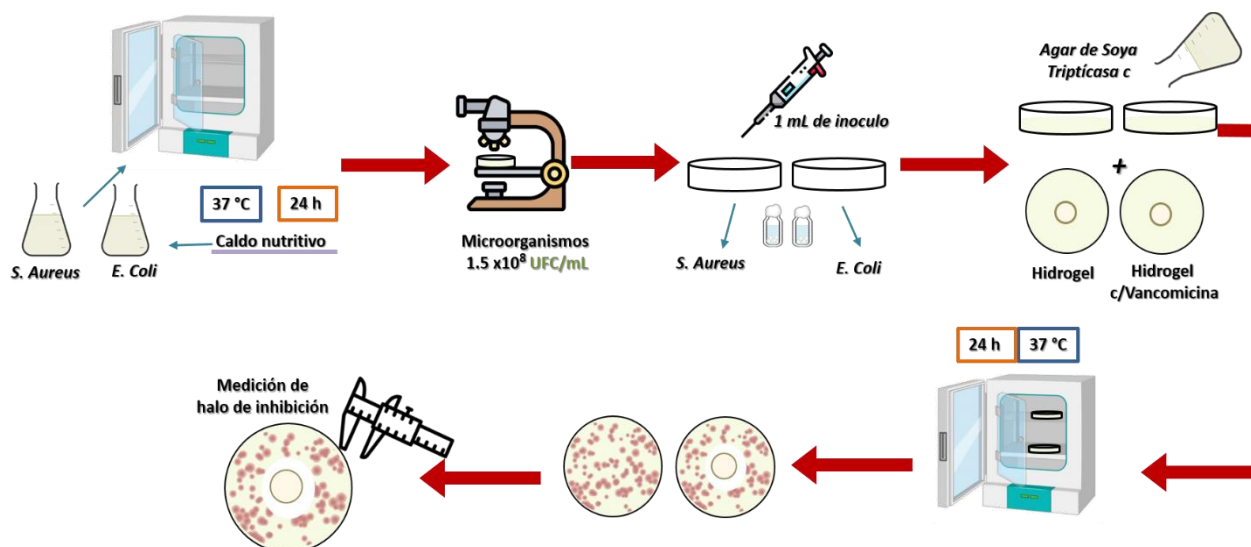


**Figura 14.** Procedimiento experimental de la carga y liberación de vancomicina para los hidrogeles de poli(MD-co-CS).

## 2.5 Actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antimicrobiana de los hidrogeles sintetizados con 2.5 y 5% de NMBA a una proporción en peso 1:1 (MD:CS), 5% de APS y 1 h de reacción, se usó el método de “Kirby-Bauer” también conocido como método de difusión de disco, el cual es una herramienta estándar que ayuda a medir la eficacia de los agentes antimicrobianos contra microorganismos patógenos [77]. La vancomicina es activa frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, de acuerdo a esto se determinó la actividad antimicrobiana para cada tipo de cepa, en el estudio se utilizaron las bacterias modelo *E. coli* y *S. Aureus* disponibles en el laboratorio. Cada cepa bacteriana (*E. coli*, ATCC-25922 y *S. aureus*, ATCC 29213) se inoculó en caldo nutritivo marca BD Bioxion y se dejó crecer en una incubadora a 37 °C durante 24 h. La concentración de bacterias fue ajustada a un valor de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Después se

prepararon cajas Petri con 1 mL del inóculo de las bacterias a evaluar para posteriormente añadir un medio de soya de tripticaseína (10 mL) previamente esterilizado. Una vez que el agar comienza a gelificarse se agregó el hidrogel a evaluar ( $\approx 50$  mg) y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C por 24 h. Luego del período de incubación se midió el diámetro de la zona del halo de inhibición alrededor de las muestras de hidrogel (Figura 15).



**Figura 15.** Procedimiento experimental por el método de “Kirby-Bauer” para la medición de la actividad antimicrobiana de los hidrogeles de poli(MD-co-CS).

## 2.6 Ensayos de citotoxicidad

Para determinar los ensayos de citotoxicidad, los cultivos de fibroblastos humanos sanos 1132SK (ATCC) se cultivaron en medio DMEM (Corning, Manassas, USA), suplementado con suero bovino fetal al 10% (Corning, Manassas, USA) en una atmósfera humidificada a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Las células se sembraron en placas de 24 pozos (35,000 células por pozo) 24 h antes del tratamiento. Luego, se realizó la preparación del extracto, añadiendo 10 mg de los hidrogeles en 1 mL de medio de cultivo DMEM, posteriormente se incubó a 37 °C durante 24 h. Para el tratamiento de cultivo se adicionaron alícuotas de 100  $\mu$ L de cada uno de los extractos a los cultivos de fibroblastos humanos 1132SK y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Al finalizar las 24 h de tratamiento, los cultivos celulares

fueron fijados con 250  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de tinción cristal violeta (0.25%) durante 30 min a temperatura ambiente. Enseguida, se retiró el exceso de colorante mediante tres lavados de agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente. Al finalizar el secado, los cultivos fueron fotografiados usando una cámara digital Olympus EM-5 Mark III con un aumento digital de 5X. Después, los cultivos fueron desteñidos usando 1 mL de SDS al 1% y la absorbancia fue determinada a 570 nm en el lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific).

## **2.7 Caracterización del hidrogel de poli(maltodextrina-co-quitosano)**

### **2.7.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)**

La espectroscopia de FT-IR es una técnica de caracterización rápida basada en el método de absorción/transmisión en la cual nos da la información sobre los grupos funcionales y estructurales característicos de los componentes en el hidrogel. Este método de caracterización pudo confirmar la modificación del CS con el MA y de la MD con GMA a través de sus bandas de vibración. Del mismo modo, confirmar el entrecruzamiento del hidrogel y la interacción entre los polisacáridos MD y CS. Los espectros se adquirieron en un espectrofotómetro FTIR Nicolet Magna 550, utilizando el método de reflectancia total atenuada (ATR), en la región de frecuencia de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.7.2 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Se empleó la técnica de TGA para determinar la estabilidad térmica del hidrogel y su fracción de componentes volátiles al monitorear la pérdida de masa calentando la muestra a una velocidad constante. Por medio del DSC se identifican varias propiedades físicas y transiciones térmicas de los hidrogeles, se utiliza para estimar transiciones de fusión y al

conocer su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) ayuda a identificar su grado de entrecruzamiento, esto debido que al formar hidrogeles se obtienen redes tridimensionales entrecruzadas que generan poco movimiento en las cadenas, de tal manera que se manifiesta un aumento de  $T_g$  en sistemas entrecruzados. El análisis termogravimétrico se realizó usando un termoanalizador TGA Q500 (TA Instruments) bajo una atmósfera controlada de nitrógeno desde temperatura ambiente hasta 800 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>.

### **2.7.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Una morfología porosa es característica de un hidrogel, por lo tanto, a través de SEM se estudió el hidrogel de poli(maltodextrina-co-quitosano), para determinar su microestructura, tamaño y forma de porosidad, de tal modo que sea adecuada para su aplicación. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) FEI modelo Quanta 200 3D con detector de electrones secundarios (ETD). El análisis se llevó a cabo bajo las condiciones de operación a 15 KV y distancia de trabajo (WD) de 10 mm. Las muestras de hidrogel fueron previamente congeladas con nitrógeno líquido para realizar su corte transversal y posteriormente fueron recubiertas con oro-paladio por 60 seg.

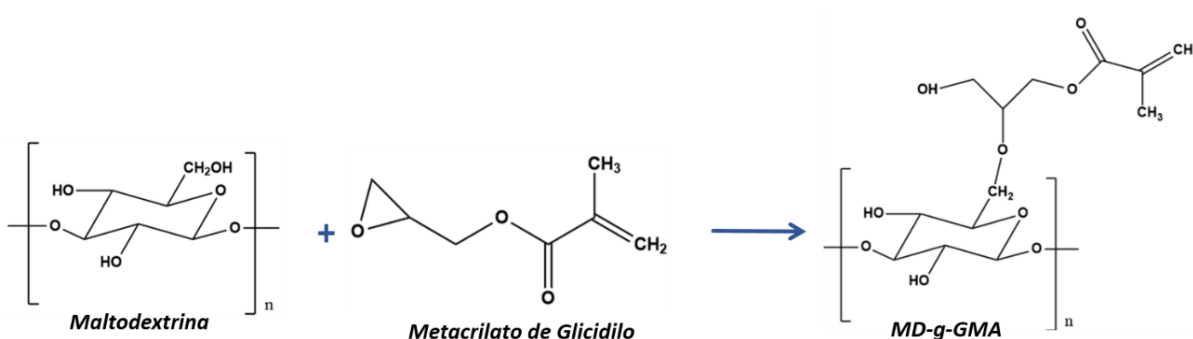
### **2.7.4 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H)**

Las estructuras químicas de la MD modificada con GMA y del CS modificado con AM fueron confirmadas a través de RMN <sup>1</sup>H (400MHz), dicha caracterización se realizó en un equipo Bruker empleando agua deuterada (D<sub>2</sub>O) como disolvente. Se disolvieron de 10 a 15 mg de material en un tubo de resonancia, obteniendo 16 “scans” de adquisición.

## CAPITULO III. RESULTADOS

### 3.1 Síntesis de modificación de MD con GMA

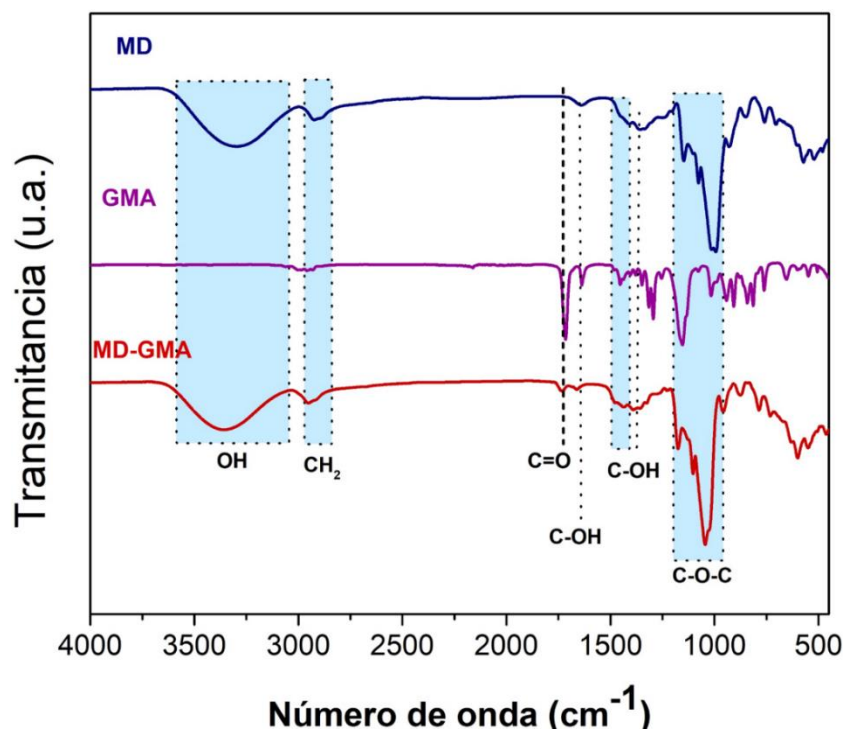
La MD se modificó usando GMA mediante una reacción entre el epóxido del GMA y el grupo hidroxilo de la MD (Figura 16). El epóxido se abre y se unen con la finalidad de dotar a la MD de restos metacrílicos en la superficie del material, que pueden reaccionar mediante polimerización de radicales libres y permitir la unión del CS para la formación de hidrogeles. La modificación de la MD se confirmó mediante las técnicas de FTIR y RMN.



**Figura 16.** Mecanismo de modificación de MD con GMA.

#### 3.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

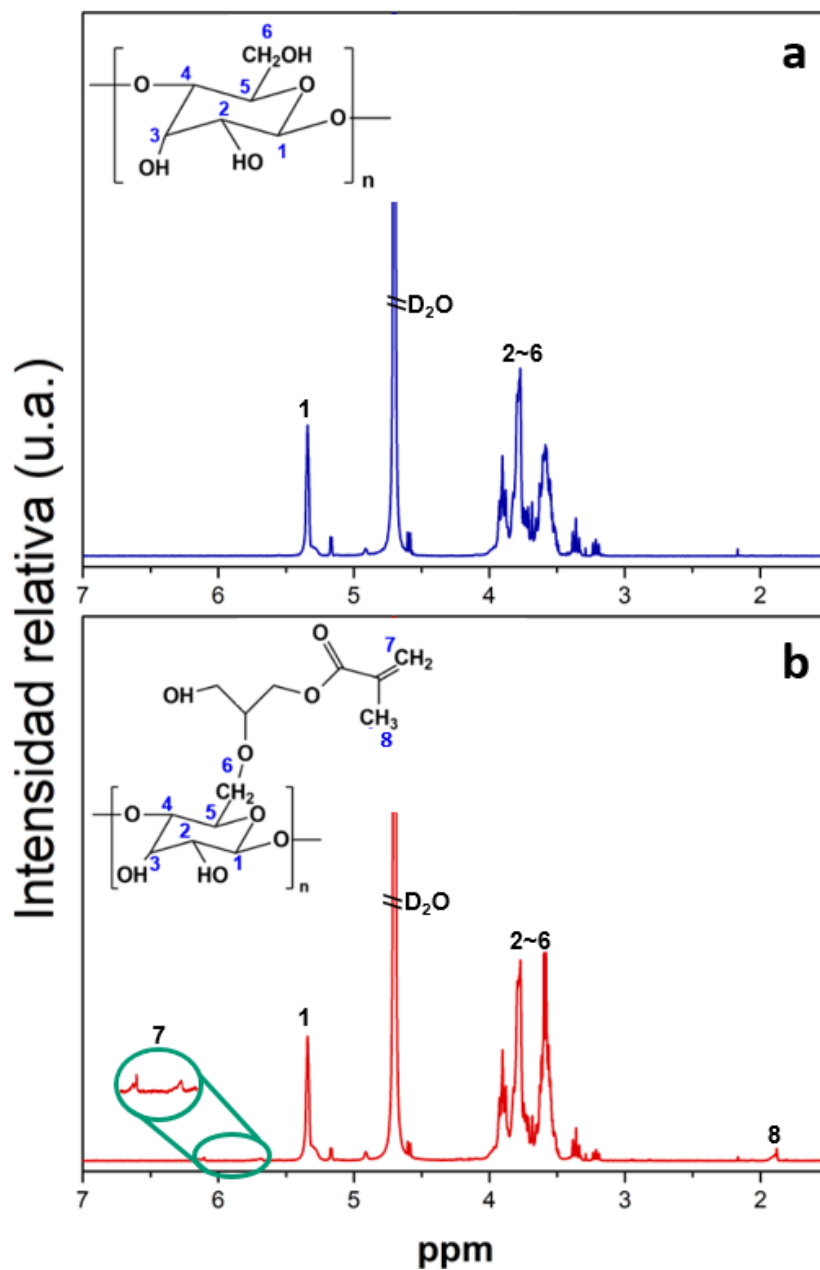
Mediante los resultados de FT-IR se pudo confirmar las modificaciones de MD con GMA. En la Figura 17 se observó que los espectros de FTIR de MD prístino y MD-g-GMA presentaron, una banda amplia de  $3302\text{ cm}^{-1}$  la cual es perteneciente a vibraciones de estiramiento de los enlaces de los grupos hidroxilo (O-H) y una banda de tensión de  $2925\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a enlaces C-H. También se mostró la presencia de bandas en  $1643$  y  $1352\text{ cm}^{-1}$  las cuales indicaron la presencia de enlaces C-OH. Además dos vibraciones de  $1452$  y  $1414\text{ cm}^{-1}$  las cuales se atribuyen a vibraciones de tijera del  $\text{CH}_2$  y las señales intensas de  $1149$ ,  $1078$  y  $1014\text{ cm}^{-1}$  se relacionan a los enlaces glucosídicos C-O-C de la MD. La funcionalización de la MD con GMA se demostró mediante la banda adicional observada en  $1707\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo carboxilo (C=O) del GMA en el espectro de MD-g-GMA [44, 74, 78–80].



