



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CIACYT-UASLP**

**IMPRESIÓN 3D DE PRÓTESIS DE MENISCO A BASE DE HIDROGEL  
SINTETIZADO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA (Ag NPs), ÁCIDO  
HIALURÓNICO Y COLÁGENO**

**TESIS**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS**

**PRESENTA:**  
**IB Veronica Jazmin Urbina Vázquez**

Asesor de tesis: **Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras**  
Co-Asesora de tesis: **Dra. Ma. Guadalupe García Valdivieso**

**San Luis Potosí, SLP, México**

**Septiembre de 2022**

---

***DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS***

---

Yo, **VERONICA JAZMIN URBINA VÁZQUEZ**, estudiante del Posgrado en Ciencias Aplicadas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, como autora de la tesis **“IMPRESIÓN 3D DE PRÓTESIS DE MENISCO A BASE DE HIDROGEL SINTETIZADO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA (Ag NPs), ÁCIDO HIALURÓNICO Y COLÁGENO”**, declaro que la tesis es una obra original, inédita, auténtica, personal, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales vigentes que protegen los derechos de autor y de propiedad intelectual e industrial. Las ideas, doctrinas, resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

Asesores:

---

Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras  
CIACYT, UASLP  
Asesor

---

Dra. Ma. Guadalupe García Valdivieso  
CIACYT, UASLP  
Co-asesor

Sinodales:

---

Dra. Brenda Jeanneth Acosta Ruelas  
CIACYT, UASLP  
Sinodal

---

Dr. José Amir González Calderón  
Instituto de Física, UASLP  
Sinodal

---

Dra. Claudia Guadalupe Castillo Martín del Campo  
CIACYT-Medicina, UASLP  
Sinodal

# ***DEDICATORIA***

*A mi esposo,  
A mis papás,  
A mis amigos*

# ***AGRADECIMIENTOS***

A mi asesor de tesis, Dr. Hugo Ricardo Navarro Contreras, gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y darme la oportunidad de desarrollar este tema de investigación, es un honor trabajar con una inminencia de la investigación potosina.

A mi co-asesora Dra. Guadalupe García Valdivieso, gracias por confiar en mí para elaborar este tema de tesis, por compartirme los conocimientos y habilidades necesarias para desarrollarlo, por la paciencia y comprensión en los momentos en que lo necesité. Gracias por estar al pendiente siempre, la confianza y libertad otorgada para trabajar el proyecto.

A mis sinodales, Dra. Brenda Acosta, Dr. Amir González, Dra. Claudia Castillo, por sus atentos comentarios y soporte a lo largo de mi trabajo de tesis.

A la Dra. Brenda Acosta especialmente, gracias por su soporte, tiempo y excelente manera para resolver mis dudas en temas referentes al proyecto. Además, gracias por su apoyo con las mediciones de Reflexión Total Atenuada de Infrarrojo por Transformada de Fourier (ATR-FTIR) así como con las mediciones de espectroscopía UV- VIS.

A los doctores Elías Pérez y Amir González del Laboratorio de Polímeros en el Instituto de Física, quienes además de brindar el apoyo en realizar mediciones de reología y resolver dudas sobre ello, me enseñaron a manejar el equipo.

Nuevamente al Dr. Amir González y a la Doctora Mariana Peña por su apoyo con las pruebas antimicrobianas de las nanopartículas de plata, sin su ayuda terminar esta tesis no hubiera sido posible, gracias por tomarse su tiempo de enseñarme esta nueva técnica.

A la Dra. Claudia Castillo, gracias por su apoyo con el establecimiento de cantidades de nanopartículas de plata necesarias para desarrollar el proyecto.

Al Dr. Ángel Gabriel Rodríguez por proporcionar el acceso al Espectrómetro Confocal Raman.

Al Ing. Antonio Ezquivel, gracias por asesorarme con los aditamentos y programas para llevar a cabo la impresión 3D de mi material.

A mis compañeras de proyecto Karí y Grecia gracias por compartir sus conocimientos durante la elaboración de este proyecto, por cada una darle su enfoque y poner su granito de arena en esta investigación.

A Eduardo Arenas, gracias por motivarme a regresar a la ciencia, por tu apoyo en el laboratorio durante estos dos años y por ayudarme a entender técnicas nuevas para mí, por seguir siendo amigos después de tantos años, see you soon. A Carlos, gracias por ser un buen compañero y escuchar, por las pláticas y comentarios, por hacer más ameno mi paso por el CiacyT.

A mi esposo Ossiell Zamudio, por apoyarme desde siempre, por alentarme a seguir mis sueños y confiar en mí. Gracias por ayudarme a instalar programas y entenderme en mis momentos de estrés. La segunda tesis dedicada hacia ti, esperemos vengan más. ¡Gracias siempre!

A mi familia, Mamá Verónica, Papá Juan Manuel, Hermano Victor, gracias por su apoyo durante este tiempo, por cuidar a Sirius cuando llegaba tarde y por seguir estando en un logro más a mi lado.

A mis amigos: Arely, Lalote, Lalito, Erik, Oscar, Dani, Fer, gracias por ayudarme a desestresarme y aportar sus impuestos a la ciencia.

A Sirius, por darme alegría cuando la necesitaba, por sacarme a pasear para despejar mis ideas.

Agradezco el apoyo económico a CONACYT por la beca de Maestría Número 1075810 que me permitió efectuar mi maestría.

# ÍNDICE

DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1. BIOMATERIALES.....	5
3.2. MENISCO .....	6
3.2.1 ANATOMÍA DEL MENISCO .....	6
3.2.2 COMPOSICIÓN DEL MENISCO .....	7
3.2.3 LESIONES DE MENISCO Y TRATAMIENTOS ASOCIADOS .....	8
3.3 HIDROGEL .....	11
3.3.1 POLÍMEROS NATURALES (BIOPOLÍMEROS).....	12
3.4 PROPUESTA DE TRABAJO: MATERIALES QUE COMPONEN AL HIDROGEL .....	13
3.4.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AG NPS) .....	13
3.4.2 COLÁGENO.....	14
3.4.3 ÁCIDO HIALURÓNICO .....	16
3.4.4 QUITOSANO.....	17
3.4.5 COLÁGENO, ÁCIDO HIALURÓNICO Y QUITOSANO.....	18
3.5 INGENIERÍA DE TEJIDO .....	18
3.5.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS DE CARTÍLAGO.....	18
3.6 BIOIMPRESIÓN 3D .....	19
4 HIPOTESIS.....	20
5 OBJETIVO GENERAL.....	20
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6 METODOLOGÍA.....	21
6.1 SÍNTESIS DE AG NPS .....	21
6.2 SÍNTESIS DE HIDROGEL.....	22
6.3 POLIMERIZACIÓN DEL HIDROGEL .....	22
7 CARACTERIZACIONES AG NPS.....	23
7.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	23
7.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE TRANSMISIÓN.....	24
7.3 DLS Y POTENCIAL Z .....	24
8 CARACTERIZACIONES HIDROGEL .....	25
8.1 POLIMERIZACIÓN Y SWELLING.....	25
8.2 ESPECTROSCOPIA FTIR.....	25

8.3	REOLOGÍA .....	26
8.3.1	VISCOSIDAD .....	26
8.3.2	MÓDULO DE ALMACENAMIENTO Y PÉRDIDA .....	26
8.4	PRUEBAS ANTIMICROBIANAS .....	27
8.5	IMPRESIÓN 3D .....	28
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
9.1	POTENCIAL ZETA Y DLS .....	30
9.2	UV-VIS DE AG NPS .....	31
9.3	STEM DE AG NPS .....	33
9.4	FTIR-ATR DE HIDROGEL SIN AG NPS .....	35
9.5	SWELLING.....	39
9.6	PRUEBAS REOLÓGICAS.....	40
9.6.1	VISCOSIDAD .....	40
9.6.2	MÓDULO DE ALMACENAMIENTO Y PÉRDIDA G' .....	42
9.7	PRUEBAS ANTIBACTERIANAS.....	44
9.8	IMPRESIÓN 3D .....	45
10	CONCLUSIONES .....	47
11	TRABAJO A FUTURO .....	48
12	ANEXO 1 .....	49
12.1	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	49
12.1.1	ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA VISIBLE UV-VIS .....	49
12.1.2	ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR .....	50
12.1.3	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE TRANSMISIÓN STEM .....	51
12.1.4	DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) .....	52
12.1.5	DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO.....	52
12.1.6	POTENCIAL ZETA.....	53
12.1.7	HINCHAMIENTO (SWELLING).....	53
12.1.8	REOLOGÍA .....	54
12.1.8.1	VISCOSIDAD .....	55
12.1.8.2	MÓDULO DE ALMACENAMIENTO Y PÉRDIDA .....	56
12.1.9	PRUEBAS ANTIMICROBIANAS .....	58
12.1.9.1	CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO .....	60
12.1.9.2	OBSERVACIÓN EN MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDO (COLONIAS).....	61
12.1.9.3	BACTERIAS GRAM POSITIVA (+) Y GRAM NEGATIVA (-).....	62
12.1.10	IMPRESIÓN 3D .....	62
13	REFERENCIAS.....	64

# ***LISTA DE FIGURAS***

<b>FIGURA 1 ANATOMÍA DE LA RODILLA [22].</b> .....	<b>6</b>
<b>FIGURA 2 UBICACIÓN DE LAS TRES REGIONES DEL MENISCO [30].</b> .....	<b>7</b>
<b>FIGURA 3 ILUSTRACIÓN DE DIFERENTES DESGARROS DE MENISCO [35].</b> .....	<b>9</b>
<b>FIGURA 4 ESQUEMA DE (A) EL HIDROGEL DE RED SIMPLE COVALENTE CLÁSICO, (B) HIDROGEL DE DOBLE RETICULACIÓN, (C) HIDROGEL DE NANOCOMPUESTO INTERCALADO CON POLÍMERO, (D) HIDROGEL CON SEGMENTOS SIMILARES A ELASTÓMEROS Y NO (C) HIDROGEL DE NANOCOMPUESTO INTERCALADO CON POLÍMERO , (D) HIDROGEL CON SEGMENTOS SIMILARES A ELASTÓMEROS Y ENLACES COVALENTES, Y (E) HIDROGEL DE DOBLE RED (DN) [60].</b> .....	<b>12</b>
<b>FIGURA 5 MECANISMO DE FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A PARTIR DE LA REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA [69].</b> .....	<b>14</b>
<b>FIGURA 6 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL COLÁGENO [72].</b> .....	<b>14</b>
<b>FIGURA 7 CONTENIDO APROXIMADO DE COLÁGENO EN DIFERENTES TEJIDOS (PORCENTAJE DE PESO SECO) [73].</b> .....	<b>15</b>
<b>FIGURA 8 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO [79].</b> .....	<b>16</b>
<b>FIGURA 9 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL QUITOSANO [86].</b> .....	<b>17</b>
<b>FIGURA 10 A-C) PREPARACIÓN DE AGENTE REDUCTOR Y ESTABILIZADOR, D) PREPARACIÓN DE PRECURSOR METÁLICO, E-F) REDUCCIÓN, NUCLEACIÓN Y CRECIMIENTO DE AG NPS [102] (CREADO CON BIORENDER.COM)</b> .....	<b>21</b>
<b>FIGURA 11 PROCESO DE SÍNTESIS DE HIDROGEL (CREADO CON BIORENDER.COM)</b> .....	<b>22</b>
<b>FIGURA 12 PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN Y POLIMERIZACIÓN DE PIEZA. (CREADO CON BIORENDER.COM)</b> .....	<b>23</b>
<b>FIGURA 13 ESPECTRÓMETRO UV-VIS AVASPEC ULS4096 DE AVANTES.</b> .....	<b>24</b>
<b>FIGURA 14 EQUIPO MALVERN MODELO ZETASIZER NANO ZS.</b> .....	<b>24</b>
<b>FIGURA 15 PROCESO DEL MATERIAL PARA REALIZAR SWELLING CREADO CON BIORENDER.COM</b> .....	<b>25</b>
<b>FIGURA 16 MUESTRA SOBRE PLATO DE REÓMETRO ANTON-PAAR MCR 300</b> .....	<b>26</b>
<b>FIGURA 17 ESPECTROFOTÓMETRO GENESYS 10S UV-VIS</b> .....	<b>27</b>
<b>FIGURA 18 INCUBADORA A 35°</b> .....	<b>28</b>
<b>FIGURA 19 ARCHIVO .STL DE PRÓTESIS DE MENISCO, PREVIO A PROCEDER A SER IMPRESA</b> .....	<b>29</b>
<b>FIGURA 20 MOTOR A PASOS ADAPTADO A IMPRESORA 3D</b> .....	<b>29</b>
<b>FIGURA 21 DISTRIBUCIÓN DE POTENCIAL Z</b> .....	<b>30</b>
<b>FIGURA 22 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE AG NPS POR INTENSIDAD</b> .....	<b>31</b>
<b>FIGURA 23 IMÁGENES STEM DE AG NPS REDUCIDAS CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y ESTABILIZADAS CON CITRATO DE SODIO</b> .....	<b>34</b>
<b>FIGURA 24 HISTOGRAMA DE TAMAÑOS DE AG NPS A 1UG/ML</b> .....	<b>35</b>
<b>FIGURA 25 ESPECTRO FTIR DE QUITOSANO CON SIGNO CARACTERÍSTICO COMO EVIDENCIA [114].</b> .....	<b>36</b>