**Figura 17.** FT-IR de MD y MD modificada con GMA.

### 3.1.2 Resonancia magnética nuclear de protones (RMN)

Adicionalmente, la muestra de MD modificada con GMA fue caracterizada por resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN) para corroborar la incorporación del GMA en su estructura. En el espectro de la MD (Figura 18a), las señales de 3 a 4 ppm fueron asignadas a los protones presentes en las unidades de glucosa de la MD en  $\alpha$  ( $1 \rightarrow 4$ ) y  $\alpha$  ( $1 \rightarrow 6$ ) (protones 2-6) mientras que la señal en 5.4 ppm fue atribuida al protón sobre el carbono anomérico [81, 82]. Por otro lado, en el espectro de la MD modificada con GMA (Figura 18b), la señal en 1.90 ppm corresponde al metilo del GMA (protón 8) mientras que las señales en 6.1 y 5.7 ppm fueron asignadas a los protones del doble enlace presente en la estructura del GMA (protones 7) [83, 84].

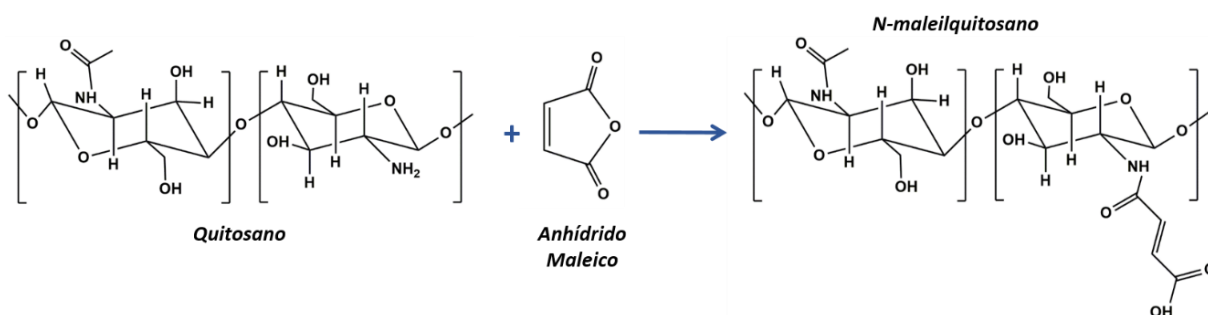


**Figura 18.** Espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (400MHz), de: a) MD y b) MD modificada con GMA en  $\text{D}_2\text{O}$ .



## 3.2 Síntesis de modificación de CS con AM

La modificación del CS con AM (Figura 19) ocurre a partir de la reacción del grupo amino del CS con el grupo carbonilo del AM, este último se rompe y ocurre una reacción de amidación. Por lo tanto, el AM provee al CS de grupos carboxilo y le proporciona grupos susceptibles (CH=CH) para reaccionar mediante polimerización de radicales libres con MD-g-GMA y NMBA y de esta manera obtener el hidrogel de poli(MD-co-CS). La modificación del CS con AM se confirmó a partir del análisis de los espectros de FTIR y  $^1\text{H}$  RMN.

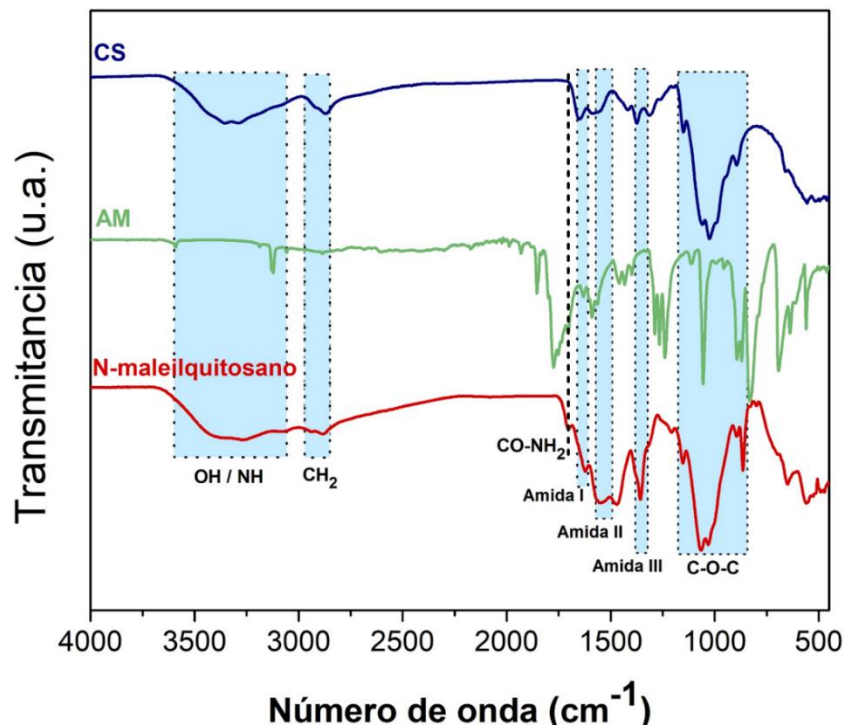


**Figura 19.** Mecanismo de modificación de CS con AM.

### 3.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis de FTIR se utilizó para corroborar la modificación del CS con AM. En la Figura 20 se observa que el CS prístino mostró una banda muy amplia de 3602 a 3070  $\text{cm}^{-1}$  las cuales indican la presencia de grupos O-H y N-H, mientras que la vibración de estiramiento que se observa en 2886  $\text{cm}^{-1}$  es correspondiente a un enlace alifático C-H. Del mismo modo, se observaron señales de vibración de estiramiento las cuales indican la presencia de grupos carbonilos de amida (amida I) en 1651  $\text{cm}^{-1}$ , flexión N-H a 1538  $\text{cm}^{-1}$  (amida II) y estiramiento N-H/C-N en 1355  $\text{cm}^{-1}$  (amida III). También se muestran picos intensos de 1158 a 868  $\text{cm}^{-1}$  que indicaron la presencia de enlaces C-O-C y C-O de las unidades de D-glucosa. El espectro de CS-MA presenta las señales típicas del CS prístino, sin embargo, se observó una disminución de intensidad en la señal de amida II, un desplazamiento de la banda de amida

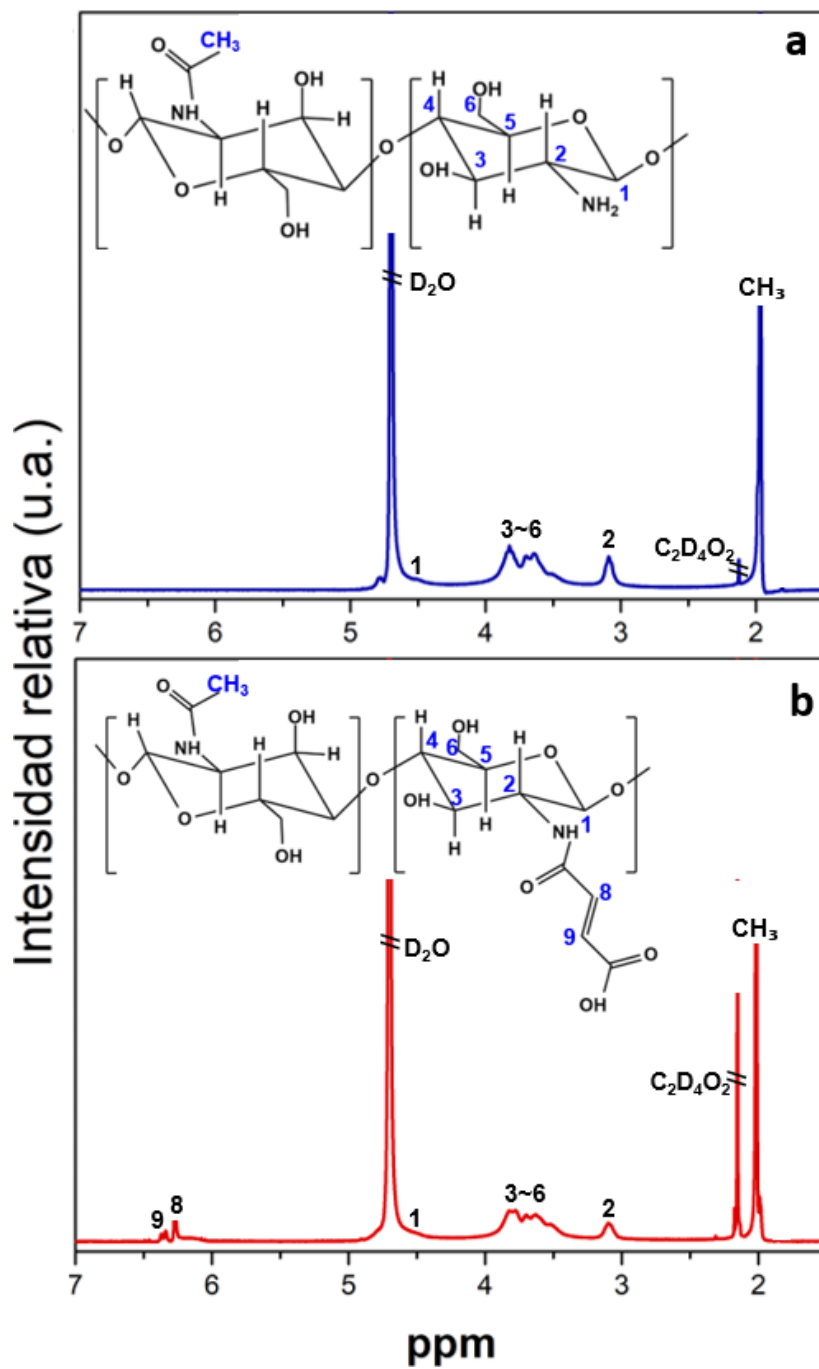
l a  $1623\text{ cm}^{-1}$  así como la presencia de una nueva banda en  $1771\text{ cm}^{-1}$  debido a la formación de nuevos grupos amida ( $\text{CO-NH}_2$ ) por la reacción del MA con los grupos amina del CS. La presencia de estas señales confirmaron la modificación del CS con MA [74, 85–88].



**Figura 20.** FT-IR de CS y CS modificado con AM.

### 3.2.2 Resonancia magnética nuclear de protones (RMN)

Asimismo, se realizó la caracterización química del CS y CS modificado con AM mediante  $^1\text{H}$  RMN. En la Figura 21a se puede observar el espectro de CS en el cual se muestra la presencia de un singulete a 3.10 ppm (protón 2) y multipletes de 3.3 a 3.8 ppm (protones 3-6) correspondientes a los protones del anillo glucosídico. Por otro lado, en el espectro de CS modificado se observan adicionalmente, la presencia de señales en 6.23 y 6.35 ppm (protones 8 y 9) las cuales se deben a los protones del tipo insaturado ( $\text{CH}=\text{CH}$ ) provenientes de la estructura química del AM lo cual corrobora su funcionalización con este compuesto (Figura 21b) [89, 90].

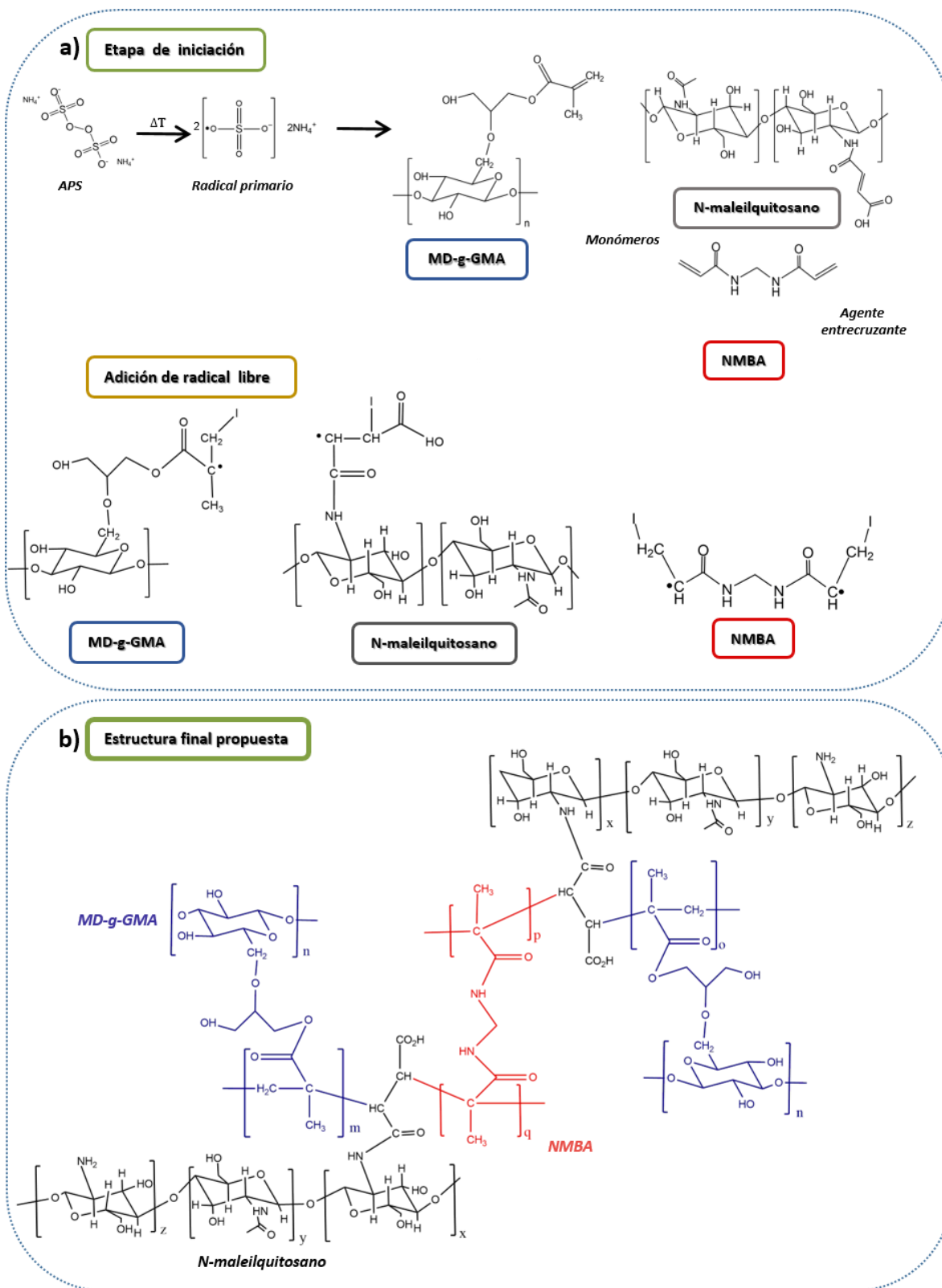


**Figura 21.** Espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (400MHz), de: A) CS y B) CS modificado con AM, en  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.3 Síntesis de hidrogel de poli(maltodextrina-co-quitosano)

Se utilizó la polimerización por radicales libres para la síntesis del hidrogel de poli(maltodextrina-co-quitosano). El mecanismo propuesto para la formación del hidrogel poli(MD-co-CS) mediante polimerización por radicales libres se muestra en la Figura 22. El proceso comienza mediante descomposición térmica del iniciador (APS), ocasionando el rompimiento homolítico de sus moléculas, produciendo radicales libres que reaccionan a su vez con las moléculas monoméricas de MD-g-GMA, N-maleilquitosano y NMBA (agente entrecruzante) reaccionando en el grupo C=C produciendo sitios activos (etapa de iniciación) (Figura 22a). Esto da como resultado la generación de cadenas en crecimiento, (etapa de propagación), la cual continua hasta la terminación que puede ser provocada por la combinación de cadenas en crecimiento. La estructura final propuesta (Figura 22b) muestra que el NMBA presentó dos sitios activos y estos ayudan a que se unan las cadenas de MD-g-GMA y N-maleilquitosano dando lugar a la formación de la red entrecruzada.

La presencia de cada uno de los polímeros que conforman el hidrogel se confirmó mediante FTIR, TGA y DSC. Por otro lado, la elección del hidrogel para llevar a cabo pruebas de carga y liberación de fármaco, actividad antimicrobiana, así como pruebas de citotoxicidad se determinó mediante las condiciones más apropiadas en su síntesis (relación másica MD:CS, concentración de NMBA, tiempo de reacción) así como a partir de los resultados de pruebas de hinchamiento y morfología determinada mediante SEM.



**Figura 22.** Posible mecanismo de formación de los hidrogeles de poli(MD-co-CS), a) etapa de iniciación, b) estructura final propuesta del hidrogel de poli(MD:CS),  $n=16.5-19.5$  equivalente de dextrosa.

La síntesis de los hidrogeles se basó principalmente en sus propiedades y estabilidad física al terminar la reacción, lo cual dependió significativamente de su proporción en peso, porcentaje de entrecruzante y tiempo de reacción.

Como se puede observar en la Tabla 1, se sintetizaron hidrogeles de poli(MD-co-CS), variando la proporción en peso MD:CS (3:1, 1:1 y 1:3), cantidad de agente entrecruzante (2.5, 5, 10 y 20%) y tiempo de reacción (0.5 y 4 h), manteniendo constantes las otras variables de reacción (temperatura 60 °C y 5% de APS).

El efecto de la relación en peso para el material con relación MD:CS 3:1 mostró una formación de hidrogeles inestables cuando se empleó 10 y 20% de NMBA a 0.5 h de reacción. Por otro lado, cuando el contenido de NMBA fue de 2.5 y 5% se obtuvieron pequeños pedazos de hidrogel quebradizos. Sin embargo, a tiempos mayores de 1 h de reacción, se observó que el hidrogel comenzaba a “desgelarse” volviendo a su forma líquida al cumplir 4 h de reacción. Estos resultados pudieran deberse a que esta relación de MD:CS, con mayores contenidos de MD ocasionan fragilidad en el hidrogel.

Por otra parte, durante la síntesis de los hidrogeles con una proporción en peso 1:3 de MD:CS y 0.5 h de reacción, se observó que el hidrogel presentó una mejor gelación que aquellas con una relación 3:1. Además, la firmeza y consistencia del hidrogel aumentó al incrementar el contenido de NMBA. Esto pudiera ser debido a que a una mayor cantidad de NMBA el hidrogel presenta un mayor entrecruzamiento. De nueva cuenta, se observó que a esta relación de MD:CS y 4 h de reacción, los hidrogeles perdían estabilidad volviéndose quebradizos.

Por su parte, los hidrogeles sintetizados con una relación MD:CS 1:1 a 0.5 h de reacción, con 2.5 y 5% de NMBA, presentaron una mejor estabilidad, en la síntesis, debido a que presentaron mayor firmeza y no se rompieron en pequeños pedazos. Por otro lado, para los hidrogeles sintetizados con 10 y 20% de NMBA se observaron hidrogeles más firmes que aquellos con relación 3:1 y 1:3, pero quebradizos al momento de su lavado.

**Tabla 1.** Formulaciones y parámetros de reacción empleados durante la síntesis de hidrogeles de poli(MD-co-CS) con tiempos de reacción de 0.5 y 4 h.

Relación MD:CS	NMBA (%)	APS(%)	T (°C)	Tiempo (h)
3:1	2.5	5	60	0.5 y 4
3:1	5	5	60	0.5, 4
3:1	10	5	60	0.5, 4
3:1	20	5	60	0.5, 4
1:3	2.5	5	60	0.5, 4
1:3	5	5	60	0.5, 4
1:3	10	5	60	0.5, 4
1:3	20	5	60	0.5, 4
1:1	2.5	5	60	0.5, 4
1:1	5	5	60	0.5, 4
1:1	10	5	60	0.5, 4
1:1	20	5	60	0.5, 4

De acuerdo a las observaciones en las síntesis de los hidrogeles a 0.5 y 4 h (Tabla 1), se optó por sintetizar los hidrogeles de poli(MD-co-CS) a un tiempo de 1 h para poder obtener hidrogeles con mayor estabilidad. Esto se debió a que, bajo observación experimental, a este tiempo no se observaba material líquido sin reaccionar (como se observaba a un tiempo de 0.5 h) así como a que este tiempo no se observaba un proceso de “desgelación” (como se observaba a 4 h).

La Tabla 2 muestra los experimentos llevados a cabo a 1 h de reacción variando su proporción en peso MD:CS (3:1, 1:1 y 1:3), cantidad de agente entrecruzante (2.5, 5, 10 y 20 %) y manteniendo constantes las otras variables de reacción (temperatura 60 °C y 5% de APS). Los hidrogeles de poli(MD-co-CS) sintetizados bajo estas condiciones, fueron caracterizados mediante FTIR, TGA, DSC y evaluados mediante pruebas de hinchamiento y

SEM para la elección de los hidrogeles más adecuados para llevar a cabo los estudios de carga y liberación de fármaco, pruebas antimicrobianas y evaluación de citotoxicidad.

**Tabla 2.** Formulaciones y parámetros de reacción empleados durante la síntesis de hidrogeles de poli(MD-co-CS) con tiempo de reacción de 1 h.

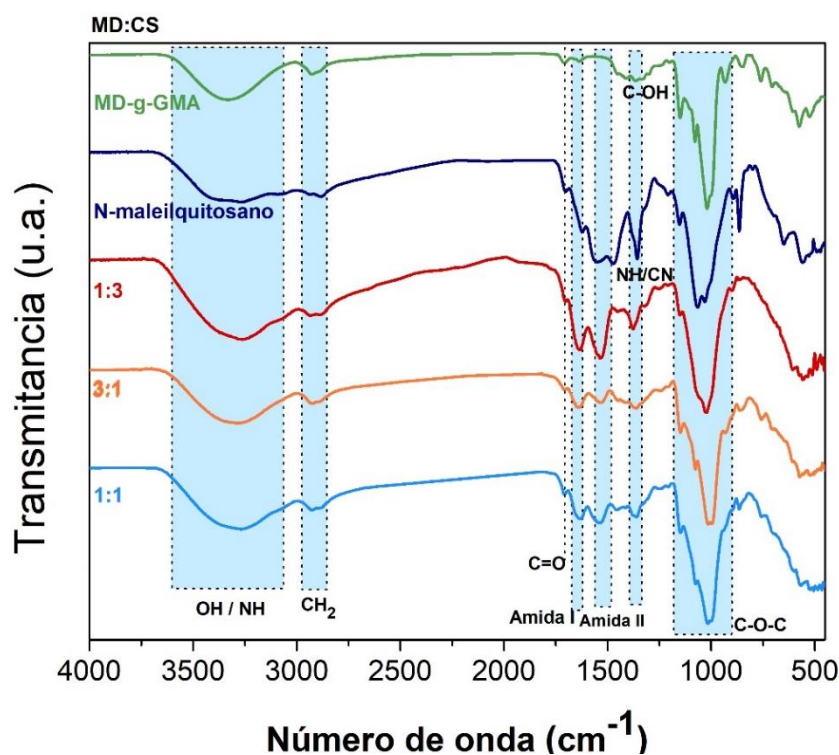
Relación MD:CS	NMBA (%)	APS(%)	T (°C)	Tiempo (h)
3:1	2.5	5	60	1
3:1	5	5	60	1
3:1	10	5	60	1
3:1	20	5	60	1
1:3	2.5	5	60	1
1:3	5	5	60	1
1:3	10	5	60	1
1:3	20	5	60	1
1:1	2.5	5	60	1
1:1	5	5	60	1
1:1	10	5	60	1
1:1	20	5	60	1

### 3.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Se utilizó la técnica de FT-IR para caracterizar los hidrogeles de MD-co-CS (Figura 23) preparados a diferente relación MD:CS. Todos los espectros presentaron señales características de MD-g-GMA y N-maleilquitosano, lo cual confirmó la formación del copolímero. El hidrogel con relación 1:1 de MD:CS mostró vibraciones de los grupos hidroxilos presentes en MD-g-GMA, y los grupos O-H/N-H del N-maleilquitosano en el rango de 3070 a 3609  $\text{cm}^{-1}$ . De manera similar, las bandas en 1144, 1069 y 1017  $\text{cm}^{-1}$  se relacionan con los enlaces glucosídicos C-O-C de la MD y CS. También se mostraron bandas de tensión de 2933 y 2881  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a enlaces C-H de CS y MD respectivamente y una