FIGURA 26 LOS ESPECTROS FT-IR MUESTRAN LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LAS PROTEÍNAS DE COLÁGENO TIPO 1, COMO BANDA AMIDA I, AMIDA II Y AMIDA III [115].	36
FIGURA 27 ESPECTROS INFRARROJOS (FT-IR) DEL ÁCIDO HIALURÓNICO ESTÁNDAR [116].	37
FIGURA 28 ESPECTRO FTIR DE LA BENTONITA [117]	37
FIGURA 29 ESPECTRO FTIR-ATR DE HIDROGELES SIN AG NPS	38
FIGURA 30 EL EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL ANDAMIO EN LA ABSORCIÓN TOTAL DE AGUA EN DIFERENTES TIEMPOS DE REMOJO.	39
FIGURA 31 SWELLING DE HIDROGEL SINTETIZADO CON AG NPS, COLÁGENO, ÁCIDO HIALURÓNICO Y QUITOSANO POLIMERIZADO A: A) 24 HORAS, B) 48 HORAS	39
FIGURA 32 COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE A) ÁCIDO HIALURÓNICO Y B) COLÁGENO A VARIAS CONCENTRACIONES EN SOLUCIONES ACUOSAS PURAS [119].	40
FIGURA 33 VISCOCIDAD DE HIDROGELES CON ÁCIDO HIALURONICO Y COLÁGENO. VARIACIÓN DE AG NPS DE A) $1\mu\text{g/ml}$ , B) $10\mu\text{g/ml}$ , C) $20\mu\text{g/ml}$ Y D) $40\mu\text{g/ml}$ .	41
FIGURA 34 COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE A) ÁCIDO HIALURÓNICO Y B) COLÁGENO A VARIAS CONCENTRACIONES EN SOLUCIONES ACUOSAS PURAS [119]	42
FIGURA 35 MÓDULOS $G'$ (NEGRO), $G''$ (AZUL) Y FACTOR DE AMORTIGUAMIENTO (ROJO) DE HIDROGEL SINTETIZADO CON COLÁGENO, ÁCIDO HIALURÓNICO, QUITOSANO Y AG NPS A DIFERENTES CONCENTRACIONES A) $1\mu\text{g/ml}$ , B) $10\mu\text{g/ml}$ , C) $20\mu\text{g/ml}$ Y	43
FIGURA 36 MÓDULO DE PÉRDIDA, MÓDULO DE ALMACENAMIENTO Y FACTOR DE AMORTIGUAMIENTO CORRESPONDIENTE A HIDROGELES POLIMERIZADOS A) 24 HORAS, B) 48 HORAS.	44
FIGURA 37 PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LOS HIDROGELES CON Y SIN AG NPS EN CALDO INOCULADO.	45
FIGURA 38 IMPRESIÓN 3D DE MENISCO	46
FIGURA 39 MENISCOS MEDIAL Y LATERALES OBTENIDOS MEDIANTE IMPRESIÓN 3D Y CON PROCESO DE POLIMERIZACIÓN DE 48 HORAS.	46
FIGURA 40 MENISCOS OBTENIDOS POR IMPRESIÓN 3D, DESPUES DE 72 HORAS DE SER SUMERGIDOS EN PBS.	46
FIGURA 41 ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV/VIS DE AG NPS [66].	49
FIGURA 42 PRINCIPIO DE 3.2.1ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA VISIBLE UV-VIS [126].	50
FIGURA 43 REPRESENTACIÓN ESQUEMATICA DE UN SISTEMA ATR-FTIR [129].	51
FIGURA 44 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UN MICROSCOPIO STEM [107].	52
FIGURA 45 PROCESO DE HINCHAMIENTO EN MEDIO ACUOSO, A) HIDROGEL POLIMERIZADO, B) HIDROGEL HINCHADO POR SOLUCIÓN ACUOSA (CREADO CON BIORENDER.COM)	54
FIGURA 46 VECTOR QUE REPRESENTA EL MÓDULO COMPLEJO $G^*$ , CON SUS COMPONENTES $G'$ Y $G''$ [120]	57
FIGURA 47 A) COMPORTAMIENTO TÍPICO DEL MÓDULO ELÁSTICO DE UN POLÍMERO FRENTE A LA TEMPERATURA B) MAPA VISCOELÁSTICO [120].	57

FIGURA 48 MECANISMOS DE TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS (NPS) FRENTE A BACTERIAS [121]. .....	60
FIGURA 49 INOCULACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO. (CREADO CON BIORENDER.COM).....	61
FIGURA 50 FIGURA REPRESENTATIVA DE UN CULTIVO DE COLONIAS EN MEDIO SÓLIDO. (CREADO CON BIORENDER.COM) .....	61

## ***LISTA DE TABLAS***

TABLA 1 COMPOSICIÓN, CARACTERÍSTICAS Y DISTRIBUCIÓN EN TEJIDOS DEL COLÁGENO[77] .....	16
TABLA 2 CANTIDADES UTILIZADAS EN HIDROGELES SINTETIZADOS .....	23
TABLA 3 CONFIGURACIÓN DE CONCENTRACIONES DE HIDROGEL EN CALDO NUTRIENTE E INOCULADOS. ....	28
TABLA 4 COMPARACIÓN DEL POTENCIAL Z EN AG NPS [107], [108], [109], [110]. ....	31
TABLA 5 ASIGNACIÓN DE BANDAS RELACIONADAS A MATERIALES EXISTENTES EN HIDROGELES SINTETIZADOS CON COLÁGENO, ÁCIDO HIALURÓNICO, QUITOSANO Y BENTONITA [114]–[118].....	38
TABLA 6 PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LOS HIDROGELES CON Y SIN AG NPS EN CALDO INOCULADO.....	44

# ***1. RESUMEN***

En los últimos años se han realizado estudios sobre bio-tintas que pueden ser utilizadas por la tecnología de impresión 3D para producir tejidos artificiales para ser implantados en seres humanos. Algunos tipos de tejidos, como el cartílago y el menisco tienen poco o ningún suministro de sangre y no pueden curarse si están dañados.

El menisco es una pieza de tejido fibrocartilaginoso en forma de cuña que actúa como un "cojín" entre la espinilla y el fémur en la articulación de la rodilla. La deficiencia de menisco a menudo conducirá a osteoartritis (OA) avanzada debido a lesiones en las heridas si no se recibe un tratamiento oportuno. Un desgarramiento de menisco leve puede curarse mediante la inyección de biomateriales funcionales, suturas o reemplazo parcial de menisco, mientras que las lesiones graves a menudo requieren un trasplante de menisco. Sin embargo, las limitaciones radican en el suministro de donantes, la falta de coincidencia de formas y la compatibilidad de los tejidos. Un enfoque prometedor para solucionar este problema es crear una prótesis de hidrogel 3D para ayudar en la locomoción del paciente. Los hidrogeles se usan comúnmente debido a sus propiedades de ser aceptados por el cuerpo humano como una estructura que contiene agua, fácil transferencia de nutrientes y permeabilidad a sustancias biológicas. Los nanocompuestos, como las nanopartículas de plata (NPs de Ag) son útiles por su espectro antibacteriano, mientras que el colágeno y el ácido hialurónico, aportan propiedades de resistencia mecánica, coagulación y no toxicidad para el ser humano.

Por esta razón se llevó a cabo la síntesis de hidrogel adicionando Ag NPs, colágeno y ácido hialurónico. Para el proceso de síntesis del hidrogel se usaron las nanoestructuras de plata y los monómeros: ácido hialurónico, colágeno y quitosano. El hidrogel se sintetiza bajo rigurosa agitación mecánica dispersando la solución de Ag NPs en ácido acético, posteriormente se adiciona el ácido hialurónico, colágeno y quitosano además de PBS (Solución Salina Amortiguada por Fosfatos). Posteriormente se añade la bentonita. Por último, se agregan el crosslinker, el fotoiniciador, el monómero AMPS.

Los hidrogeles se utilizaron para construir una pieza modelo de menisco con la impresora 3D, realizando el proceso de polimerización mediante radiación UV para proporcionar rigidez a la pieza.

A través de microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM) se obtuvieron micrografías de las Ag NPs y se pudo obtener un histograma mediante software, en el cual se determinó que el valor promedio de tamaño se encuentra en el rango de 25 a 29 nm.

Mediante la técnica de DLS se corroboró el tamaño de las nanopartículas, resultando un valor aproximado de 29 nm, valor que coincide con el obtenido mediante microscopía electrónica de barrido. Se realizó también la caracterización de Potencial Z para medir la carga que presentan las nanopartículas, dando como resultado -55.3 mV. Por último, mediante espectroscopía UV-Vis se determinó la formación de plata metálica.

Para establecer interacciones entre Colágeno, ácido hialurónico y quitosano, las muestras se caracterizaron por FTIR-ATR encontrando relación de ellas entre  $797\text{-}3447\text{ cm}^{-1}$ . El Ácido hialurónico tiene interacción con el hidrogel, en especial con el quitosano en  $1591\text{ cm}^{-1}$ .

Se obtuvo un factor de hinchamiento (swelling) de 310% en los hidrogeles sintetizados con  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ , se comprueba la síntesis de un hidrogel, es decir, que retiene al menos 10% de su peso en agua.

En los hidrogeles sintetizados con  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  de Ag NPs, se obtuvo un 80% de inhibición para el caldo inoculado con la bacteria *Staphylococcus aureus*, y un 69.7% de inhibición para el caldo inoculado con la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), teniendo así la capacidad de ser utilizados como biotinta para la impresión 3D de prótesis de menisco gracias a su actividad antimicrobiana debida a la adición de Ag NP's.

La viscosidad del material se obtuvo entre  $7\text{kPa}\cdot\text{s}$  que garantiza la viscosidad para ser extruido por impresión 3D. La adición de Colágeno y Ácido hialurónico tuvieron gran influencia en la mejora de las propiedades mecánicas

Se caracterizaron las propiedades reológicas de viscosidad y los módulos  $G'$  (módulo de elasticidad) y  $G''$  (módulo de viscosidad). La viscosidad obtenida se encuentra entre 10-20 kPa, lo cual garantiza la viabilidad en impresión 3D.

Se llevó a cabo la impresión de un menisco lateral con el hidrogel constituido de Colágeno/Ácido hialurónico/ y  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  de Ag NPs, ya que presentó una viscosidad de  $7\text{kPa}\cdot\text{s}$ , y fue la muestra que presentó mejor inhibición en las pruebas antimicrobianas.

## ***2. INTRODUCCIÓN***

Millones de personas sufren de lesiones o daños en órganos y/o tejidos, siendo el trasplante la solución a dichos problemas en la actualidad, este es el caso del menisco. El menisco es un tejido fibrocartilaginoso biomecánico complejo y vital en la articulación de la rodilla. Es una estructura importante en el cuerpo humano, ya que tienen un papel participativo en la absorción de impactos y está diseñado para mejorar la función articular, tienen poco o ningún suministro de sangre y no pueden curarse si están dañados [1] [2]. Es por ello por lo que actualmente se implementa el uso de biomateriales con polímeros naturales para impresión 3D, los cuales sustituyen tejidos o articulaciones.

La ciencia de los materiales está inmersa en todas las ramas del conocimiento, una de estas áreas es la biomedicina, que trata de desarrollar materiales que puedan interactuar con el cuerpo humano, conocidos como biomateriales. La característica más importante de los biomateriales es la interacción con los sistemas biológicos sin generar una respuesta inmune, denominada biocompatibilidad [3], [4]. Tomando en cuenta estas características, uno de los materiales más recurridos en la ingeniería de tejido son los hidrogeles al presentar propiedades de ser aceptados en el cuerpo humano como una estructura que contiene agua, ser inertes en procesos biológicos, permeabilidad a sustancias biológicas y biocompatibles [5]. Un hidrogel es una red tridimensional (3D) de polímeros hidrófilos que pueden hincharse en un medio acuoso o agua y retener una gran cantidad de esta mientras mantienen su estructura, debido a la reticulación química o física de cadenas de polímeros individuales [6].

Actualmente la incorporación de nanopartículas metálicas en matrices poliméricas para hidrogel, está despertando un gran interés en muchos campos de la ciencia, lo que ha permitido el desarrollo de materiales con mejores propiedades físicas y mecánicas [5]. Las nanopartículas de plata presentan un amplio espectro bacteriano, actividad que los ha hecho extremadamente populares para uso en regeneración de tejidos, apósitos para heridas, catéteres médicos, implantes cardiovasculares, lentes de contacto, instrumentos dentales, suministro de fármacos entre otros. El principal impacto de la prótesis de menisco mediante hidrogeles con adición de nanopartículas de plata es en la biomedicina [7].

Un polímero que resulta novedoso en la síntesis de hidrogeles es el ácido hialurónico por ser un glucosaminoglicano natural. Se considera uno de los mejores biomateriales a base de polisacáridos utilizado para el tratamiento de heridas debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y características fisicoquímicas atípicas [8]. El ácido hialurónico es uno de los principales componentes del fluido sinovial, el cual es un tejido que recubre el interior de las articulaciones móviles, con el fin de producir un líquido gelatinoso que disminuye el roce entre el cartílago y las otras estructuras del interior de la articulación. Es por ello por lo que el ácido hialurónico es muy usado en la ingeniería de tejidos, vehiculización y liberación controlada de fármacos, reparación de heridas y cicatrización de la piel, además de tener un impacto positivo en la proliferación y migración celular [9].

Por otro lado, los hidrogeles basados en polímeros de colágeno son redes tridimensionales con la capacidad de absorber agua y una alta biocompatibilidad para utilizarlos en la reparación de tejidos dañados por ser de origen natural. El colágeno se degrada fácilmente y es reabsorbido por el cuerpo permitiendo una buena adhesión celular

[9]. Los biomateriales a base de colágeno son de suma importancia para la ingeniería de tejidos y en medicina regenerativa debido a su excelente biocompatibilidad, baja inmunogenicidad además de favorecer a la curación de heridas cutáneas. Existen 29 tipos de colágeno, sin embargo el colágeno tipo 1 es el más empleado en ingeniería de tejido [10].

## **3. MARCO TEÓRICO**

### **3.1. Biomateriales**

Los materiales diseñados y desarrollados para interactuar con los sistemas biológicos se denominan biomateriales. Son materiales bioactivos, fácilmente compactables al tejido humano y muestran un buen grado de biodegradabilidad. Aunque los biomateriales se utilizan principalmente para aplicaciones médicas comúnmente en medicamentos, ingeniería de tejidos, fabricación de partes del cuerpo humano y otras aplicaciones de fabricación también se utilizan con éxito en el tratamiento médico como la terapia del cáncer, reparación de ligamentos y tendones, aplicaciones ortopédicas, aplicaciones oftálmicas para el diseño de lentes de contacto, cicatrización de heridas, terapia de reproducción de generación de nervios, implantes mamarios y fabricación de diferentes dispositivos quirúrgicos. En la actualidad, es posible fabricar implantes para cualquier parte del cuerpo humano, ya existen diferentes materiales que pueden ser empleados dependiendo del tejido que se va a reemplazar. Por ejemplo, el desarrollo de nuevos biomateriales como los andamios para la ingeniería de tejido que ayudan a mantener la función durante la regeneración y como plantilla en las interacciones celulares necesarias para la reparación del tejido. Hasta la fecha, se han diseñado y desarrollado una serie de biomateriales que se han sido aplicados con éxito en diferentes campos biomédicos como una alternativa potencial a los materiales tradicionales [10]–[12].

Los tipos básicos de biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos pueden clasificarse ampliamente como polímeros sintéticos, que incluyen materiales relativamente hidrófobos como el ácido  $\alpha$ -hidro, polianhídridos y otros; polímeros naturales, como azúcares complejos (hialuronato, quitosano); e inorgánicos (hidroxiapatita). También existen clasificaciones funcionales o estructurales, como son los hidrogeles, inyectables, modificados superficialmente, capaces de administrar fármacos, por aplicación específica, por mencionar algunos [13], [14].

En pocas palabras, un biomaterial es aquel que puede interactuar con el cuerpo humano sin generar una respuesta inmune denominada biocompatibilidad [15].

La biocompatibilidad, una de las características más importantes de los biomateriales, se define como "la capacidad de un biomaterial para realizar su función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables en el receptor o beneficiario de esa terapia, pero mientras tanto, genera el rendimiento clínicamente relevante más optimizado de esa terapia" o "la capacidad de un material para funcionar con una respuesta adecuada del huésped en una situación específica" [15], [16].

Los biomateriales deben cumplir con los criterios básicos de biocompatibilidad establecidos por la Organización Internacional de Normalización (ISO 10993). Deben ser no tóxicos, no trombogénicos, no cancerígenos, no antigénicos y no mutagénicos para exhibir una respuesta biológica apropiada [16].

## 3.2. Menisco

### 3.2.1 Anatomía del Menisco

El menisco es un tejido fibrocartilaginoso biomecánico complejo y vital en la articulación de la rodilla. Los meniscos son estructuras importantes, ya que tienen un papel participativo en la absorción de impactos, la lubricación articular y la congruencia articular [17], [18].

Como resultado de la gran cantidad de fuerza soportada por el menisco, con frecuencia está sujeto a desgarros y se desgasta con el tiempo. Los desgarros de menisco se han informado ampliamente como una de las lesiones de rodilla más recurrentes [19], [20].

Los meniscos (Figura 1) son dos estructuras fibrocartilaginosas, el menisco medial tiene un aspecto similar a una C en comparación con el menisco lateral que presenta un aspecto circular, están ubicados entre el fémur y la tibia en la articulación de la rodilla. Su papel es crucial en la distribución de la carga de contacto sobre las superficies articulares, estabilización de la rodilla. Además, los meniscos intervienen en la estabilización y lubricación de las articulaciones. Los desgarros del menisco son comunes y pueden afectar las actividades físicas que involucran la rodilla, y conducirán a la aparición de osteoartritis si no se tratan o reparan [21] [22].

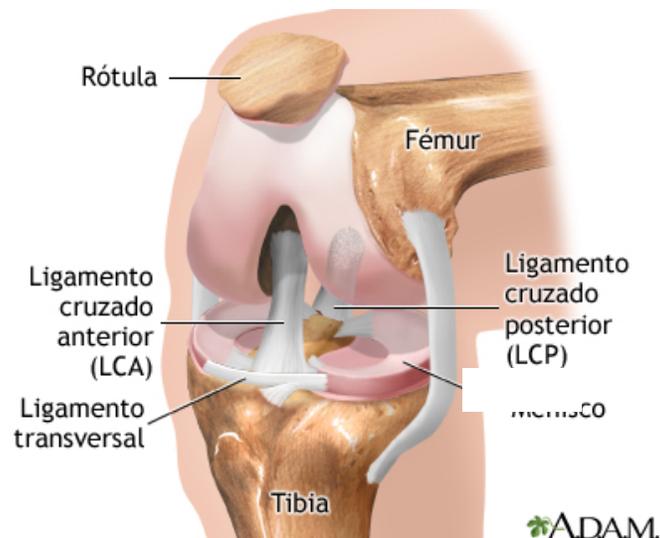


Figura 1 Anatomía de la rodilla [22].

Para absorber la carga articular, los meniscos no están firmemente fijados a lo largo de toda su estructura sobre la tibia y pueden seguir la traslación de la rodilla durante el movimiento [23]. Una red de ligamentos funciona en conjunto para estabilizar el menisco y la articulación de la rodilla durante las condiciones de carga experimentadas durante la extensión o flexión de la articulación [24] [25].

### 3.2.2 Composición del Menisco

El menisco está compuesto por aproximadamente un 70% de agua y un 30% de materia orgánica [26]. De la materia orgánica, el 75% es colágeno. Aunque el colágeno está presente en todo el menisco, prevalecen diferentes tipos en diferentes regiones. En la región roja del menisco, el colágeno tipo I es el principal colágeno presente mientras que, en la región blanca, tanto el colágeno tipo I como el II están en abundancia [27]. Otros colágenos presentes en el menisco son los tipos III, IV, V, VI y XVIII, pero en un grado mucho menor que los tipos I y II [28]. La porción externa del menisco es 80% de colágeno en peso seco y es casi exclusivamente de tipo I, con menos del 1% de otros tipos de colágeno. Por el contrario, la porción interna del menisco tiene un 70 % de colágeno en peso seco. De este colágeno, el 60% es tipo II y el 40% es tipo I. Por lo tanto, la porción externa del menisco es más fibrosa y la porción interna del menisco, que contiene colágeno tipo II, tiene algunas propiedades similares al cartílago hialino [29].

Como la fracción más grande de la matriz extracelular, el colágeno tiene un papel importante en la funcionalidad del menisco. Al ser una proteína fibrilar, el colágeno tipo I es capaz de conferir varios tipos de integridad mecánica en función de su organización estructural. La alineación de las fibras de colágeno en el menisco varía desde ser en su mayoría aleatoria dentro de las capas superficiales y laminares, hasta estar orientadas circunferencialmente en la capa profunda y con fibras de "unión" orientadas radialmente presentes en todas partes. Esta alineación permite que el menisco resista las tensiones circulares generadas por la carga normal del tejido [29].

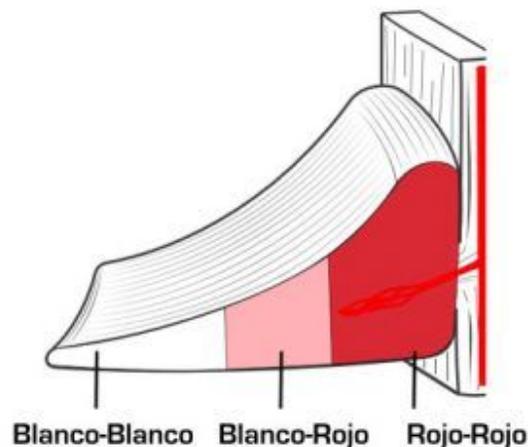


Figura 2 Ubicación de las tres regiones del menisco [30].

Si bien el menisco contiene vasos sanguíneos y nervios, estos solo se encuentran en la periferia del tejido y, por lo tanto, el menisco generalmente se considera en términos de dos regiones. La región vascularizada e inervada (roja) se ubica exclusivamente en la periferia externa, y la región no vascularizada (blanca) constituye la porción interna del tejido (Ver Figura 2) [22], [31]. Estas dos regiones están unidas por una región de transición llamada región roja-blanca, que exhibe propiedades tanto rojas como blancas. La capacidad

de auto reparación de una región se correlaciona directamente con la cantidad de vasculatura presente, dando a la región roja el mayor potencial regenerativo. Las regiones roja y blanca también difieren mucho en términos de contenido bioquímico, propiedades mecánicas y tipo de célula [29].

### ***3.2.3 Lesiones de Menisco y tratamientos asociados***

La rodilla es la articulación más vulnerable en una población joven y activa. En el 15 % de todas las lesiones de rodilla, uno de los meniscos está afectado [19]. Se estima que los pacientes con lesión del ligamento cruzado anterior (LCA) y desgarros de menisco tienen 2.5 veces más probabilidades de desarrollar osteoartritis (OA) y cuatro veces más probabilidades de someterse a una cirugía de artroplastia total de rodilla. Estas lesiones, que afectan a alrededor de 50 millones de personas solo en los EE. UU., tienen un alto costo socioeconómico y representan una carga significativa para la calidad de vida [32].