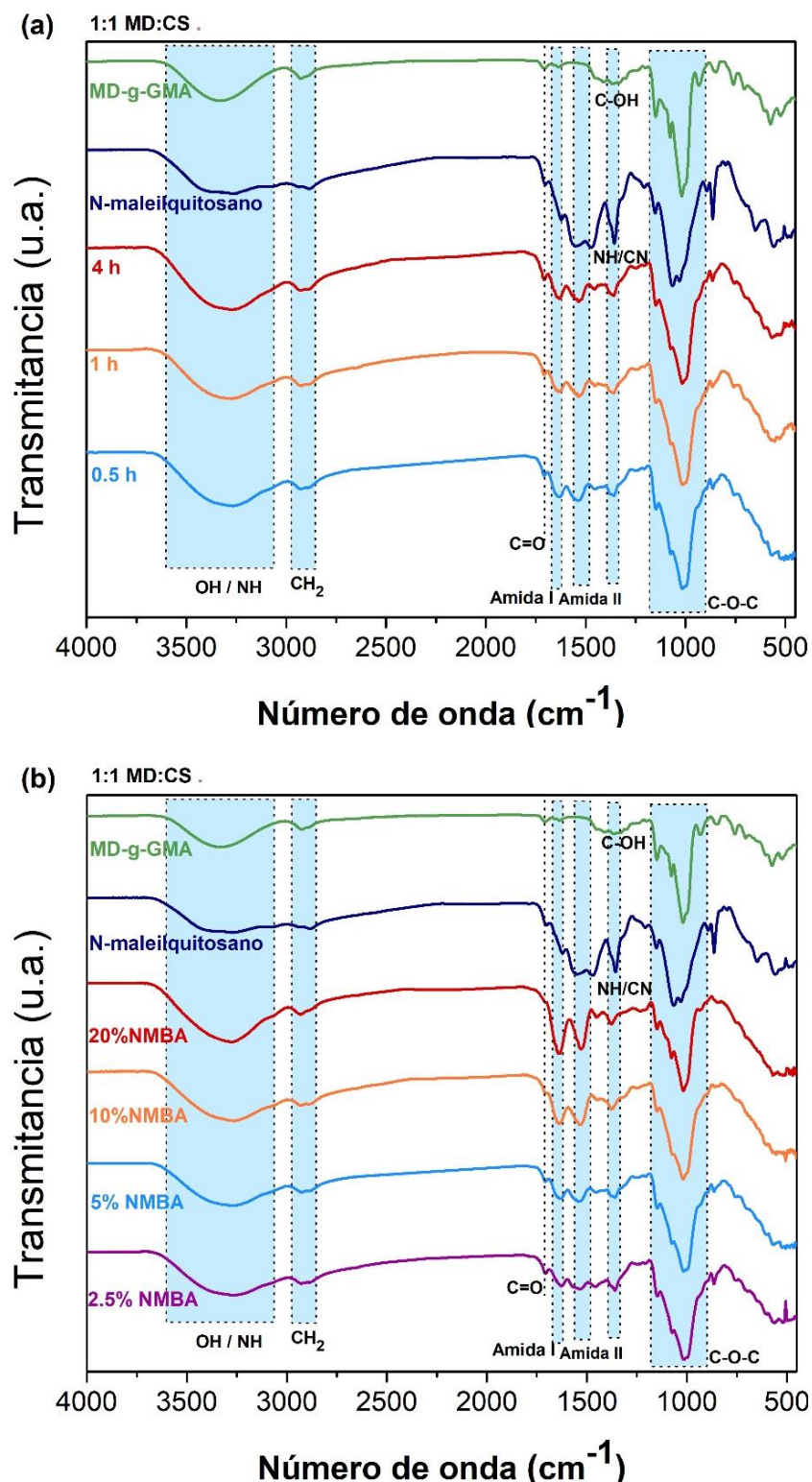


flexión en  $1711\text{ cm}^{-1}$  debida a los grupos  $\text{C}=\text{O}$  procedente de la MD. Sin embargo, en el espectro del copolímero sintetizado con una relación MD:CS 1:3 destacó la presencia de señales más intensas de los enlaces del tipo amida I ( $1636\text{ cm}^{-1}$ ), amida II ( $1534\text{ cm}^{-1}$ ) y NH/CN ( $1373\text{ cm}^{-1}$ ) del N-maleilquitosano. Mientras que para aquellos sintetizados con una relación 3:1 y 1:1 de MD:CS presentaron una disminución de intensidad de las señales provenientes del CS y permitió destacar la presencia de señales alrededor  $1350\text{ cm}^{-1}$  características de la vibración de estiramiento de los enlaces C-OH de la MD-g-GMA.



**Figura 23.** FT-IR de hidrogeles de poli(MD-co-CS) sintetizados con distintas relaciones monoméricas usando 5% de NMBA y 5% APS.

Además, los espectros de FT-IR de los hidrogeles preparados a diferentes tiempos de reacción demostraron la formación del copolímero desde los 30 minutos (Figura 24a), mientras que los hidrogeles sintetizados con diferente % de NMBA, exhibieron una intensificación en las señales de  $1636$  y  $1523\text{ cm}^{-1}$  conforme se incrementó el contenido de entrecruzante, lo que se atribuyó a la presencia de los grupos amida provenientes del NMBA (Figura 24b).

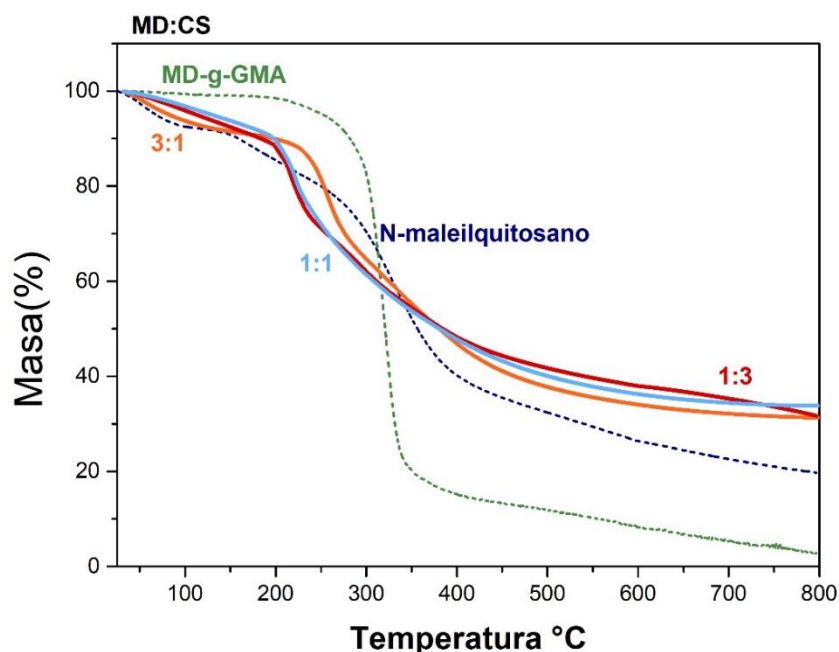


**Figura 24.** FT-IR de hidrogeles de poli(MD-co-CS) sintetizados a diferente a) tiempo de reacción y b) % NMBA. Relación másica MD:CS 1:1 y 5% de APS.

### 3.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se realizó la caracterización mediante TGA para conocer la estabilidad térmica de los hidrogeles sintetizados a diferente relación MD:CS (Figura 25). Primeramente, la curva de TGA de MD-g-GMA mostró una pérdida de masa abrupta del 82% en un rango de 230 a 330 °C debido a la descomposición de las unidades D-glucosa. [45] La degradación térmica del CS prístino presenta dos pasos de descomposición. La degradación inicial ocurre en un rango de 30 a 100 °C correspondiente a la pérdida de agua físicamente absorbida en la muestra, mientras que la segunda etapa comienza a 250 °C la cual está relacionada con la descomposición de la estructura del biopolímero el cual se degrada por completo a 450 °C [91, 92]. Por su parte, la curva de TGA de N-maleilquitosano mostró tres etapas de pérdida en masa: inicialmente ocurrió la pérdida de moléculas de agua en un rango de 25 a 123°C (7.8%). La segunda pérdida (146 a 242 °C) corresponde a la descomposición de los grupos de ácido carboxílico del MA incorporado al CS (9.7%), mientras que la tercera pérdida ocurre en un rango de entre 300 y 450 °C debido a la descomposición de la cadena principal de la estructura del CS (grupos glucosídicos) [93, 94].

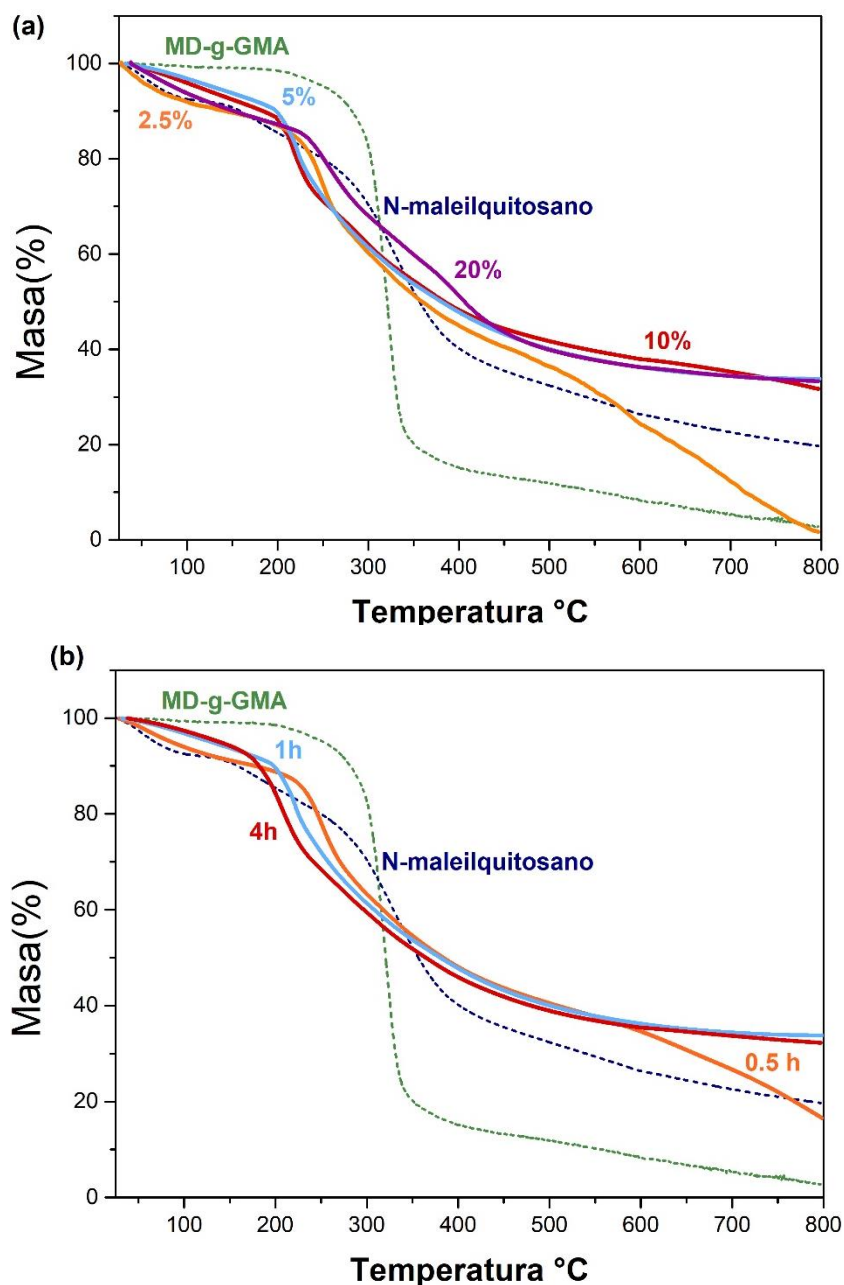
Por otro lado, el termograma del hidrogel sintetizado con una relación de MD:CS 3:1 presentó dos pérdidas de masa a diferentes temperaturas. La primera pérdida ocurrió en el rango de 25 a 170 °C (8%) correspondiente a la remoción de moléculas de agua presentes en el hidrogel, seguida de una pérdida de masa del 28% en el rango de temperatura 190 a 340 °C debida a la descomposición de los grupos glucosídicos de la MD y CS. Los termogramas de relación MD:CS de 1:3 y 1:1 presentaron pérdidas similares desde el inicio con pérdida de masa en el rango de 25 a 170 °C por la descomposición de moléculas de agua y una disminución significativa en el rango de 200 a 400 °C por descomposición de los grupos glucosídicos de la MD-g-GMA y N-maleilquitosano. Los resultados mencionados con anterioridad confirman que, aunque los hidrogeles presentan residuos similares, el copolímero con mayor contenido de MD (3:1 MD:CS) es más estable térmicamente en rangos de 190 a 300 °C.



**Figura 25.** Curvas de TGA de hidrogeles poli(MD-co-CS) sintetizados a diferente proporción en peso.

Del mismo modo, se realizó un análisis de TGA a los hidrogeles sintetizados a diferente concentración de agente entrecruzante (Figura 26a). Se observó que al aumentar el contenido de NMBA, la estabilidad térmica se incrementó ligeramente, exhibiendo pérdidas de masa del 49 y 33% en el intervalo de temperatura de 200-450 °C para los hidrogeles con 2.5 y 5% de NMBA, respectivamente. Con base a los resultados anteriores, fue posible observar que los hidrogeles con 10 y 20% de NMBA no mostraron cambios significativos en su estabilidad térmica, ambos presentaron una tendencia similar en la pérdida total de masa (36 a 40%) en un intervalo de temperatura de 200-450°C.

Por otro lado, en la Figura 26b se muestran las curvas de TGA de los hidrogeles sintetizados a diferentes tiempos de reacción. Se observó, que con el incremento del tiempo de reacción la estabilidad térmica disminuyó. La muestra sintetizada a 0.5 h presentó una pérdida de masa de 52%, mientras que la sintetizada a 4h presentó una pérdida de masa de 61% en una región de temperatura de 200 a 500 °C. Lo mencionado anteriormente, se atribuyó a que como se observó experimentalmente, al incrementar el tiempo de reacción posterior a 1 h el material exhibió una “desgelación” durante su síntesis, mostrando fragilidad visible en el material.

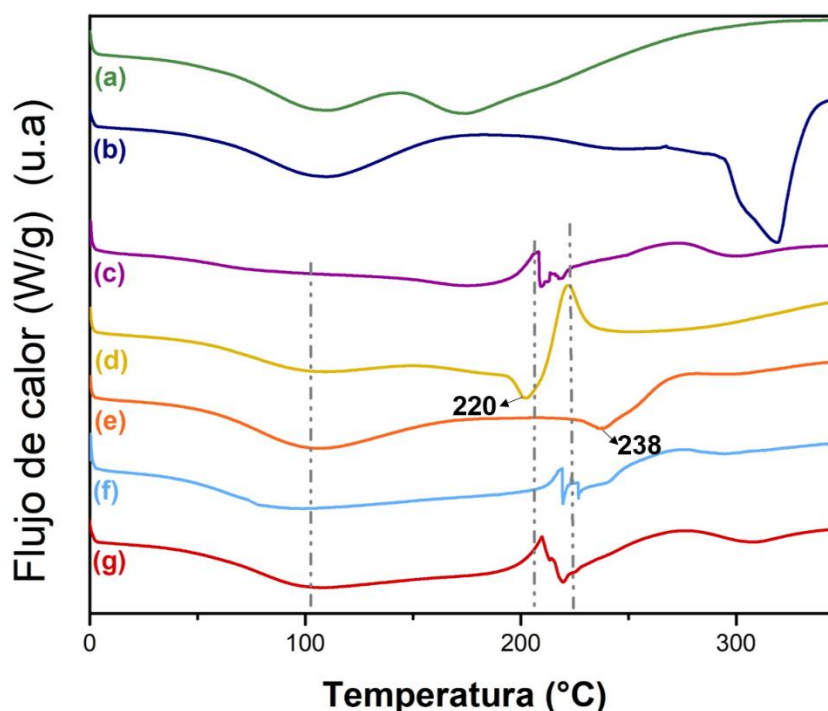


**Figura 26.** Curvas de TGA de hidrogeles poli(MD-co-CS) sintetizados a diferente a) % de NMBA, y b) tiempo de reacción. Relación MD:CS 1:1 y 5% APS.