Durante la extensión de la rodilla, se estima que entre el 40% y el 60% de la fuerza ejercida se transmite directamente al menisco, aumentando hasta el 90% durante la flexión de la rodilla. La mayor parte de este aumento de carga afecta el asta posterior, que se encuentra entre los sitios de desgarro más comunes que se encuentran en el menisco medial [33] [34].

El daño meniscal afecta el equilibrio de la rodilla, contribuyendo progresivamente a la disrupción del cartílago hasta la osteoartritis (OA), responsable del dolor, la pérdida de la función articular y la morbilidad musculoesquelética [22].

Las lesiones meniscales se pueden clasificar según su causa. Los desgarros agudos o traumáticos resultan del movimiento forzado de la articulación de la rodilla, afectando un menisco sano, este tipo de lesión de rodilla se encuentran diagnosticadas con mayor frecuencia, con una incidencia anual de aproximadamente 61 por cada 100 000 personas. Ponerse en cuclillas y la flexión profunda de la rodilla es otro mecanismo común que puede conducir a la rotura de meniscos. Los atletas y los miembros del ejército tienen una alta frecuencia de desgarros de meniscos, y los miembros del servicio militar tienen diez veces más incidencia de desgarros en comparación con los civiles [19], [35]. De igual manera, existen desgarros verticales en dirección longitudinal y en dirección radial desde el borde medial hacia el borde lateral, o desgarros complejos que abarcan múltiples direcciones como se muestra en la Figura 3 [35].

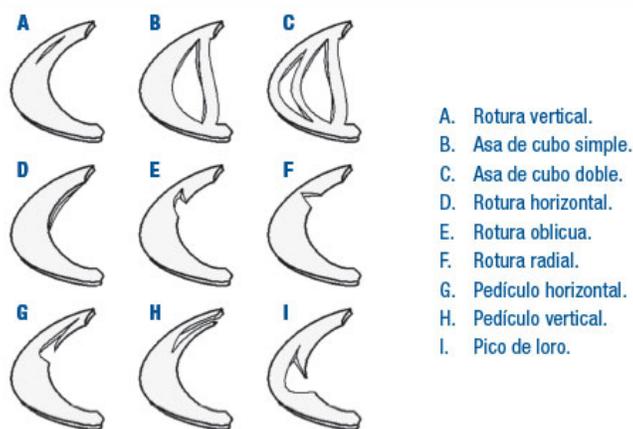


Figura 3 ilustración de diferentes desgarros de menisco [35].

Sin embargo, las lesiones meniscales también pueden surgir regularmente sin la presencia de un traumatismo en la rodilla. Estos desgarros degenerativos o crónicos son el resultado del deterioro de la calidad del tejido como parte del proceso natural de envejecimiento [19], [36].

La investigación sobre biomateriales e implantes artificiales como sustitutos en la reconstrucción y regeneración se ha convertido en un foco internacional de primer orden para solucionar problemas clínicos como la lesión meniscal irreparable, el síndrome posmeniscectomía, las lesiones osteocondrales y la OA crónica generalizada. La aplicación de estas opciones de tratamiento debe considerarse caso por caso, dependiendo de las características del paciente, como el tipo y la extensión de la lesión meniscal y/o cartilaginosa. Por el momento, las opciones de tratamiento son muy específicas y, en cada caso, se debe evaluar la alineación de la extremidad y, si es necesario, se corrige con una osteotomía, en donde se realiza de manera controlada una “fractura” de la tibia o el fémur y se estabiliza en su nueva posición para aliviar la presión, la carga, disminuir el dolor sobre la articulación de la rodilla o para restaurar la alineación de la extremidad, pero principalmente para lograr una carga equilibrada en el espacio articular tanto medial como lateral, así como un seguimiento rotuliano alineado [37], [38].

Los síntomas de una lesión meniscal van desde sensaciones de estallido, atrapamiento y chasquido, hinchazón y dolor con la flexión profunda de la rodilla. También se han descrito roturas de menisco asintomáticas, y se correlacionan con la osteoartritis [2], [35].

La resonancia magnética, que puede proporcionar una caracterización excelente de los tejidos blandos, es la base para el diagnóstico de roturas de menisco. Además, el estándar de oro para el diagnóstico de roturas de menisco es la observación directa con artroscopía [36], [39].

Anualmente se realizan más de 1 millón de intervenciones meniscales en los EE. UU. y aproximadamente 400 000 en Europa [40]. El manejo clínico y terapéutico de las lesiones meniscales ha cambiado drásticamente en las últimas décadas. Durante la década de 1970 se realizaba la extirpación completa del menisco, con efectos perjudiciales sobre la articulación

de la rodilla. La extirpación completa del menisco tiene repercusiones considerables para la articulación, conduce a un aumento de la tensión en la superficie articular que causa el deterioro del cartílago a largo plazo [21], [41].

Se estima que en México el 0.4% del PIB se destina a la atención de enfermedades musculoesqueléticas, y se considera a la osteoartritis como una de las causas principales de discapacidad a partir de los 40 años. Las enfermedades reumáticas llegan a disminuir hasta en siete los años saludables en hombres y en las mujeres la reducción llega a ser de hasta 13 años [24]. Se ha estimado que la prevalencia de osteoartritis en México es de 10.5%, es más frecuente en las mujeres (11.7%) que en los hombres (8.7%), aunque varía enormemente en las diferentes regiones del país [42].

Los aloinjertos son alternativas para sustituir el menisco de pacientes más jóvenes con rodilla menisectomizada, sin embargo, se ha logrado un éxito limitado con las opciones disponibles debido a varias limitaciones, como que la reparación solo es posible cuando el desgarramiento ocurre en el área vascularizada, que no cicatriza bien debido a la falta de suministro de sangre [43], [44]. Así mismo, las indicaciones recomendadas para un trasplante de menisco son: pacientes jóvenes no mayores a 50 años, articulación estable, y un daño osteocondral donde no se presente ulceración con exposición ósea. Es importante mencionar, que la medición exacta del aloinjerto se considera el factor técnico más crítico para lograr el éxito clínico. La tolerancia de la rodilla para la incongruencia en las medidas del aloinjerto no se comprende totalmente, aunque se estima que existe un nivel aceptable es de 5% de discrepancia. Otro factor a tomar en cuenta es la poca disponibilidad de donadores, por lo que el trasplante se limita al número de tejidos disponibles [45].

Aunque los aloinjertos tienen resultados clínicos aceptables, los exámenes a largo plazo revelaron efectos protectores discutibles para el cartílago [38], además de que precisan de inmunosupresión para ser viables, tienen mayor posibilidad de transmitir enfermedades [45], presentan dificultades para remodelarse y carecen de la resistencia adecuada [46]. En consecuencia, los aloinjertos no pueden ser una cura absoluta para el dolor posmenisectomía [44].

Como alternativa a un aloinjerto meniscal, que sólo está indicado para el menisco severamente dañado, la mayoría de los pacientes pueden ser tratados hoy en día mediante la implantación de un sustituto meniscal sintético [19]. Se han estudiado diversos andamios de biomateriales diferentes como una forma de reparar el cartílago articular dañado debido a la OA. Por ejemplo, los andamios de hidrogel hechos de colágeno promueven la formación de cartílago al encapsular células e imitar el tejido nativo. La conservación de la estructura y la secuencia de colágeno entre especies ha facilitado la aplicación biomédica de colágeno de muchas fuentes diferentes [47], [48].

Si bien, existen prótesis de menisco, estas resultan incómodas para el paciente lo cual no soluciona la problemática. El implante ideal debe ser "personalizado, hecho a la medida o específico para el paciente" para recuperar al máximo la función de la articulación de la rodilla. La ingeniería de tejidos, cuyo objetivo es regenerar el tejido dañado, ofrece una estrategia potencial para el reemplazo de menisco usando hidrogeles con polímeros naturales

biocompatibles con el cuerpo humano para impresión 3D [49]. Sin embargo, una de sus características negativas es que no cuentan con las propiedades mecánicas necesarias para reemplazar el menisco y, estudios han demostrado una rápida degeneración. Es por ello por lo que estos materiales siguen en estudio para poder solucionar las desventajas que actualmente presentan.

### ***3.3 Hidrogel***

Los hidrogeles son materiales poliméricos hinchados que retienen al menos 10% de su peso en agua con un contenido de agua y que mantienen una estructura tridimensional distintiva (3D) [50], la cual tiene la capacidad de retener grandes cantidades de agua hinchándose y aumentando considerablemente su volumen sin perder su forma hasta alcanzar su máximo grado de hidratación o índice de hinchamiento, son capaces de encapsular células o moléculas bioactivas y presenta facilidad para transferir nutrientes [51], [52]. El proceso de obtención del hidrogel determina la capacidad de hinchamiento que este tendrá, dado que los espacios que se establezcan entre las redes poliméricas flexibles que se formen en dicho proceso determinará la cantidad de agua que el hidrogel pueda albergar [53].

En estado seco el gel es un material sólido y duro, pero cuando entra en contacto con una solución acuosa, esta se difunde hacia el interior y el gel se hincha hasta alcanzar un equilibrio fisicoquímico. La difusión incluye la migración de agua en los espacios preexistentes o dinámicamente formados entre las cadenas del hidrogel [52].

Los hidrogeles obtenidos a partir de polímeros naturales presentan una mayor biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad y por tanto se utilizan más que los polímeros sintéticos y presentan muchas ventajas para distintas aplicaciones biomédicas. En función del polímero natural que se emplee, el hidrogel presentará propiedades características de resistencia mecánica, tasa de degradación y grado de hinchado. Además, estas propiedades se pueden variar modificando los polímeros [54].

La clasificación de los hidrogeles puede basarse en la fuente:

- Geles naturales o sintéticos, sobre la naturaleza de la reticulación
- Geles covalentes o físicos; sobre la naturaleza de la red
- Redes de homopolímeros, redes de copolímeros, redes interpenetrantes o redes dobles
- Sobre la presencia de poros: hidrogeles homogéneos (ópticamente transparentes), hidrogeles microporosos y macroporosos
- Sobre su destino en un organismo: hidrogeles degradables y no degradables [50].

Los hidrogeles se pueden clasificar también en hidrogeles físicos y químicos en función de su mecanismo de reticulación [6], [55]. Los entrecruzamientos físicos incluyen cadenas entrelazadas, enlaces de hidrógeno, interacción hidrofóbica y formación de cristalitas. Si bien estos enlaces cruzados físicos pueden no ser uniones permanentes, son suficientes para evitar que el hidrogel se disuelva en un medio acuoso. Los enlaces cruzados

químicos (o covalentes), por otro lado, son uniones permanentes formadas por enlaces covalentes. Una forma común de crear una red entrecruzada covalentemente es polimerizar macrómeros funcionalizados en los extremos [56]. Las redes de hidrogel pueden incluir uniones permanentes y uniones semipermanentes como enredos de cadenas. El tipo y grado de reticulación influye en muchas de las propiedades de la red, como las propiedades de hinchamiento, el módulo de elasticidad y el transporte de moléculas [57].

Los hidrogeles se asemejan a la matriz extracelular (MEC) de los tejidos biológicos, que se compone principalmente de agua, electrolitos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) como fase fluida y colágeno principalmente tipo II, ácido hialurónico, elastina y proteínas como glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos como fase sólida [58]. Sin embargo, a diferencia de la MEC natural que puede soportar grandes deformaciones y cargas, los hidrogeles de red única covalentes clásicos (Ver Figura 4) son mecánicamente débiles, lo que los hace inadecuados para la mayoría de las situaciones fisiológicas de carga. Se han utilizado muchos enfoques para mejorar la dureza de los hidrogeles, por ejemplo, enlaces no covalentes (por ejemplo, enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas), hidrogeles endurecidos, hidrogeles con redes altamente estirables y doble hidrogeles de red (DN) [59].