Los termogramas de DSC de N-maleilquitosano y MD-g-GMA se observan en la Figura 27. El termograma del N-maleilquitosano mostró dos picos endotérmicos en 108 y 175 °C correspondientes a la evaporación del agua y una posible descomposición de fracción maleica respectivamente (de acuerdo al TGA del mismo, ver Figura 25) [92, 95]. Por otro lado, el termograma de MD-g-GMA mostró una señal endotérmica en 106 °C debida

probablemente a humedad contenida en la muestra, así como una señal en 303 °C debida a su punto de fusión, la cual está asociada a la degradación de grupos glucosídicos de la MD (ver Figura 25).

Para tener un análisis más detallado de los resultados obtenidos de DSC, se sintetizó una muestra de hidrogel sin la presencia de CS para obtener un copolímero el cual se le denominó como poli(MD-co-NMBA) (Figura 27d). Este copolímero exhibió un termograma similar con aquel obtenido para el hidrogel con relación MD:CS de 3:1 (Figura 27e). Posteriormente, se pudo observar que al adicionar CS al hidrogel se presenta un desplazamiento de la señal 220 a 238 °C, sugiriendo que el CS aporta estabilidad térmica. Asimismo, se observa que, al seguir incrementando el contenido de CS, los termogramas de los hidrogeles MD:CS 1:1 (Figura 27f) y 1:3 (Figura 27g) presentaron mayor similitud a una muestra conteniendo solamente CS y NMBA la cual fue denominada como poli(CS-co-NMBA) (Figura 27c). Estos resultados sugieren la presencia de ambos materiales (MD y CS) en el copolímero.



**Figura 27.** Termogramas de DSC de a) N-maleilquitosano, b) MD-g-GMA, c) Poli(CS-co-NMBA), d) Poli(MD-co-NMBA) y de hidrogeles poli(MD-co-CS) sintetizados a diferente relación de MD:CS e) 3:1, f) 1:1, g) 1:3.



### 3.4 Pruebas de hinchamiento

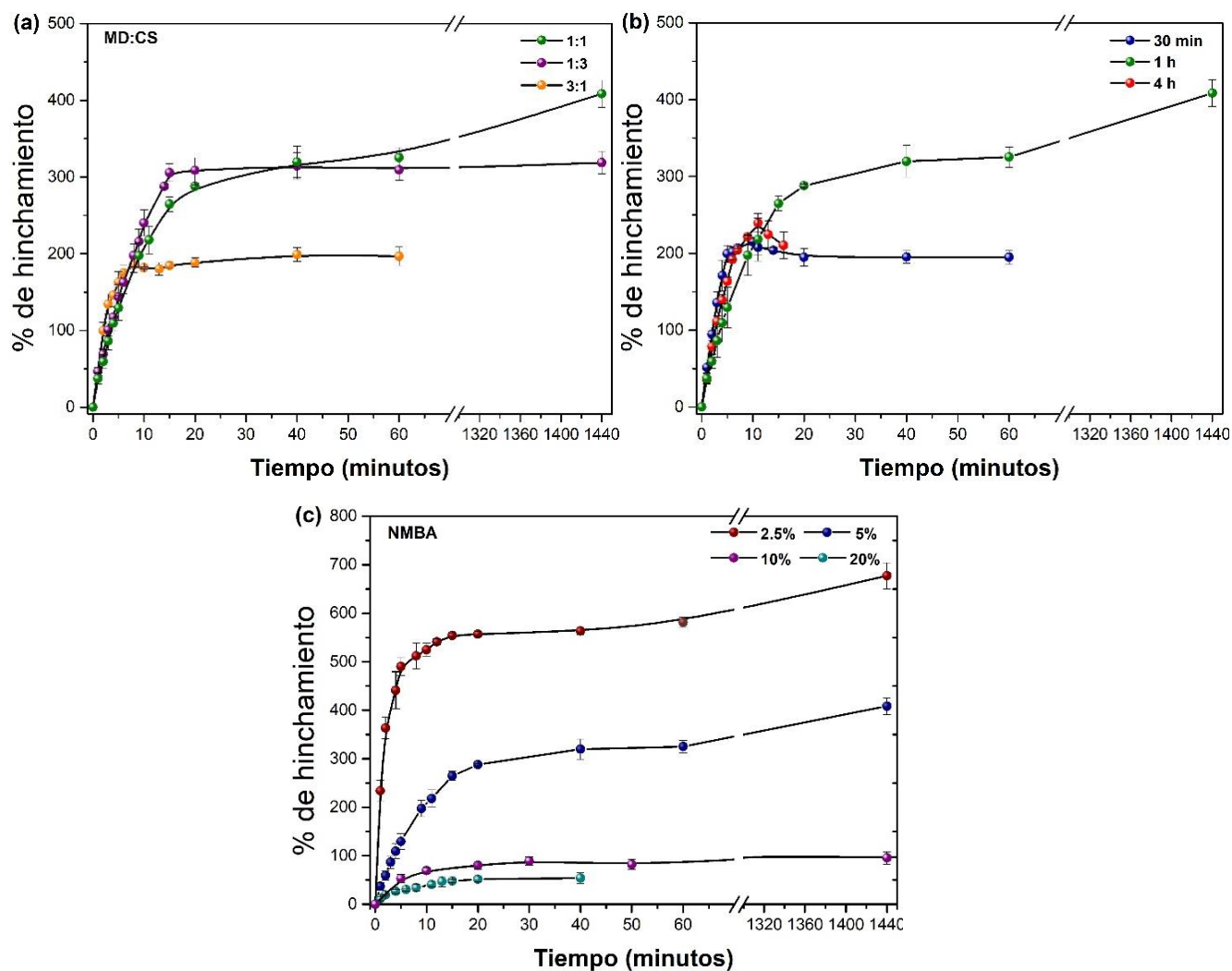
Se realizaron pruebas de hinchamiento para determinar la capacidad de absorción de agua de los hidrogeles sintetizados. En general, los hidrogeles mostraron diferentes porcentajes de hinchamiento la cual dependió de los parámetros de síntesis empleados (relación monomérica, tiempo de reacción y porcentaje de entrecruzante) (Figura 28).

De acuerdo al parámetro de relación másica MD:CS, los hidrogeles sintetizados con una relación 1:1 mostraron un mayor porcentaje de hinchamiento (400%), mientras que los hidrogeles con relación 1:3 y 3:1 mostraron porcentajes máximos de hinchamiento alrededor de 318 y 195% respectivamente. Sin embargo, el hidrogel con relación 3:1 (MD:CS) mostró fragilidad, lo cual lo hizo deficiente y presentó rupturas conforme avanzó el estudio.

Por otro lado, en relación a los hidrogeles obtenidos a diferente tiempo de reacción, se observó que la estabilidad de los hidrogeles obtenidos a 0.5 y 4 h no permitió realizar las pruebas de hinchamiento adecuadamente debido a su fragilidad, siendo el copolímero sintetizado a una hora de reacción el que presentaba mejores propiedades y un hinchamiento por encima del 400% (Figura 28b).

Por último, para los hidrogeles sintetizados a diferente concentración de entrecruzante, se pudo observar que entre mayor es el contenido de NMBA, menor será su hinchamiento (Figura 28c). Esto pudiera deberse a que al aumentar el porcentaje de entrecruzante el tamaño de poro disminuye, debido a un mayor grado de entrecruzamiento lo que causa un menor espacio para alojar moléculas de agua [96]. Además, se observó que el hidrogel sintetizado con 2.5% de NMBA presentó estabilidad e hinchamiento por encima de 600% mientras que con 5% se obtuvo un hinchamiento solamente de 400%. Por otra parte, los hidrogeles con 10 y 20% de NMBA, exhibieron un hinchamiento por debajo del 100%, este comportamiento sugiere un aumento en el grado de entrecruzamiento, el cual restringe la posibilidad de expansión de las redes en los hidrogeles y puede limitar su capacidad de absorción de agua [97]. En base a estos resultados, los hidrogeles sintetizados a una relación MD:CS 1:1, 1:3 y 3:1 con 5% de NMBA (y 2.5% NMBA para MD:CS 1:1) a 1 h de reacción,

fueron caracterizados mediante SEM para determinar los hidrogeles más adecuados para carga, liberación de fármaco, pruebas antimicrobianas y evaluación de citotoxicidad.

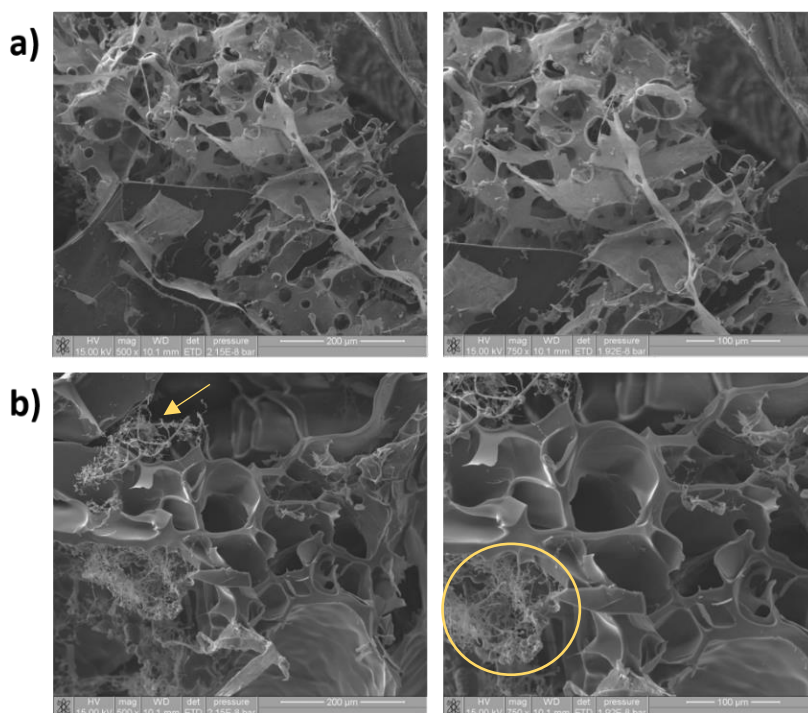


**Figura 28.** Pruebas de hinchamiento para los hidrogeles de poli(MD-co-CS) sintetizados a diferentes condiciones de reacción. a) relación de comónómeros (5% NMBA y APS, 1 h de reacción), b) tiempo de reacción (relación 1MD:1CS, 5% NMBA y APS) y, c) % de NMBA (relación 1MD:1CS, 5% APS, 1 h de reacción)



### 3.5 Morfología

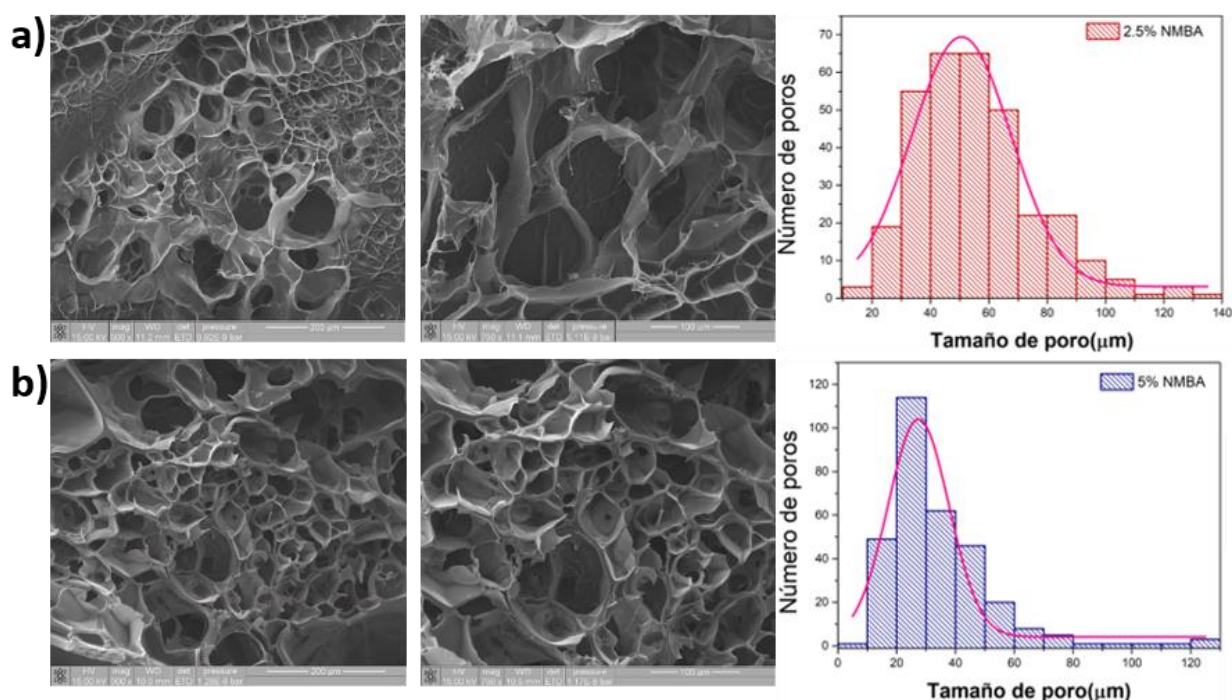
A partir de las micrografías presentadas en la Figura 29a obtenidas mediante análisis de SEM, se observó que el poli(MD-co-CS) con una proporción en peso 3:1 de MD:CS y 5% de NMBA no exhibió una morfología con estructura porosa propia de un hidrogel, por lo tanto, se puede concluir que la fragilidad y rupturas del material al realizar las pruebas de hinchamiento se deben al no presentar redes sólidas. De igual forma, en la micrografía correspondiente al hidrogel con proporción en peso MD: CS 1:3 (Figura 29b) y 5% de NMBA presenta muy poca porosidad visible y algunas partes revelaron residuos de material sin reaccionar (probablemente de MD-g-GMA o CS-AM).



**Figura 29.** Micrografías SEM (500 y 750 aumentos) de los hidrogel los hidrogel de poli(MD-co-CS) sintetizados a diferente proporción en peso MD:CS a) 3:1 y b) 1:3.