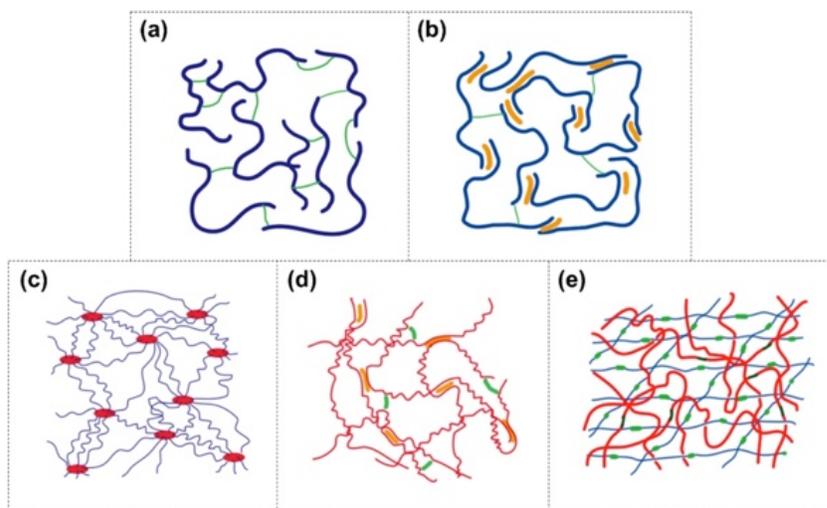


Figura 4 Esquema de (a) el hidrogel de red simple covalente clásico, (b) hidrogel de doble reticulación, (c) hidrogel de nanocompuesto intercalado con polímero, (d) hidrogel con segmentos similares a elastómeros y no (c) hidrogel de nanocompuesto intercalado con polímero, (d) hidrogel con segmentos similares a elastómeros y enlaces covalentes, y (e) hidrogel de doble red (DN) [60].

### 3.3.1 Polímeros naturales (Biopolímeros)

Los polímeros naturales se han utilizado para fabricar hidrogeles naturales como andamios para la ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad inherente y funciones biológicas críticas. Hay cuatro tipos principales de polímeros naturales, que incluyen:

- Proteínas, como colágeno, gelatina, fibrina, seda, lisozima, Matrigel™ y proteínas modificadas genéticamente, como calmodulina (una proteína que se une al calcio), polipéptidos similares a la elastina y cremallera de leucina;

- Polisacáridos, como ácido hialurónico (HA), agarosa, dextrano y quitosano;
- Polímeros híbridos de proteína/polisacárido, como colágeno/HA, laminina/celulosa, gelatina/quitosano y fibrina/alginato;
- ADN [51], [61].

### ***3.4 Propuesta de trabajo: Materiales que componen al hidrogel***

Como ya fue mencionado, en la actualidad una de las tecnologías más utilizadas para la ingeniería de tejido, son las impresoras 3D, es por ello que al querer utilizar hidrogeles, los componentes no sólo deben tener características parecidas con el tejido a replicar, sino también se deben contemplar algunas propiedades para que puedan ser capaces de ser extruidos. Los hidrogeles basados en polímeros naturales más usados en impresión 3D son colágeno, agarosa, alginato y quitosano [62]. Así mismo, se busca que el material tenga propiedades antibacterianas para evitar o disminuir el riesgo de infección después de ser implantado en el cuerpo humano [63], así como mejorar las propiedades mecánicas del menisco. Algunos de estos hidrogeles se conforman de polímeros naturales como fibrina, gelatina (gelatin), alginato, quitosano o sulfato de condroitina [64].

La propuesta de trabajo de este proyecto consta en adicionar Ag NPs, colágeno, ácido hialurónico y quitosano para conferir propiedades viscoelásticas y antibacterianas al hidrogel. Actualmente, pocos son los estudios que consideran la adición de los 4 materiales mencionados para síntesis de hidrogel para impresión 3D de prótesis de menisco.

#### ***3.4.1 Nanopartículas de Plata (Ag NPs)***

Las propiedades de las nanopartículas de plata constituyen también un campo de investigación de gran relevancia. Principalmente se basan en sus propiedades antimicrobianas, aunque existen también estudios sobre propiedades antivirales, fungicidas o de cicatrización [65]. Así mismo, las Ag NPs han mostrado una amplia gama de aplicaciones en medicina, energías renovables y remediación ambiental debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, térmicas y biológicas únicas [7], [66].

En la escala nanométrica, la plata presenta inusuales propiedades físicas, químicas y biológicas [67]. Sin duda, una de las características más notables de las Ag NPs es su propiedad antimicrobiana. La plata es bien conocida por su efecto inhibitorio sobre muchos microorganismos comúnmente presentes en procesos médicos e industriales. La propiedad antimicrobiana de la plata mejora enormemente si la plata se transforma en una nanopartícula [68].

La síntesis de nanopartículas metálicas en disolución, requiere de un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante; sin embargo, no se requiere agregar un agente estabilizante cuando es usado ácido ascórbico como agente reductor, citrato o NaBH<sub>4</sub> [69]. La oxidación de las Ag NPs formadas no es termodinámicamente favorable debido al alto

potencial de reducción de la plata. El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas: Nucleación y crecimiento, como se muestra en la Figura 5 [69].

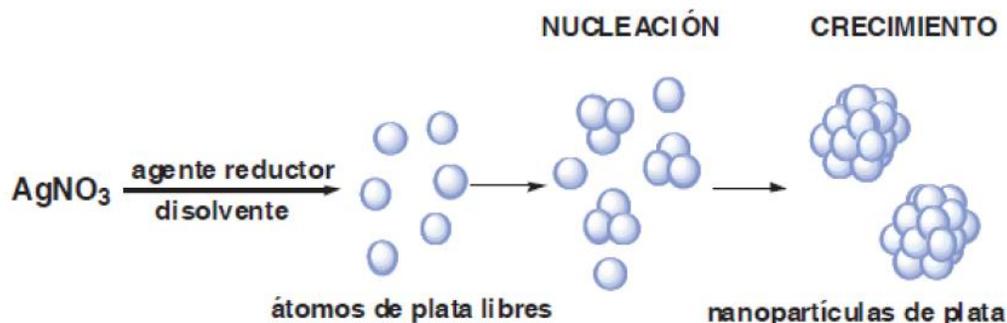


Figura 5 Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción de nitrato de plata [69].

### 3.4.2 Colágeno

Hay cualidades importantes que deben tenerse en cuenta al elegir un material adecuado para aplicaciones de regeneración de la piel apósitos para heridas. Los biomateriales que se emplean originalmente en el campo de la biomedicina incluyen cerámica y metales debido a su efecto no inmunogénico, pero se ha informado que materiales como los polímeros son apropiados debido a sus interesantes propiedades [70]. Los biopolímeros pueden interactuar con las células, estimulando la formación de nuevos tejidos y promoviendo la regeneración [71].

El colágeno es uno de los biopolímeros que a menudo se emplea en la regeneración de la piel y la cicatrización de heridas debido a sus diversas características atractivas, su estructura molecular del colágeno se presenta en la Figura 6 [72]. El colágeno es una macromolécula simple compuesta principalmente de glicina, prolina e hidroxiprolina, siendo su fórmula química  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NOC}_5\text{H}_9\text{NOC}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2$ .

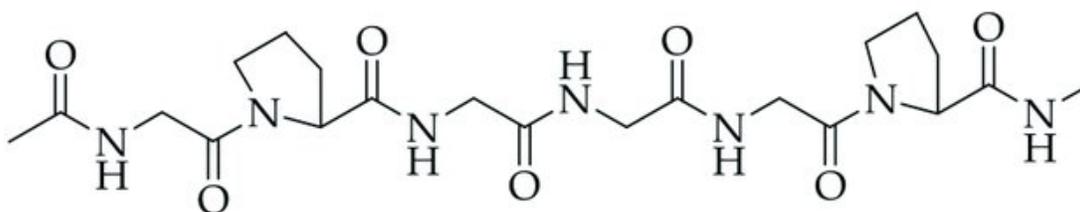


Figura 6 Estructura química del colágeno [72].

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano (representa el 25% de la proteína corporal total) y es más abundante en los tejidos conectivos fuertes y resistentes (Figura 7).

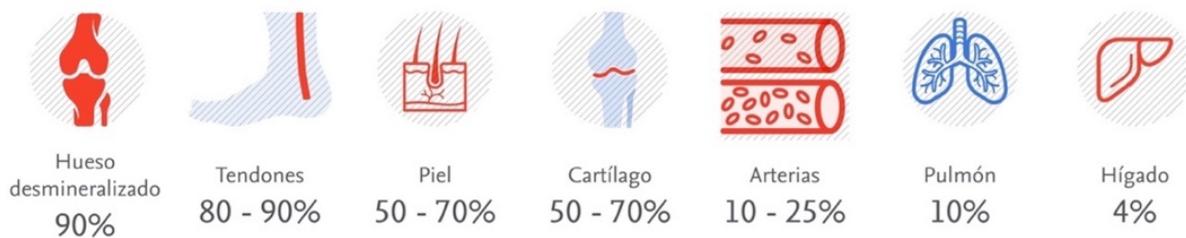


Figura 7 Contenido aproximado de colágeno en diferentes tejidos (Porcentaje de peso seco) [73].

El ser humano tiene 28 colágenos diferentes (Tabla 1) y 42 genes que codifican cadenas de colágeno. Algunos de los colágenos más abundantes forman fibrillas; otros forman extensas redes o tienen funciones más especializadas [73].

El colágeno tipo II es uno de los principales tejidos conectivos del cuerpo, proporcionando flexibilidad y apoyo a las articulaciones de los huesos, también es uno de los principales componentes de la matriz extracelular del cartílago articular y constituye del 90% al 95% del contenido total de proteínas en el cartílago [74].

Está bien establecido que el colágeno tipo II es el principal componente de colágeno del cartílago hialino, que se destruye en la OA [75][76]. Se ha demostrado que el colágeno tipo II glicosilado no desnaturalizado (en lo sucesivo, colágeno tipo II) es eficaz para aliviar el dolor asociado con la artritis en humanos. En la OA, el colágeno tipo II puede promover una reducción de la inflamación porque reacciona con el sistema inmunitario del cuerpo para mejorar los signos y síntomas incapacitantes de la artritis. [62].

En particular, los materiales a base de colágeno son una alternativa en el diseño de sistemas para favorecer la curación de heridas cutáneas. Esto, en parte debido a que es un biopolímero biocompatible y biodegradable [77], [78].

Tabla 1 Composición, características y distribución en tejidos del colágeno[77]

Tipo	Características estructurales más comunes	Distribución en tejidos
I	67 nm-fibrillas con bandas	Tipo más abundante, en la mayoría de los tejidos conectivos
II	67 nm-fibrillas con bandas	Cartílago, humor vítreo
III	67 nm-fibrillas con bandas	Tejidos fetales, piel, sangre, vasos sanguíneos, pulmones, útero, intestino, tendones, cicatrices recientes
IV	Dominio globular C-terminal; forma una red ramificada	Todas las membranas basales
V	67 nm-fibrillas con bandas	Mayoría de los tejidos, componente secundario asociado a colágeno de tipo I
VI	Dominios C- y N-terminales globulares; forma una red	Mayoría de los tejidos, incluyendo el cartílago
VII	Forma fibrillas de anclaje	Debajo de las membranas basales en la dermis y en la vejiga
VIII	Hélice corta, dominios terminales globulares, forma una red	Formado por células endoteliales, en la membrana de Descemet
IX	Con dermatán sulfato unido	Sobre la superficie de las fibrillas de colágeno de tipo II en el cartílago
X	Similar al tipo VIII	Cartílago en calcificación
XI	67 nm-fibrillas con bandas	Cartílago
XII	Múltiples dominios globulares	Sobre la superficie de las fibrillas de colágeno de tipo I
XIII	Con dominio transmembrana	Colágeno minoritario en la piel, intestino
XIV	Asociado con fibrillas	Igual que el tipo XII
XV	Múltiples dominios de triple hélice con interrupciones	Capilares, testículos, riñón, corazón
XVI	Asociado con fibrillas de colágeno	Dermis, riñón
XVII	Con dominio transmembrana	Hemidesmosomas de la piel
XVIII	Múltiples dominios de triple hélice con interrupciones	Hígado, riñón, músculo esquelético
XIX	En la superficie de las fibrillas de colágeno	En la membrana basal

### 3.4.3 Ácido Hialurónico

El ácido hialurónico es un biopolímero alternado de carga lineal cuya estructura molecular se basa en una unidad de repetición de disacáridos de  $\beta(1 \rightarrow 4)$  D- glucurónico (GlcA) y  $\beta(1 \rightarrow 3)$  N - acetil - D - glucosamina (GlcNAc), la estructura se muestra en la Figura 8.

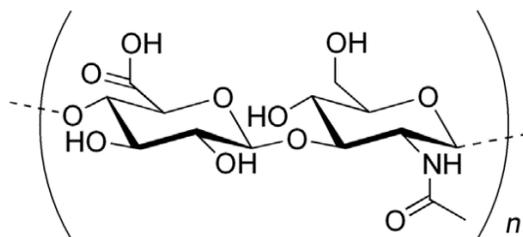


Figura 8 Estructura química del ácido hialurónico [79].

El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano natural y un componente importante de la matriz extracelular. Se encuentra dentro del tejido cerebral, el cartílago hialino y el líquido articular sinovial [79], [80]. Es considerado uno de los mejores polisacáridos basados

en biomateriales utilizados para el tratamiento de heridas en particular, debido a sus propiedades viscoelásticas, biocompatibilidad, biodegradabilidad y características físicoquímicas atípicas. Debido a que es de origen natural, se puede distribuir ampliamente a través de los tejidos conectivos, epitelios, tejidos neurales y líquidos sinoviales. También es altamente soluble en agua y más hidrofílico que cualquier otro polímero natural, por lo tanto, tiene un papel importante en la eliminación de muchos exudados de heridas, mejorando también la posibilidad de cicatrización de heridas [81]. Todas estas propiedades de los hidrogeles derivados de ácido hialurónico los convierten en biomateriales ideales para ingeniería de tejido [82].

Estudios sugirieren que agregar ácido hialurónico al hidrogel a base de biopolímeros puede aumentar su contenido de humedad y mejorar la capacidad de absorción de líquidos [9], debido al fuerte carácter hidrofílico y su alto peso molecular en las células biológicas que podrían absorber una gran cantidad de agua hasta 1000 veces su volumen, el ácido hialurónico desempeña importantes funciones estructurales y funcionales en el cuerpo [82].

Los derivados de ácido hialurónico se han utilizado en andamios para ingeniería de tejido, en cirugía de tejidos blandos como el aumento de las cuerdas vocales, administración de fármacos, administración intracelular de ARN de interferencia pequeño, cicatrización de heridas y como dispositivo en muchos procedimientos quirúrgicos [83].

### 3.4.4 Quitosano

El quitosano es un copolímero obtenido a través de la desacetilación de los grupos acetamida de la quitina, que se origina a partir del exoesqueleto de los crustáceos [84], donde los grupos D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-D-Glicosamina (GlcNAC) de la quitina dan como resultado la formación de este copolímero de unidades de  $\beta$ -(1,4)-D-glucosamina y  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina (Ver Figura 9) [85]. Este copolímero destaca por tener potencial bactericida, fungicida y de bioactividad, que, junto con sus interacciones específicas con los componentes de la matriz extracelular y los factores de crecimiento celular, le confieren una alta empleabilidad en una amplia gama de áreas científicas [86].

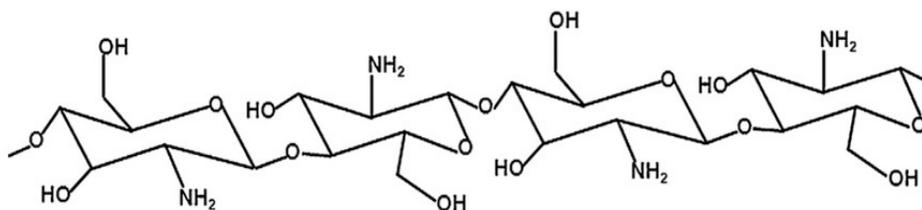


Figura 9 Estructura química del quitosano [86].

Este polímero es soluble en soluciones diluidas de ácidos orgánicos, por ejemplo: ácido acético, ácido fórmico, alcoholes y glicerol. Puede disolverse también en algunas soluciones diluidas de inorgánicos, por ejemplo: ácido clorhídrico. El quitosano no se disuelve en una solución de soluciones alcalinas y neutras [87].

La ventaja de este biomaterial son tales que pueden procesarse fácilmente en diferentes formas, como membranas, esponjas, geles, andamios, micropartículas, nanopartículas y nanofibras para una variedad de aplicaciones biomédicas, como administración de fármacos, terapia génica, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas [85].

### ***3.4.5 Colágeno, ácido hialurónico y quitosano***

El colágeno, ácido hialurónico y quitosano al interactuar juntos, tiene propiedades de coagulación y compatibilidad celular. Esta mezcla permite obtener nuevos materiales, en las que las interacciones intermoleculares entre los componentes se producen principalmente por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas [81].

En 2016, un estudio de Sionkowska et al. [79] utilizando mezclas de quitosano y colágeno con la adición de ácido hialurónico, un polisacárido glucosaminoglicano presente en la matriz extracelular de la piel, el tejido conectivo obtuvo resultados prometedores ya que la adición de ácido hialurónico al biomaterial formado por quitosano y colágeno aumentó la estabilidad térmica, la elasticidad, facilitó proliferación y sirvió como base para la regeneración de tejidos, principalmente tejidos cartilagosos [85], [87].

## ***3.5 Ingeniería de tejido***

El concepto de ingeniería de tejido fue descrita por primera vez en los años 90 por Langer y Vacanti (1993) como la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y de las ciencias de la vida para comprender la relación entre la estructura y la función de los tejidos mamíferos normales y patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos [61]. Las estrategias basadas en ingeniería tisular implican el uso de estructuras tridimensionales en las que se encapsulan un gran número de células para proporcionar un soporte mecánico biocompatible con el crecimiento celular y el desarrollo del tejido sano [54], [88], [89]. Por ello, la ingeniería de tejidos es un campo importante de la medicina regenerativa ya que combina andamios y trasplante de células para desarrollar tejidos sustitutos y/o promover la regeneración de tejidos [90].

Otras aplicaciones en la ingeniería de tejidos incluyen la generación de sustratos biocompatibles y biodegradables para cultivos celulares *in vitro*, la producción de matrices de hidrogel para la cicatrización de heridas y aplicaciones hemostáticas [8][91].

### ***3.5.1 Ingeniería de tejidos de cartílago***

El cartílago articular, un tejido avascular y linfático, se compone principalmente de condrocitos y matriz extracelular. Proporciona una superficie lubricante que puede soportar

cargas elevadas durante mucho tiempo. Esto permite transferir la mínima presión a los huesos subcondrales subyacentes, y absorber las vibraciones, reduce la fricción articular y favorece el movimiento articular durante el movimiento de nuestro cuerpo [92]. En la actualidad, con el aumento del número de traumatismos deportivos y el envejecimiento acelerado de la población, la degeneración del cartílago se ha convertido en un problema común en la clínica de ortopedia. Sin embargo, la auto reparación del tejido cartilaginoso está limitada debido a su baja actividad de condrocitos y falta de vascularización [93]. Además, el proceso de regeneración del cartílago fabrica un tejido fibrocartílago, que no es lo mismo que el tejido nativo en cuanto a propiedades mecánicas y biológicas [92]. Por lo tanto, la reparación del cartílago articular sigue siendo un gran desafío para los médicos e investigadores.

La ingeniería de tejidos de cartílago puede ser un enfoque aceptable para el tratamiento del cartílago. El principal problema que debe resolverse en la ingeniería de tejidos de cartílago es que las propiedades mecánicas del andamio no coinciden con las del cartílago natural, por lo tanto, es necesario diseñar un andamio apropiado para que coincida con la caracterización mecánica y de biocompatibilidad con los tejidos nativos [94].

La combinación de nanomateriales rígidos y cadenas poliméricas blandas puede mejorar en gran medida las propiedades mecánicas de los hidrogeles híbridos, como la resistencia a la compresión, el módulo elástico y el módulo de almacenamiento, etc. Por lo tanto, los hidrogeles nanocompuestos se han estudiado ampliamente en la ingeniería de tejidos de cartílago. Los andamios de polímeros naturales como el ácido hialurónico, el colágeno y la gelatina como sustitutos de tejidos se desarrollan rápidamente en el campo de la reparación del cartílago [93], [95].

En la ingeniería tisular del cartílago, se debe prestar atención a la caracterización del andamio para cumplir con estándares tales como biocompatibilidad, propiedades mecánicas similares a las del tejido nativo, tasas de degradación controlables, capacidad de encapsulación celular, administración de fármacos y genes, fácil manejo, el potencial osteoconductor y una buena flexibilidad [92], [96].

### ***3.6 Bioimpresión 3D***

La impresión 3D hace referencia a todas aquellas tecnologías que utilizan un proceso de unión de materiales, generalmente mediante el proceso capa tras capa, con la finalidad de hacer objetos a partir de datos descritos en un modelo 3D digital. Básicamente lo que se hace es adaptar los procesos de impresión, empleando un tipo de boquillas especiales y una biotinta realizada con material biológico en lugar de los filamentos plásticos típicos [97].

El objetivo principal de la bioimpresión es replicar el tejido y el material exactos, para su posterior trasplante en seres humanos. Una de las principales ventajas es el empleo de las células del paciente para llevar a cabo todo el proceso. Gracias a estas células se puede imprimir tejidos y órganos personalizados a las necesidades de cada paciente [98], [99].

Los desafíos de diseñar un menisco artificial incluyen imitar la estructura compleja del menisco con características individualizadas y lograr un rendimiento mecánico superior para imitar el menisco natural (p. ej., alta resistencia a la compresión, resistencia a la tracción, tenacidad, absorción de impactos y baja fricción). La tecnología de bioimpresión 3D emergente puede construir una estructura de forma libre [15][100].

La bioimpresión 3D tiene el potencial de transformar el campo de la medicina regenerativa, ya que permite la creación de patrones espaciales precisos de biomateriales, células y biomoléculas para producir tejidos de ingeniería mediante la adición de capas sucesivas de materiales, lo que ofrece una alta fidelidad geométrica, complejidad estructural y flexibilidad de diseño. Por lo tanto, permite la fabricación de menisco específico del paciente. Aunque se han desarrollado numerosas estrategias de ingeniería de tejidos para la reparación de meniscos, el campo aún tiene que realizar un implante capaz de regenerar completamente el tejido [101].

## **4 HIPOTESIS**

- La adición de colágeno, ácido hialurónico y quitosano favorecerá las propiedades reológicas, mecánicas, viscoelásticas y *swelling* del hidrogel, mientras que al añadir Ag NPs se presentará una mejoría en las propiedades antibacterianas. Siendo un hidrogel apto para impresión 3D.

## **5 OBJETIVO GENERAL**

Sintetizar bio-tinta basada en hidrogel con Ag NPs, colágeno y ácido hialurónico, caracterizar y comparar sus propiedades estructurales, viscoelásticas y antibacterianas optimizadas, para utilizarse en impresión 3D de prótesis de menisco.

### **6.1 Objetivos específicos**

- Sintetizar las Ag NPs
- Caracterizar las Ag NPs mediante las técnicas de espectroscopía de UV-Vis, DLS, Potencial Z y SEM.
- Sintetizar el hidrogel incorporando las Ag NPs, ácido hialurónico y colágeno.
- Sintetizar el hidrogel sin Ag NPs
- Caracterizar el hidrogel por medio de Swelling (hinchamiento), FTIR-ATR, reología y realizar pruebas antimicrobianas.
- Realizar impresión 3D (utilizando hidrogel sintetizado como bio-tinta).

## 6 METODOLOGÍA

La metodología está compuesta de 4 etapas: síntesis de Ag NPs, síntesis de hidrogel, caracterización de Ag NPs y polimerización de hidrogel.

### 6.1 Síntesis de Ag NPs

El proceso de síntesis de las Ag NPs fue basada en el método seguido por Yaqiong Qinse et al para Ag NPs de 20nm [102], el cual es descrito en la Figura 10.