De acuerdo a los resultados anteriores, se procedió a observar la morfología de los hidrogel de poli(MD-co-CS) con relación 1:1 de MD:CS y contenidos de 2.5 y 5% de NMBA. Las micrografías exhibieron que los hidrogel presentaron una morfología porosa y que las dimensiones de sus poros variaron según el contenido de NMBA. De acuerdo con el

histograma en la Figura 30, el hidrogel con contenido de 2.5% de NMBA mostró una distribución de tamaños de poro entre 16 y 148  $\mu\text{m}$ . La línea continua corresponde al ajuste de la curva de distribución normal (Campana de Gauss) y propone un tamaño de partícula promedio de 50.61  $\mu\text{m}$  y una desviación estándar de 1.25  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, el hidrogel con 5% de NMBA mostró una distribución de tamaños de poro entre 5 a 128  $\mu\text{m}$  con un tamaño promedio de  $27.40 \pm 1.26 \mu\text{m}$ . Los resultados de SEM indicaron que la dimensión de los poros aumentó con menos contenido de entrecruzante, lo cual sugiere que posiblemente presenta un menor grado de reticulación [98].



**Figura 30.** Micrografías de SEM (500 y 750 aumentos) e histogramas de distribución del tamaño de poro de los hidrogeles los hidrogeles de poli(MD-co-CS) con a) 2.5 y b) 5% de NMBA.

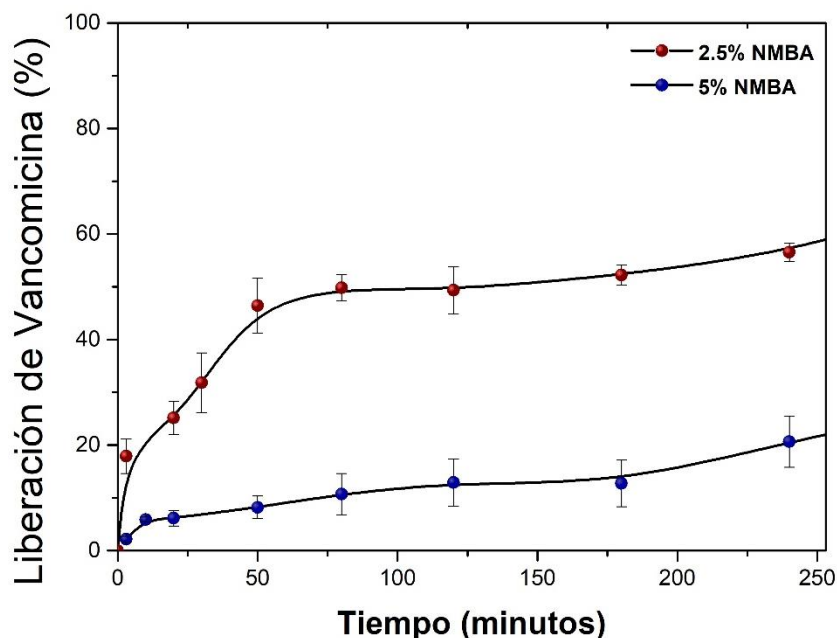
### 3.6 Estudios de carga y liberación de vancomicina

En base a los resultados obtenidos en las caracterizaciones discutidas anteriormente, se seleccionaron los hidrogeles sintetizados con una relación MD:CS 1:1 a un tiempo de reacción de 1 h y con 2.5 y 5% de NMBA para llevar a cabo los estudios de carga y liberación de vancomicina debido a que estos presentaron una adecuada manipulación y porcentajes

de hinchamiento. La carga de vancomicina se llevó a cabo tomando la ventaja del hinchamiento de los hidrogeles. Se consideró el porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con 2.5 y 5% de NMBA (600 y 400% de hinchamiento respectivamente) en relación a el peso del hidrogel (~50mg), para su inmersión en una solución de 2 mg/mL de vancomicina, dando como resultado la adsorción total en ambas muestras. Se utilizó una concentración de 2 mg/mL de vancomicina debido a que durante la carga del hidrogel se utilizaron 0.5 mL de esta solución obteniendo una carga total de 1 mg de vancomicina en la muestra del hidrogel. Esto dio como resultado una concentración de vancomicina final en la muestra de ~0.02mg de vancomicina/mg de hidrogel. Este contenido de vancomicina se puede considerablemente superior a la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra *E. coli* (0.064 mg/mL) y *S. Aureus* (0.002 mg/mL) si se considera un volumen de liberación de 10 mL (0.1 mg/mL) como se describe en la parte experimental [99, 100].

Los perfiles de liberación de los sistemas mencionados anteriormente se observan en la Figura 31. En esta figura se puede apreciar que la liberación se completó en las primeras 5 h para ambos hidrogeles. Sin embargo, el hidrogel sintetizado con 2.5% de NMBA liberó un 66% de vancomicina, mientras que el hidrogel con 5% de NMBA mostró una menor liberación (27%). Este comportamiento de liberación pudo deberse a que, como se mostró en las micrografías de SEM, (Figura 30) estos hidrogeles presentan un mayor tamaño de poro lo cual puede contribuir a una liberación de vancomicina más rápida (a mayor tamaño de poro, mayor liberación) [101].

Recientemente, se ha informado del desarrollo de sistemas de administración de vancomicina a partir de hidrogeles que contienen CS. Mitra-Naeimi y col. (2020) describen la preparación de un hidrogel poroso a partir de CS, alcohol polivinílico (PVA) y polietilenglicol (PEG) cargado con vancomicina para realizar pruebas como sistemas de administración de fármaco. Este material fue capaz de liberar hasta un 28 % de vancomicina en 24 h, cuyo valor se vio afectado debido a que el tamaño de poro se redujo al incorporar PEG en el hidrogel [77].



**Figura 31.** Pruebas de liberación de vancomicina para los hidrogel de poli(MD-co-CS)

### 3.7 Actividad antimicrobiana

En este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana de los hidrogel de poli(MD-co-CS) sintetizados con 2.5 y 5% de NMBA cargados y sin cargar con vancomicina contra diferentes cepas bacterianas (*E. coli*, ATCC-25922 y *S. aureus*, ATCC 29213). Los resultados de estas pruebas demostraron que ambos hidrogel inhibieron eficazmente el crecimiento de las bacterias (Figura 32).

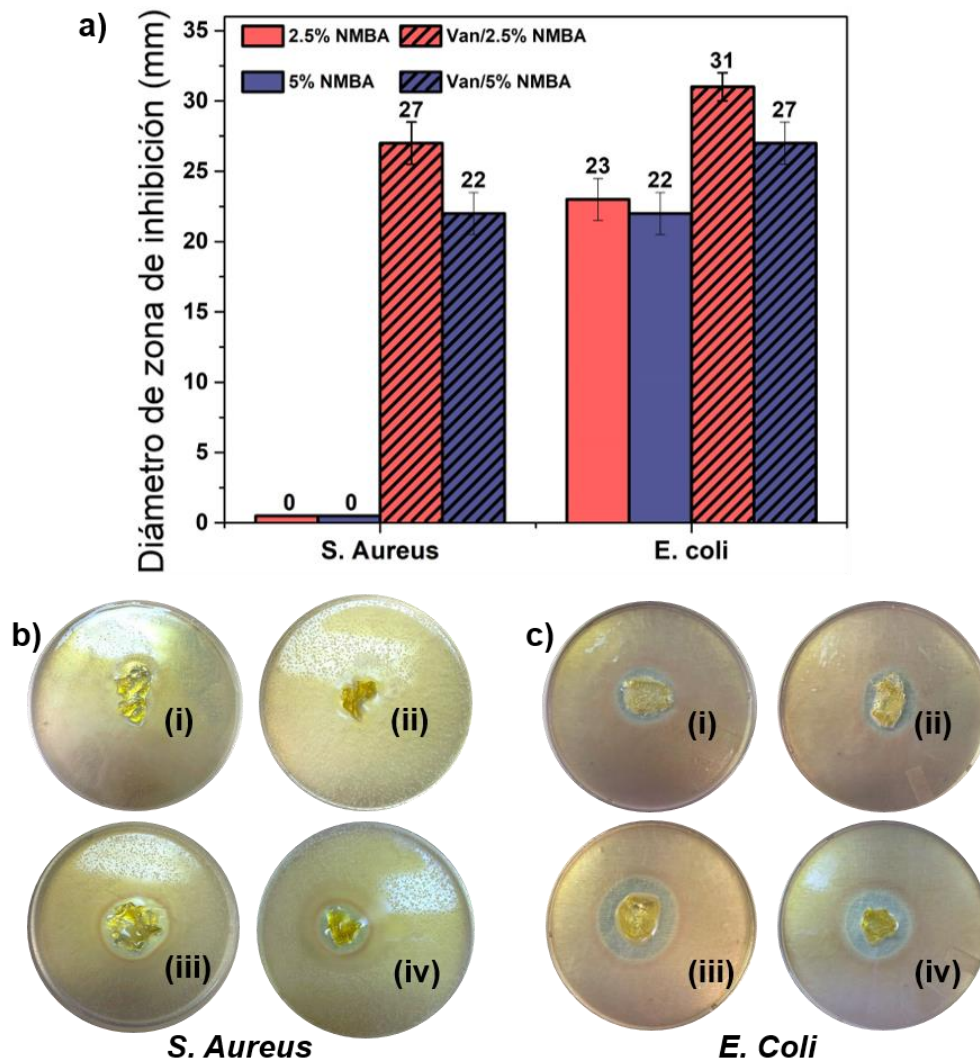
Primeramente, los hidrogel sin vancomicina no mostraron una zona de inhibición en *S. aureus*, lo que significa que no tuvo efecto antibacteriano, mientras que contra *E. coli*, los hidrogel con 2.5 y 5% de NMBA mostraron zonas de inhibición muy similares ( $23 \pm 1.5$  y  $22 \pm 1.5$  mm respectivamente). Esta bioactividad se sugiere sea debida a la presencia del CS, el cual es conocido por tener propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-negativas. La estructura poliácida del CS provee actividad antimicrobiana, debido a que el pH ambiental está por debajo del pKa del CS. En las bacterias Gram-negativas, el CS tiene interacción entre su estructura polianiónica y las estructuras aniónicas presentes en la superficie de los microorganismos liposacáridos (bacterias Gram-negativas)[102, 103].

Eaton y col. (2008), estudiaron el efecto antimicrobiano de CS contra las bacterias *S. aureus* y *E. coli* a través de imágenes de un Microscopio de Fuerza Atómica, observando un deterioro celular, rugosidad superficial y agrupamiento celular. Reportaron que el CS con bajo peso molecular (PM) tuvo un mayor efecto contra bacterias Gram-negativas, mientras que el CS con alto PM una acción más fuerte contra las bacterias Gram-positivas [104]. Además, Zheng y col. (2003), realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana del CS con diferente PM, demostrando que el efecto antimicrobiano sobre *E. coli* se fortaleció a bajos pesos moleculares. También, concluyeron que el CS con bajo PM actúa como barrera que interfiere con la absorción adecuada de nutrientes por parte de la célula microbiana [105]. De acuerdo a lo descrito, en este trabajo se utilizó un CS de bajo PM, lo que confirma la actividad antimicrobiana en *E. coli* para los hidrogeles de poli(MD-co-CS) sin fármaco. Además, existen estudios sobre la concentración mínima inhibitoria (MIC) del CS en bacterias como la *E. coli*, los cuales han reportado que se requiere de concentraciones alrededor de 0.02 a 1 mg/mL de CS para su inhibición total.[106] Lo anterior sugiere que la concentración de CS en el hidrogel sintetizado en este trabajo pudiera ser mayor a esta concentración.

Por otro lado, los hidrogeles cargados con vancomicina mostraron actividad ante las dos bacterias estudiadas. Las zonas de inhibición máximas fueron  $31 \pm 1$  mm y  $27 \pm 1.5$  mm contra *E. coli* y de  $27 \pm 1.5$  mm y  $22 \pm 1.5$  mm de inhibición contra *S. aureus* para los hidrogeles con 2.5 y 5% de NMBA respectivamente. Estos resultados indicaron que los hidrogeles cargados con vancomicina fueron eficaces contra estas bacterias. La vancomicina actúa uniéndose a los precursores de péptidos en la pared celular bacteriana, evitando el entrecruzamiento de las cadenas laterales de peptidoglicano (polímero constituido por azúcares y amino ácidos que envuelve las células bacterianas) y por lo tanto inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana [107, 108]. En la actualidad se han presentado otros estudios de hidrogeles con presencia de CS con actividad antimicrobiana por el método de difusión de disco. Mung-Sun y col. (2022) presentaron un hidrogel basado en CS, alginato de sodio (SA) y glicerofosfato de sodio(GP), el cual por si solo presentó una inhibición contra *E. coli* y *S. aureus* de alrededor de 12mm para ambos casos. Además reportaron que, al igual



que en nuestro trabajo, esto puede deberse a la actividad antimicrobiana que presenta el CS. Por otro lado, el hidrogel CS/SA/GP cargado de vancomicina mostró una zona de inhibición de hasta 22mm [109]. Lo anterior, confirma que en este trabajo se presentaron zonas de inhibición mayores contra *E. coli* con y sin vancomicina para ambos contenidos de NMBA (2.5 y 5%). Por otra parte, se puede concluir que la adición de la vancomicina benefició la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. También, la vancomicina favoreció el incremento de la actividad antimicrobiana contra *E. coli*.