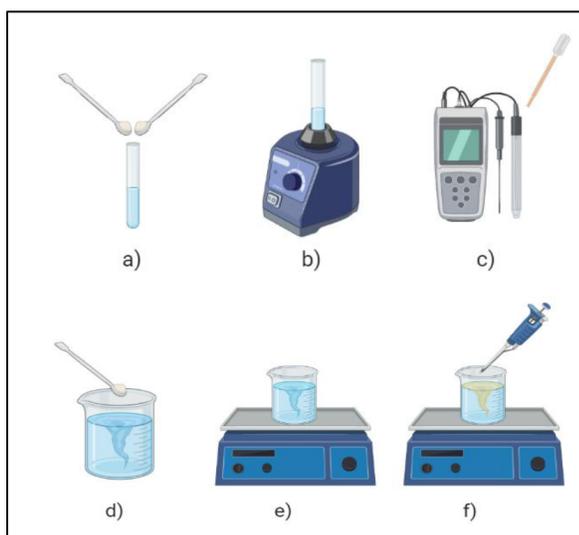


Figura 10 a-c) Preparación de agente reductor y estabilizador, d) Preparación de precursor metálico, e-f) Reducción, nucleación y crecimiento de Ag NPs [102] (Creado con BioRender.com)

- Se preparó una disolución de citrato de sodio (estabilizador) y ácido ascórbico (reductor) en 15 ml de agua desionizada, obteniendo la solución 1 (Sol. 1).
- La Sol. 1 se llevó a agitación en vortex durante 1 minuto.
- Se ajustó el pH de la Sol. 1 a 10.5 con hidróxido de sodio (NaOH) a 1 molar para obtener Ag NPs de 20nm [102].
- Posteriormente se preparó el precursor metálico a 0.1 molar, utilizando nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en 5 ml agua desionizada, generando la solución 2 (Sol 2).
- La Sol 1 se llevó a proceso de agitación magnética (900 RPM) y temperatura gradual hasta llegar a 35 °C.
- Al llegar la Sol. 1 a 35 °C se adicionó la solución de  $\text{AgNO}_3$ . Al instante que se agregó la Sol 2. Se notó un cambio de coloración a amarillo turbio, lo que indica la formación de plata metálica [102].

## 6.2 Síntesis de Hidrogel

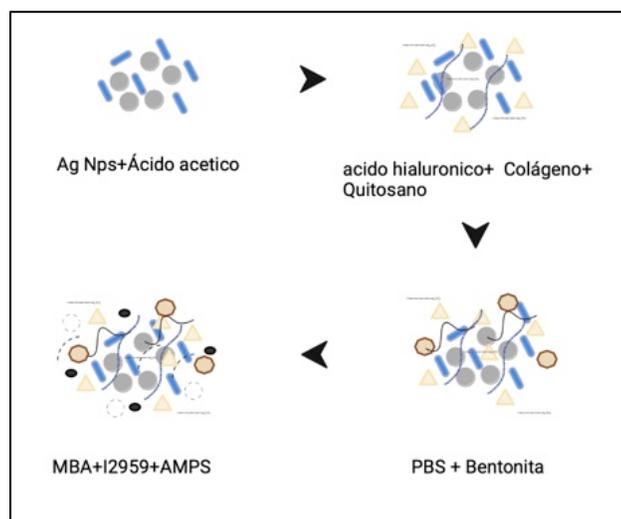


Figura 11 Proceso de síntesis de Hidrogel (Creado con BioRender.com)

La síntesis del hidrogel fue basada en el método seguido por Feichen Yang et al [103]. Los pasos seguidos para la síntesis se muestran en la Figura 11. Bajo agitación mecánica se dispersó la solución de Ag NPs en 11  $\mu$ l de ácido acético, posteriormente se adicionaron 0.5 ml de ácido hialurónico (*Hyaluronic acid Sodium salt from streptococcus equi*), 0.1ml de colágeno (*collagen type I solution from rat tail*), 500mg de quitosano y 1.5ml de PBS (Solución Salina Amortiguada por Fosfatos). Después de 5 minutos de agitación mecánica se agregan 100 mg de bentonita y 3.0 ml de PBS. Por último, se añaden 0.66mg de crosslinker MBA(*N,N'methylenbus(acrylamide)*), 0.66mg de fotoiniciador I2959 (*2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone*) en forma de hilo, 0.665 ml de monómero AMPS (Sodium 2-acrylamide-2-methylpropanesulfonate) gota a gota y 1.5ml de PBS. La solución se dejó en agitación mecánica durante 30 minutos.

## 6.3 Polimerización del hidrogel

Una vez preparado el hidrogel, se elaboró la pieza deseada utilizando moldes de 1cm de diámetro. Posteriormente fue polimerizada por medio de luz ultravioleta a diferentes tiempos (24 y 48 horas) como se muestra en la Figura 12. Debido a la naturaleza de los monómeros y crosslinker utilizados la polimerización que se lleva a cabo es por medio de radicales libres. Por lo que las cadenas poliméricas se forman al romperse los enlaces dobles del carbono para ir uniendo los monómeros.

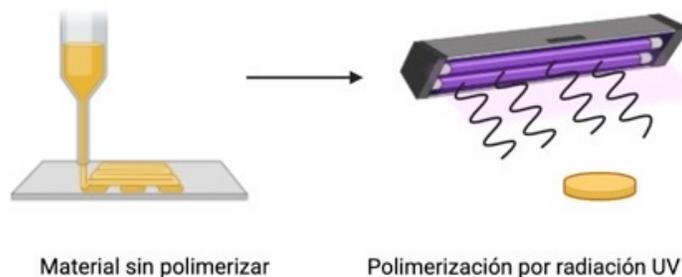


Figura 12 Procedimiento de elaboración y polimerización de pieza. (Creado con BioRender.com)

Los hidrogeles preparados para ser caracterizados presentaron variaciones exclusivamente en las cantidades adicionadas de Ag NPs como se puede ver en la Tabla 2, las cuales fueron  $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $20 \mu\text{g/ml}$  y  $40 \mu\text{g/ml}$ , mientras que las concentraciones de ácido hialurónico y colágeno se mantienen. El rango de Ag NPs utilizado ayudará a ver los beneficios antibacterianos al contener una menor o mayor concentración de Ag NPs en los hidrogeles sintetizados.

Tabla 2 Cantidades utilizadas en hidrogeles sintetizados

Síntesis	Ácido Hialurónico [ml]	Colágeno [ml]	Quitosano [mg]	Ag NPs [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<b>1 (Control)</b>	0.5	0.1	500	0
<b>2</b>	0.5	0.1	500	1
<b>3</b>	0.5	0.1	500	10
<b>4</b>	0.5	0.1	500	20
<b>5</b>	0.5	0.1	500	40

La síntesis control sirve para comparar las propiedades antimicrobianas de las Ag NPs.

## 7 CARACTERIZACIONES Ag NPs

### 7.1 Espectroscopía UV-Vis

Las Ag NPs tienen un plasmón característico con un máximo entre los 400-430 nm, en el espectro de la luz. Estas fueron caracterizadas utilizando el equipo AVASpec ULS4096 de Avantes, con fuente de luz Avaligth DHS el que cuenta con una cámara de reacción con agitación y temperatura controlada, (ver Figura 13). Se utilizó un sonicador para redispersar la muestra de Ag NPs antes de realizar la disolución y posteriormente, en un rango de longitud de onda de 180-1100 nm se hicieron mediciones de absorción.



Figura 13 Espectrómetro UV-Vis AVASpec ULS4096 de Avantes.

## ***7.2 Microscopía electrónica de barrido de transmisión***

La caracterización de las Ag NPs se realizó en un Microscopio Electrónico de barrido de Trasmisión JEM-JEOL-2100, con un vacío de 1-6 Pa, las mediciones se llevaron a cabo con una aceleración de haz de electrones entre 30 y 40 kV, corriente de 0.17 nA. Para la preparación de la muestra, las Ag NPs se sonicaron durante 30 minutos y se depositó posteriormente una gota de 10  $\mu\text{l}$  en una rejilla de cobre con recubrimiento de carbón 300 mesh, se dejó secar durante un día previo a su caracterización.

## ***7.3 DLS y Potencial Z***

Las mediciones se realizaron utilizando el equipo de dispersión dinámica de luz de marca Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS que se puede observar en la Figura 14, mediante el cual se realizó el análisis para conocer el diámetro hidrodinámico y la medición de la carga superficial de las nanopartículas obtenidas. Previo a la medición se hizo uso de un sonicador para redispersar las nanopartículas y obtener óptimos resultados.



Figura 14 Equipo Malvern modelo Zetasizer Nano ZS

## 8 CARACTERIZACIONES HIDROGEL

### 8.1 Polimerización y Swelling

Una vez sintetizado el hidrogel, por medio de impresión 3D, se elaboró la pieza deseada para luego ser polimerizada por medio de luz ultravioleta. Una lámpara UV (de longitud de onda de 365nm) de 8 W de potencia se ubicó a una distancia de 4 cm de la muestra. (Figura 15).



Figura 15 Proceso del material para realizar swelling creado con BioRender.com

Para las pruebas de *Swelling* o hinchamiento las muestras se polimerizaron en moldes cilíndricos de 1 cm de diámetro y 0.5 cm de altura. Se llevaron a cabo procesos de polimerización del material de 24, 48 y 72 horas. Para cada hidrogel se polimerizaron 3 muestras cada una correspondiente a un periodo de tiempo distinto, además cada muestra se pesó en su estado seco y luego se introdujeron en recipientes separados, los cuales contenían 20 ml de PBS a una temperatura controlada dentro de un horno a 37°C. Cada muestra se mantuvo un tiempo diferente en PBS (en un rango desde 30 minutos hasta 264 horas) al culminar los tiempos establecidos se volvieron a pesar.

### 8.2 Espectroscopía FTIR

Se secaron hidrogeles en moldes en forma de discos durante diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas). La muestra de tiempo 0 no se polimerizó, se dejó durante 48 horas a temperatura ambiente para secarlo por completo, obteniendo así muestras sin polimerizar. Por otra parte, hidrogeles fueron expuestos a luz UV durante 24 horas con el fin de realizar caracterizaciones de espectroscopía FTIR-ATR a distintos tiempos de polimerización (0 y 24 horas). Para el análisis estructural de los hidrogeles se situaron las muestras en el cristal del equipo para realizar las mediciones. se utilizó un ATR-FTIR Nicolet-1800 (THERMO, EUA). Se midió en un rango de 400-3800  $cm^{-1}$ , en la zona del mediano infrarrojo (MIR), con una resolución de 4  $cm^{-1}$ , haciendo 64 barridos.

### **8.3 Reología**

La caracterización reológica de los hidrogeles se llevó a cabo haciendo uso de un reómetro Anton-Paar MCR 300.

#### **8.3.1 Viscosidad**

Las mediciones de viscosidad de los hidrogeles se tomaron antes de polimerizarse. Los hidrogeles se colocaron en moldes de 10 mm de altura y 2 cm de diámetro (Figura 16). Las mediciones se llevaron en geometría plato-plato utilizando el peltier PP25 con altura de plato de 5 mm aproximadamente a una temperatura ambiente (25 °C). Se corrieron a una frecuencia de 1 Hz en un intervalo de tasas de corte entre 0.1 y 100 1/s.



Figura 16 Muestra sobre plato de reómetro Anton-Paar MCR 300

#### **8.3.2 Módulo de almacenamiento y pérdida**

Las mediciones correspondientes al módulo de almacenamiento, módulo de pérdida y factor de amortiguación “*damping factor*” se llevaron a cabo haciendo uso del peltier PP25, a una temperatura constante de 37 °C (temperatura corporal), con una amplitud gamma de 0.001%, se tomaron 300 puntos en un intervalo de frecuencia de 0.1-100 Hz. Los hidrogeles fueron previamente sintetizados a 24 y 48 horas, y puestos a *swelling* durante 24 horas previas a la medición.