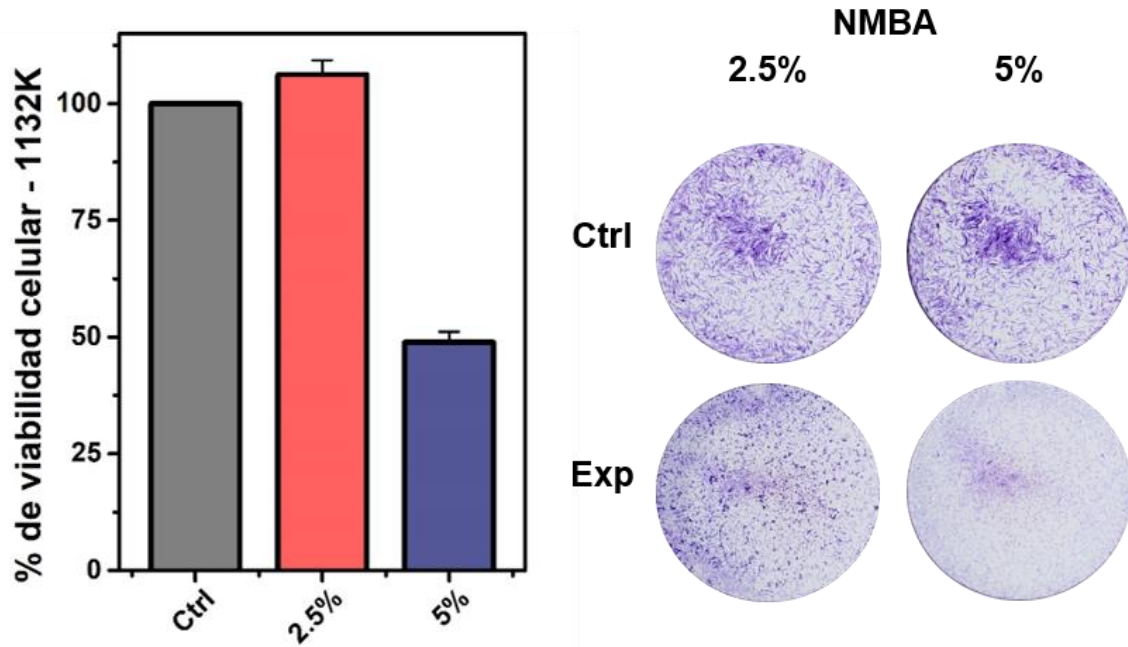


**Figura 32.** Evaluación de efecto antimicrobiano por el método de difusión de disco de los hidrogel polí(MD-co-CS). a) Resultados del diámetro de zona de inhibición para b) *S. aureus* y c) *E. coli* de los hidrogel con i) 2.5% NMBA, ii) 5% NMBA, iii) Van/2.5% NMBA y iv) Van/5% NMBA.

### 3.8 Evaluación de citotoxicidad

Se determinó la viabilidad celular de los hidrogeles de poli(MD-co-CS) con 2.5 y 5% de NMBA sin carga de fármaco, en la línea celular de fibroblastos 1132SK. Los resultados obtenidos del tratamiento con los extractos derivados del hidrogel con 2.5% de NMBA demuestran una viabilidad celular alrededor del 100% (Figura 33). Mohamed y col. realizaron ensayos donde demostraron que la MD presenta una alta proliferación celular en líneas celulares de fibroblastos humanos mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) y evaluados por MTT [110]. Del mismo modo, Howling y col. (2001), exhibieron que el CS de bajo peso molecular promueve la proliferación de fibroblastos humanos C520 en comparación con pesos moleculares altos [111]. Por lo anterior, se sugiere que la MD y CS presentes en los hidrogeles sintetizados con relación 1:1 (MD:CS) y menor contenido de NMBA (2.5%) promueven el incremento de la viabilidad celular. En contraste, el hidrogel con contenido de 5% de NMBA presentó una toxicidad mayor obteniendo así una viabilidad celular de 49% (Figura 33). En consecuencia, se sugiere que una mayor concentración de entrecruzante afecta considerablemente la viabilidad celular. Thankam y col. (2014) sintetizaron un hidrogel con un copolímero de poliéster y alginato, utilizando como agente entrecruzante NMBA (3% respecto al copolímero), al cual se le realizó un ensayo de citotoxicidad en fibroblastos L929. Ellos observaron que el hidrogel presentó una disminución de hasta un 40% en la viabilidad celular [112]. Lo anterior, puede sugerir que la presencia del agente entrecruzante NMBA puede tener un efecto en la supervivencia celular.

El Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación de productos químicos (GHS) establece los criterios armonizados para clasificar sustancias y mezclas con respecto a peligros físicos, para la salud y el medio ambiente. La clasificación según GHS sobre el efecto toxicológico del NMBA indica que el valor con efecto tóxico para exposición dérmica es de 1.141 mg/kg[113], sugiriendo que las cantidades empleadas durante la síntesis de estos hidrogeles (~50 y 25 mg para hidrogeles sintetizados con 5 y 2.5 % de NMBA respectivamente) son relativamente bajas para causar daño dérmico a un ser humano promedio.



**Figura 33.** Viabilidad de fibroblastos 1132K expuestos a hidrogeles de poli(MD-co-CS) sintetizados con 2.5 y 5% de NMBA.



## 4. Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados en la presente investigación y una vez analizando los resultados, fue posible llegar a las siguientes conclusiones:

- Se obtuvieron hidrogeles de MD-co-CS mediante polimerización por radicales libres utilizando NMBA como agente entrecruzante y APS como iniciador.
- La caracterización mediante FTIR, TGA, DSC y SEM confirmaron la formación de estos hidrogeles.
- El grado de hinchamiento de los hidrogeles dependió de los parámetros establecidos durante su síntesis. De acuerdo a esto, los hidrogeles sintetizados con 2.5 y 5% de NMBA, con una relación 1MD:1CS, 5% de APS y 1 h de reacción presentaron un adecuado hinchamiento sin perder su consistencia, con valores por encima de 600 y 400% de hinchamiento respectivamente. De acuerdo a estos resultados, los hidrogeles mencionados anteriormente fueron empleados para la carga y liberación de vancomicina.
- Las micrografías de SEM exhibieron que el tamaño de poro de los hidrogeles disminuyó conforme se aumentó el contenido de NMBA.
- Los perfiles de liberación de vancomicina dieron como resultado que, la liberación del fármaco fue mayor en el hidrogel con 2.5% de NMBA.
- El estudio de la actividad antimicrobiana por método de difusión de disco demostró que el hidrogel por si solo es eficaz contra la bacteria *E. coli*, y al cargarse con vancomicina es eficaz contra las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.
- La prueba de citotoxicidad reveló que el hidrogel de poli(MD-co-CS) con 2.5% de NMBA presentó una excelente viabilidad celular sin afectar a los fibroblastos de la piel.

## 5. REFERENCIAS

1. Simões D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonça AG, Correia IJ (2018) Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur J Pharm Biopharm* 127:130–141
2. Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M (2017) Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol* 102:380–383
3. Chen Y, Wu L, Li P, Hao X, Yang X, Xi G, Liu W, Feng Y, He H, Shi C (2020) Polysaccharide Based Hemostatic Strategy for Ultrarapid Hemostasis. *Macromol Biosci* 20:1–14
4. Hamedi H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE (2018) Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydr Polym* 199:445–460
5. Fijul Kabir SM, Sikdar PP, Haque · B, Rahman Bhuiyan · M A, Ali · A, Islam · M N (2018) Cellulose-based hydrogel materials: chemistry, properties and their prospective applications. *Prog Biomater* 7:153–174
6. Aderibigbe BA, Buyana B (2018) Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020042>
7. Paulino AT, Belfiore LA, Kipper MJ, Tambourgi EB (2012) Polysaccharide-based magnetic hydrogels as potential vectors for external-controlled solute release. *BIODEVICES 2012 - Proc Int Conf Biomed Electron Devices* 263–268
8. Guilherme MR, Fajardo AR, Moia TA, Kunita MH, Gonçalves M do C, Rubira AF, Tambourgi EB (2010) Porous nanocomposite hydrogel of vinylated montmorillonite-crosslinked maltodextrin-co-dimethylacrylamide as a highly stable polymer carrier for controlled release systems. *Eur Polym J* 46:1465–1474
9. Nickerson MT, Paulson AT, Wagar E, Farnworth R, Hodge SM, Rousseau D (2006) Some physical properties of crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels. *Food Hydrocoll* 20:1072–1079

10. Abbasi A, Eslamian M, Rousseau D (2008) Modeling of caffeine release from crosslinked water-swelling gelatin and gelatin-maltodextrin hydrogels. *Drug Deliv* 15:455–463
11. Naskar S, Sharma S, Kuotsu K (2019) Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *J Drug Deliv Sci Technol* 49:66–81
12. Quiñones JP, Peniche H, Peniche C (2018) Chitosan based self-assembled nanoparticles in drug delivery. *Polymers (Basel)* 10:1–32
13. Perinelli DR, Fagioli L, Campana R, Lam JKW, Baffone W, Palmieri GF, Casettari L, Bonacucina G (2018) Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *Eur J Pharm Sci* 117:8–20
14. Su J, Li J, Liang J, Zhang K, Li J (2021) Hydrogel preparation methods and biomaterials for wound dressing. *Life* 11:1–22
15. Shen S, Chen X, Shen Z, Chen H (2021) Marine polysaccharides for wound dressings application: An overview. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101666>
16. Lima T de P de L, Passos MF (2021) Skin wounds, the healing process, and hydrogel-based wound dressings: a short review. *J Biomater Sci Polym Ed* 32:1910–1925
17. Dai C, Shih S, Khachemoune A (2020) Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *J Dermatolog Treat* 31:639–648
18. Veiga AS, Schneider JP (2013) Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection. *Biopolymers* 100:637–644
19. Qi L, Zhang C, Wang B, Yin J, Yan S (2022) Progress in hydrogels for skin wound repair. *Macromol Biosci* 2100475:2100475
20. Da Silva LP, Reis RL, Correlo VM, Marques AP (2019) Hydrogel-Based Strategies to Advance Therapies for Chronic Skin Wounds. *Annu Rev Biomed Eng* 21:145–169
21. Brumberg V, Astrelina T, Malivanova T, Samoilov A (2021) Modern wound dressings:

- Hydrogel dressings. *Biomedicines*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091235>
22. Dumville JC, Deshpande S, O'Meara S, Speak K (2013) Hydrocolloid dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009099.pub3>
  23. Dong R, Guo B (2021) Smart wound dressings for wound healing. *Nano Today* 41:101290
  24. Qu J, Zhao X, Liang Y, Xu Y, Ma PX, Guo B (2019) Degradable conductive injectable hydrogels as novel antibacterial, anti-oxidant wound dressings for wound healing. *Chem Eng J* 362:548–560
  25. Annabi N, Rana D, Shirzaei Sani E, Portillo-Lara R, Gifford JL, Fares MM, Mithieux SM, Weiss AS (2017) Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing. *Biomaterials* 139:229–243
  26. Cheng H, Shi Z, Yue K, Huang X, Xu Y, Gao C, Yao Z, Zhang YS, Wang J (2021) Sprayable hydrogel dressing accelerates wound healing with combined reactive oxygen species-scavenging and antibacterial abilities. *Acta Biomater* 124:219–232
  27. Zhang M, Huang Y, Pan W, Tong X, Zeng Q, Su T, Qi X, Shen J (2021) Polydopamine-incorporated dextran hydrogel drug carrier with tailorable structure for wound healing. *Carbohydr Polym* 253:117213
  28. Seliktar D (2012) Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science (80- )* 336:1124–1128
  29. Caló E, Khutoryanskiy V V. (2015) Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J* 65:252–267
  30. Yilmaz B, Ozay O (2022) Synthesis, characterization and biomedical applications of p(Hema-co-aptmaci) hydrogels crosslinked with modified silica nanoparticles. *Biointerface Res Appl Chem* 12:3664–3680
  31. Joshi Navare K, Eggermont LJ, Rogers ZJ, Mohammed HS, Colombani T, Bencherif SA

- (2020) Antimicrobial Hydrogels: Key Considerations and Engineering Strategies for Biomedical Applications. In: Racing Surf. Springer International Publishing, Cham, pp 511–542
32. Pellá MCG, Lima-Tenório MK, Tenório-Neto ET, Guilherme MR, Muniz EC, Rubira AF (2018) Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydr Polym* 196:233–245
  33. Pushpamalar J, Meganathan P, Tan HL, Dahlan NA, Ooi LT, Neerooa BNHM, Essa RZ, Shameli K, Teow SY (2021) Development of a polysaccharide-based hydrogel drug delivery system (DDS): An update. *Gels*. <https://doi.org/10.3390/gels7040153>
  34. Kurdtabar M, Nezam H, Rezanejade Bardajee G, Dezfulian M, Salimi H (2018) Biocompatible Magnetic Hydrogel Nanocomposite Based on Carboxymethylcellulose: Synthesis, Cell Culture Property and Drug Delivery. *Polym Sci - Ser B* 60:231–242
  35. Hu T, Lo ACY (2021) Collagen–alginate composite hydrogel: Application in tissue engineering and biomedical sciences. *Polymers* (Basel). <https://doi.org/10.3390/polym13111852>
  36. Lee S, Choi JH, Park A, Rim M, Youn J, Lee W, Song JE, Khang G (2020) Advanced gellan gum-based glycol chitosan hydrogel for cartilage tissue engineering biomaterial. *Int J Biol Macromol* 158:452–460
  37. Isobe N, Komamiya T, Kimura S, Kim UJ, Wada M (2018) Cellulose hydrogel with tunable shape and mechanical properties: From rigid cylinder to soft scaffold. *Int J Biol Macromol* 117:625–631
  38. Chen F, Ni Y, Liu B, Zhou T, Yu C, Su Y, Zhu X, Yu X, Zhou Y (2017) Self-crosslinking and injectable hyaluronic acid/RGD-functionalized pectin hydrogel for cartilage tissue engineering. *Carbohydr Polym* 166:31–44
  39. Trombino S, Servidio C, Curcio F, Cassano R (2019) Strategies for hyaluronic acid-based hydrogel design in drug delivery. *Pharmaceutics* 11:1–17

40. Brasselet C, Pierre G, Dubessay P, et al (2019) Modification of chitosan for the generation of functional derivatives. *Appl Sci*. <https://doi.org/10.3390/app9071321>
41. Pais M, Rao P (2020) Maltodextrin for corrosion mitigation of zinc in sulfamic acid: Electrochemical, surface and spectroscopic studies. *Int J Biol Macromol* 145:575–585
42. Qiu C, Qin Y, Jiang S, Liu C, Xiong L, Sun Q (2017) Preparation of active polysaccharide-loaded maltodextrin nanoparticles and their stability as a function of ionic strength and pH. *Lwt* 76:164–171
43. Yu JY, Roh SH, Park HJ (2021) Characterization of ferulic acid encapsulation complexes with maltodextrin and hydroxypropyl methylcellulose. *Food Hydrocoll* 111:106390
44. Paulino AT, Fajardo AR, Junior AP, Muniz EC, Tambourgi EB (2011) Two-step synthesis and properties of a magnetic-field-sensitive modified maltodextrin-based hydrogel. *Polym Int* 60:1324–1333
45. Meléndez-Ortiz HI, Betancourt-Galindo R, Puente-Urbina B, Ledezma A, Rodríguez-Fernández O (2021) Synthesis and characterization of hydrogels based on maltodextrins with antimicrobial properties. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 0:1–10
46. Khan RS, Nickerson MT, Paulson AT, Rousseau D (2011) Release of fluorescent markers from phase-separated gelatin-maltodextrin hydrogels. *J Appl Polym Sci* 121:2662–2673
47. Zuo L, Wang X, Cao X, Chen B, Shao M, Yang G, Fu S, Wang L (2023) Preparation and characterization of tannin-maltodextrin-polyvinyl alcohol hydrogel based on hydrogen bonding for wound healing. *J Mech Behav Biomed Mater* 145:105942
48. Pita-López ML, Fletes-Vargas G, Espinosa-Andrews H, Rodríguez-Rodríguez R (2021) Physically cross-linked chitosan-based hydrogels for tissue engineering applications: A state-of-the-art review. *Eur Polym J*. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110176>

49. Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY (2015) Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md13085156>
50. Jayakumar R, Prabakaran Editors M *Advances in Polymer Science* 287 Chitosan for Biomaterials III Structure-Property Relationships.
51. Giri TK, Thakur A, Alexander A, Ajazuddin, Badwaik H, Tripathi DK (2012) Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: Present status and applications. *Acta Pharm Sin B* 2:439–449
52. Timotius D, Kusumastuti Y, Putri NRE, Rochmadi (2020) Proposed Reaction Mechanism of Chitosan-graft-Maleic from Chitosan and Maleic Anhydride. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 722:0–7
53. Zhang L, Ma Y, Pan X, Chen S, Zhuang H, Wang S (2018) A composite hydrogel of chitosan/heparin/poly ( $\gamma$ -glutamic acid) loaded with superoxide dismutase for wound healing. *Carbohydr Polym* 180:168–174
54. Zhang Y, Jiang M, Zhang Y, Cao Q, Wang X, Han Y, Sun G, Li Y, Zhou J (2019) Novel lignin–chitosan–PVA composite hydrogel for wound dressing. *Mater Sci Eng C* 104:110002
55. Xue H, Hu L, Xiong Y, et al (2019) Quaternized chitosan-Matrigel-polyacrylamide hydrogels as wound dressing for wound repair and regeneration. *Carbohydr Polym* 226:115302
56. Iqbal DN, Shafiq S, Khan SM, Ibrahim SM, Abubshait SA, Nazir A, Abbas M, Iqbal M (2020) Novel chitosan/guar gum/PVA hydrogel: Preparation, characterization and antimicrobial activity evaluation. *Int J Biol Macromol* 164:499–509
57. Fu S, Zhou L, Zeng P, Fu S (2022) Antibacterial Chitosan-gelatin Hydrogel Beads Cross-linked by Riboflavin under Ultraviolet A Irradiation. *Fibers Polym* 23:315–320
58. Wei L, Tan J, Li L, Wang H, Liu S, Chen J, Weng Y, Liu T (2022) Chitosan/Alginate Hydrogel Dressing Loaded FGF/VE-Cadherin to Accelerate Full-Thickness Skin

- Regeneration and More Normal Skin Repairs. *Int J Mol Sci*.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23031249>
59. Lungu R, Paun MA, Peptanariu D, Ailincai D, Marin L, Nichita MV, Paun VA, Paun VP (2022) Biocompatible Chitosan-Based Hydrogels for Bioabsorbable Wound Dressings. *Gels*. <https://doi.org/10.3390/gels8020107>
  60. Tatarusanu SM, Sava A, Profire BS, Pinteala T, Jitareanu A, Iacob AT, Lupascu F, Simionescu N, Rosca I, Profire L (2023) New Smart Bioactive and Biomimetic Chitosan-Based Hydrogels for Wounds Care Management. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030975>
  61. Hoare TR, Kohane DS (2008) Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer (Guildf)* 49:1993–2007
  62. Li J, Mooney DJ (2016) Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater* 1:1–18
  63. Narayanaswamy R, Torchilin VP (2019) Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24030603>
  64. González-Henríquez CM, Sarabia-Vallejos MA, Rodríguez-Hernández J (2017) Advances in the fabrication of antimicrobial hydrogels for biomedical applications. *Materials (Basel)* 10:1–23
  65. Yang K, Han Q, Chen B, Zheng Y, Zhang K, Li Q, Wang J (2018) Antimicrobial hydrogels: Promising materials for medical application. *Int J Nanomedicine* 13:2217–2263
  66. Bruniera FR, Ferreira FM, Saviolli LRM, Bacci MR, Feder D, Pedreira MDLG, Peterlini MAS, Azzalis LA, Junqueira VBC, Fonseca FLA (2015) The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: A review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19:694–700
  67. Ordikhani F, Tamjid E, Simchi A (2014) Characterization and antibacterial performance of electrodeposited chitosan-vancomycin composite coatings for prevention of implant-associated infections. *Mater Sci Eng C* 41:240–248



68. Kalalinia F, Taherzadeh Z, Jirofti N, et al (2021) Evaluation of wound healing efficiency of vancomycin-loaded electrospun chitosan/poly ethylene oxide nanofibers in full thickness wound model of rat. *Int J Biol Macromol* 177:100–110
69. Villanueva ME, Diez AMDR, González JA, Pérez CJ, Orrego M, Piehl L, Teves S, Copello GJ (2016) Antimicrobial Activity of Starch Hydrogel Incorporated with Copper Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* 8:16280–16288
70. Sharma PK, Halder M, Srivastava U, Singh Y (2019) Antibacterial PEG-Chitosan Hydrogels for Controlled Antibiotic/Protein Delivery. *ACS Appl Bio Mater* 5313–5322
71. Chin SF, Romainor ANB, Pang SC, Lihan S (2019) Antimicrobial starch-citrate hydrogel for potential applications as drug delivery carriers. *J Drug Deliv Sci Technol* 54:101239
72. Pino-Ramos VH, Duarte-Peña L, Bucio E (2021) Highly crosslinked agar/acrylic acid hydrogels with antimicrobial properties. *Gels* 7:1–16
73. Mallick SP, Panda SP, Gayatri A, Kunaal Y, Naresh C, Suman DK, Samineni J, Siddiqui N, Singh BN (2021) Chitosan oligosaccharide based hydrogel: An insight into the mechanical, drug delivery, and antimicrobial studies. *Biointerface Res Appl Chem* 11:10293–10300
74. Meléndez-Ortiz HI, Betancourt-Galindo R, Puente-Urbina B, Sánchez-Orozco JL, Ledezma A (2022) Antimicrobial cotton gauzes modified with poly(acrylic acid-co-maltodextrin) hydrogel using chitosan as crosslinker. *Int J Biol Macromol* 198:119–127
75. Wang J, Yang Y, Huang L, Kong L, Wang X, Shi J, Lü Y, Mu H, Duan J (2022) Development of responsive chitosan-based hydrogels for the treatment of pathogen-induced skin infections. *Int J Biol Macromol* 219:1009–1020
76. Rastegari A, Hasanshakil F, Mohammadi Z, Saadatpor F, Moraffah F (2023) A chitosan based hydrogel containing zinc oxide nanoparticles as a carrier for improving antibacterial activity and controlling the release of antibiotics. 1–10
77. Naeimi M, Tajedin R, Farahmandfar F, Naeimi M, Monajjemi M (2020) Preparation

- and characterization of vancomycin-loaded chitosan/PVA/PEG hydrogels for wound dressing. *Mater Res Express*. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abb154>
78. de Lima HHC, Kupfer VL, Moisés MP, Guilherme MR, de C. Rinaldi J, Felisbino SL, Rubira AF, Rinaldi AW (2018) Bionanocomposites based on mesoporous silica and alginate for enhanced drug delivery. *Carbohydr Polym* 196:126–134
  79. Paulino AT, Pereira AGB, Fajardo AR, Erickson K, Kipper MJ, Muniz EC, Belfiore LA, Tambourgi EB (2012) Natural polymer-based magnetic hydrogels: Potential vectors for remote-controlled drug release. *Carbohydr Polym* 90:1216–1225
  80. Zonatto F, Muniz EC, Tambourgi EB, Paulino AT (2017) Adsorption and controlled release of potassium, phosphate and ammonia from modified Arabic gum-based hydrogel. *Int J Biol Macromol* 105:363–369
  81. Paiva D, Ivanova G, Do Carmo Pereira M, Rocha S (2013) Chitosan conjugates for DNA delivery. *Phys Chem Chem Phys* 15:11893–11899
  82. Wu DD, Tan Y, Cao ZW, Han LJ, Zhang HL, Dong LS (2018) Preparation and characterization of maltodextrin-based polyurethane. *Carbohydr Polym* 194:236–244
  83. Plieva F, Oknianska A, Degerman E, Galaev IY, Mattiasson B (2012) *Journal of Biomaterials Science*, Novel supermacroporous dextran gels. 37–41
  84. Sambyal S, Sravanthi V, Sampath Kumar HM (2022) Biological evaluation of chemically synthesized sulfated maltodextrin as an immunomodulator. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre*. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2022.100313>
  85. Lu X, Xu Y, Sun W, Sun Y, Zheng H (2017) UV-initiated synthesis of a novel chitosan-based flocculant with high flocculation efficiency for algal removal. *Sci Total Environ* 609:410–418
  86. Sarkar K, Kundu PP (2012) Preparation of low molecular weight N-maleated chitosan-graft-PAMAM copolymer for enhanced DNA complexation. *Int J Biol Macromol* 51:859–867

87. Nakhjiri MT, Marandi GB, Kurdtabar M (2018) Poly(AA-co-VPA) hydrogel cross-linked with N-maleyl chitosan as dye adsorbent: Isotherms, kinetics and thermodynamic investigation. *Int J Biol Macromol* 117:152–166
88. El-Dib FI, Eshaq G, ElMetwally AE, Hefni HHH (2021) Enhancing the porous structure of swellable poly(acrylic acid-co-acrylamide) crosslinked by N-Maleyl chitosan via introducing foaming agents and non-ionic surfactant. *Adv Ind Eng Polym Res* 4:9–18
89. Zhong C, Wu J, Reinhart-King CA, Chu CC (2010) Synthesis, characterization and cytotoxicity of photo-crosslinked maleic chitosan-polyethylene glycol diacrylate hybrid hydrogels. *Acta Biomater* 6:3908–3918
90. Du J, Hsieh Y Lo (2008) Nanofibrous membranes from aqueous electrospinning of carboxymethyl chitosan. *Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/12/125707>
91. Kumar S, Koh J (2012) Physicochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *Int J Mol Sci* 13:6102–6116
92. Neufeld L, Bianco-Peled H (2017) Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. *Int J Biol Macromol* 101:852–861
93. Sousa JM, Vieira ACC, Costa MP, et al (2022) Chitosan grafted with maleic anhydride and ethylenediamine: Preparation, characterization, computational study, antibacterial and cytotoxic properties. *Mater Chem Phys*. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126301>
94. Septiawan MR, Permana D, Sabarwati SH, Ahmad LO, Ramadhan LOAN (2018) Functionalization of Chitosan with Maleic anhydride for proton exchange membrane. *Indones J Chem* 18:313–320
95. Lavanya R, Gomathi T, Vijayalakshmi K, Saranya M, Sudha PN, Anil S (2017) Adsorptive removal of copper (II) and lead (II) using chitosan-g-maleic anhydride-g-methacrylic acid copolymer. *Int J Biol Macromol* 104:1495–1508
96. Wongphan P, Harnkarnsujarit N (2020) Characterization of starch, agar and

- maltodextrin blends for controlled dissolution of edible films. *Int J Biol Macromol* 156:80–93
97. SANCHEZ AW (2019) MODIFICACIÓN POST-SÍNTESIS DE MACROGELES Y NANOGELES : control del grado de entrecruzamiento , estructura y funcionalización. 295
  98. Craciun AM, Morariu S, Marin L (2022) Self-Healing Chitosan Hydrogels: Preparation and Rheological Characterization. *Polymers* (Basel). <https://doi.org/10.3390/polym14132570>
  99. Moses VK, Kandi V, Rao SKD (2020) Minimum Inhibitory Concentrations of Vancomycin and Daptomycin Against Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus Isolated from Various Clinical Specimens: A Study from South India. *Cureus* 12:1–8
  100. Citron DM, Tyrrell KL, Merriam CV, Goldstein EJC (2012) In vitro activities of CB-183,315, vancomycin, and metronidazole against 556 strains of Clostridium difficile, 445 other intestinal anaerobes, and 56 Enterobacteriaceae species. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1613–1615
  101. Akhlaghi N, Najafpour-Darzi G (2023) Thermosensitive injectable dual drug-loaded chitosan-based hybrid hydrogel for treatment of orthopedic implant infections. *Carbohydr Polym* 320:121138
  102. Atay HY (2020) Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems.
  103. Guarnieri A, Triunfo M, Scieuzo C, Ianniciello D, Tafi E, Hahn T, Zibek S, Salvia R, De Bonis A, Falabella P (2022) Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. *Sci Rep* 12:1–12
  104. Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Xavier Malcata F (2008) Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy* 108:1128–1134
  105. Zheng LY, Zhu JF (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr Polym* 54:527–530

106. Goy RC, De Britto D, Assis OBG (2009) A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros* 19:241–247
107. Groman RP (2015) Chapter 181 - Miscellaneous Antibiotics. *Proteus* 944–949
108. Therapeutics PA (2017) Practical Antimicrobial Therapeutics. *Vet Med* 153–174
109. Sun M, Cheng L, Xu Z, Chen L, Liu Y, Xu Y, Zhou D, Zhang X, Zhou Q, Sun J (2022) Preparation and Characterization of Vancomycin Hydrochloride-Loaded Mesoporous Silica Composite Hydrogels. *Front Bioeng Biotechnol* 10:1–8
110. Mohamed Amin Z, Koh SP, Yeap SK, Abdul Hamid NS, Tan CP, Long K (2015) Efficacy study of broken rice maltodextrin in in vitro wound healing assay. *Biomed Res Int.* <https://doi.org/10.1155/2015/687694>
111. Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ (2001) The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 22:2959–2966
112. Thankam FG, Muthu J (2014) Infiltration and sustenance of viability of cells by amphiphilic biosynthetic biodegradable hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 25:1953–1965
113. Nitobenzene M (2017) Identification of the substance / mixture and of the company / undertaking Identified uses : Details of the supplier of the safety data sheet SECTION 2 : Hazards identification. 2006:1–13