## 8.4 Pruebas Antimicrobianas

Mediante esta técnica fue posible conocer las propiedades antimicrobianas de los hidrogeles sintetizados se usó un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Figura 17) para estudiar la inhibición de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (*E. coli*). Para conocer la capacidad de las Ag NPs para inhibir el crecimiento de las bacterias, se tomaron los aislados bacterianos conservados en agar nutriente, para lo cual, previamente las bacterias fueron cultivadas en caldo nutriente para bacterias durante 48 horas. [104]

El primer paso del experimento fue preparar las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*) en caldo nutriente para bacterias para obtener el caldo inoculado. En 3 celdas para UV-Vis se adicionaron:  $75\mu\text{l}$  de bacteria *E. coli* con  $925\mu\text{l}$  de caldo nutriente,  $50\mu\text{l}$  de bacteria *Staphylococcus aureus* con  $950\mu\text{l}$  de caldo nutriente y  $1\text{ ml}$  de caldo nutriente. Posteriormente se midieron las muestras en el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Figura 27), en donde la celda que contenía solo caldo nutriente fue colocada en el blanco para ser tomada como referencia, mientras que la celda con bacteria *E. coli* inoculada fue puesta en el orificio contiguo al blanco, se realizó el mismo procedimiento para la celda con bacteria *Staphylococcus aureus* inoculada.



Figura 17 espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis

Posteriormente en 15 tubos de ensayo se adicionaron las muestras de hidrogeles con Ag NPs (previamente polimerizadas a 48 horas), y se agregaron  $3\text{ ml}$  de cada caldo inoculado y caldo nutriente a cada tubo, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Configuración de concentraciones de hidrogel en caldo nutriente e inoculados.

Caldo nutriente $\mu\text{g/ml}$	Bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> inoculada	Bacteria <i>E. coli</i> inoculada
Sin Ag NPs	Sin Ag NPs	Sin Ag NPs
<b>1</b>	1	1
<b>10</b>	10	10
<b>20</b>	20	20
<b>40</b>	40	40

Una vez que se tuvieron las muestras con caldo e hidrogel, se llevaron a incubar durante 48 horas a 35° (Figura 18).

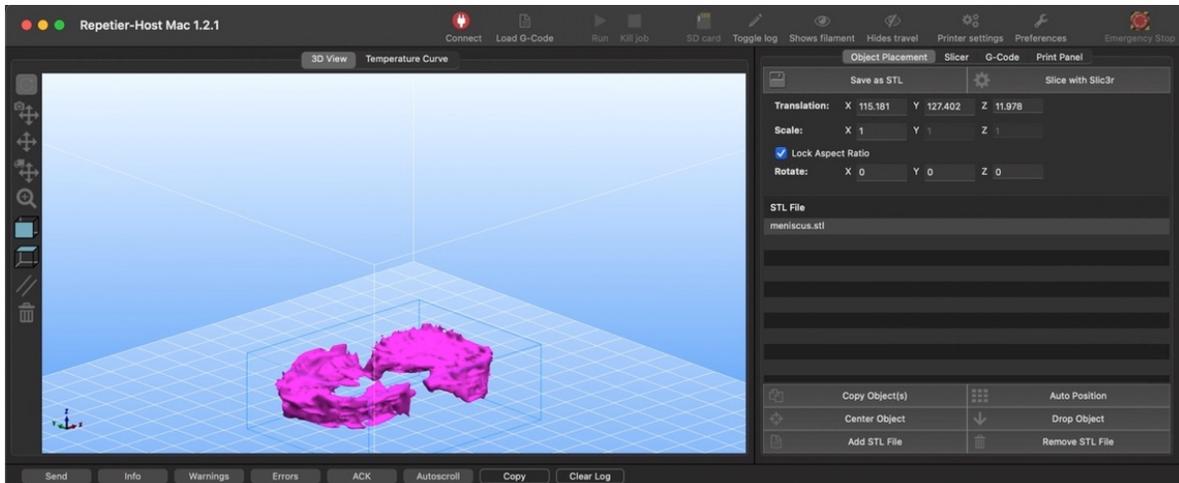


Figura 18 Incubadora a 35°.

Pasadas las 48 horas se llevaron las muestras a vortex y se procedieron a medir en el espectrofotómetro UV-Vis, siendo el caldo nutriente la muestra blanco en cada caso.

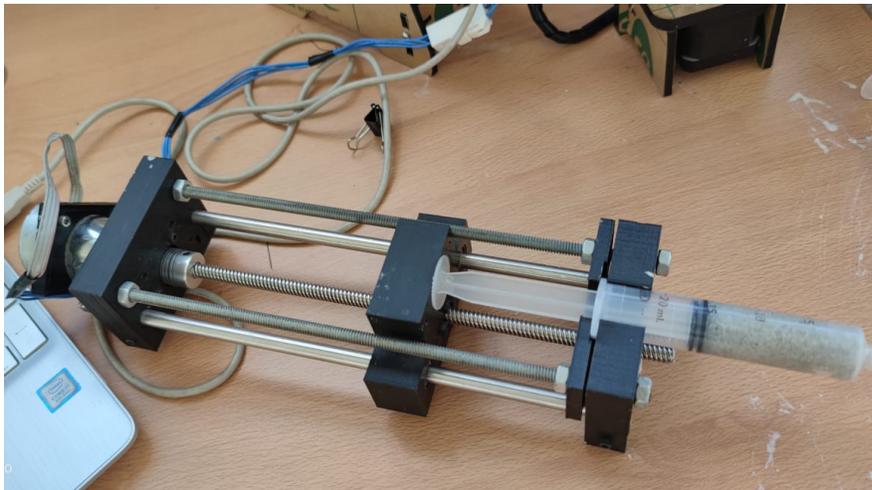
## 8.5 Impresión 3D

La elaboración de objetos mediante impresión 3D se realiza a partir de un archivo cuya base estructural es un modelo tridimensional virtual viable, en el caso de su aplicación en medicina, son requeridos los estudios de imagen de un paciente para crear un molde a la medida. Para llevar a cabo la impresión 3D de piezas de menisco con los hidrogel previamente sintetizados, se hizo una adaptación a una impresora Prusa i3, obteniendo un extrusor mecánico, dicho aditamento se maneja por medio del programa Repetier-Host (Figura 19) el cual además controla la impresora 3D ANET 8, permite controlar aspectos de la impresión como son: velocidad, ancho de filamento, temperatura de la cama, relleno de la pieza, etc.



*Figura 19 Archivo .STL de prótesis de menisco, previo a proceder a ser impresa*

Así mismo, a la impresora se le adaptó un motor a pasos (Figura 20) el cual ayuda a la extrusión del material, ya que los hidrogeles sintetizados presentan una consistencia diferente a la de los filamentos comúnmente utilizados en impresoras 3D. Para ello fue necesario adaptar una manguera en una jeringa donde el material fue depositado. La manguera se coloca en un orificio que fue adaptado cerca del extrusor original, para que pueda seguir los movimientos que se le ordenan a la impresora 3D mediante el programa Repetier-Host, sin verse afectado por el calor que el extrusor emana.



*Figura 20 Motor a pasos adaptado a impresora 3D*

## 9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Potencial Zeta y DLS

Es importante garantizar la estabilidad coloidal de nuestras nanopartículas, por lo que procedimos a medir su potencial zeta. Para las Ag NPs sintetizadas por reducción química en medio acuoso y con pH cercano a 10.5 se obtuvo un potencial Z negativo de -55.3 mV (Figura 21) atribuido a los aniones del citrato de sodio que rodean la partícula. La medición indicó que las Ag NPs sintetizadas son estables de acuerdo a lo reportado previamente para este tipo de nanopartículas, donde usualmente los valores  $>+25$  mV y  $<-25$  mV tienen alto grado de estabilidad [105].

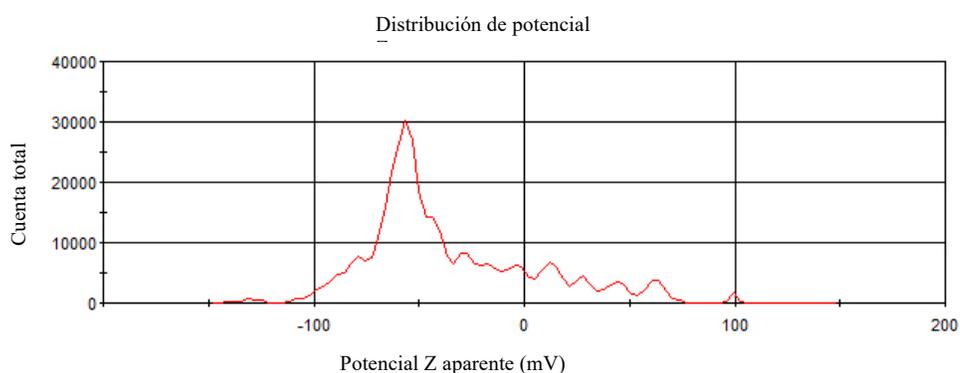


Figura 21 Distribución de Potencial Z

En la Tabla 4 se muestra una comparación entre valores de potencial Z para Ag NPS con distintos agentes estabilizantes. Se puede ver que es común encontrar valores en el rango de inestabilidad debido a un estabilizador insuficiente como el polivinilpirrolidona (PVP). Es por ello por lo que el método de síntesis con citrato de sodio propicia la estabilidad electrostática.

Para determinar la distribución de tamaños de las Ag NPs se midió el diámetro hidrodinámico inicialmente. Primero se midieron las Ag NPs para determinar su tamaño promedio como se muestra la Figura 22, donde se encontró una distribución trimodal, la primera distribución parcial se ubica alrededor de los 5-12 nm con una desviación estándar de 3.226nm, la segunda alrededor de los 15-30 nm con una desviación estándar de 74.81nm y la tercera cerca de los 80nm con una desviación estándar de 0.3709nm. La media se mantiene en 29nm. Así mismo, se obtuvo un valor de Pdl (Polidispersidad) de 0.543, lo cual nos indica que hay diferentes tamaños de Ag NPs formados.

De acuerdo a la literatura, una desviación estándar baja indica que la mayor parte de los datos de una muestra tienden a estar agrupados cerca de su media, como es el caso de la primera y tercera distribución encontrada, mientras que una desviación estándar alta indica que los datos se extienden sobre un rango de valores más amplio, como es el caso de la

distribución encontrada entre 15 y 30nm [106]. Por lo tanto, los altos valores de desviación estándar confirman la polidispersidad de tamaños en la dispersión.

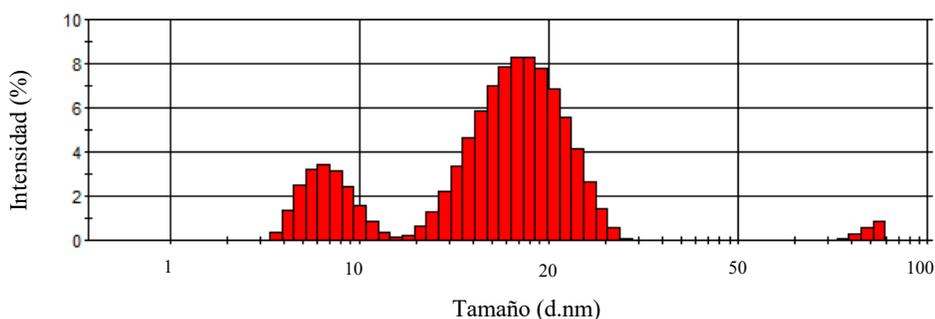


Figura 22 Distribución de tamaño de Ag NPs por intensidad

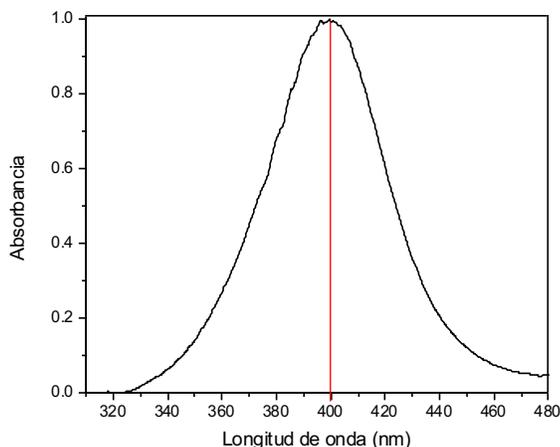
Tabla 4 Comparación del potencial Z en Ag NPs [107], [108], [109], [110].

Potencial Z (mV)	Estabilizante	Diámetro de partícula (nm)	Referencia
-25	poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA)	26	Libor Kvítek [107]
24	polivinilpirrolidona (PVP)	200	Arie Bruinink [108]
-29	citrato de sodio tribásico	40	Ossa Orozco [109]
-72	Ácido ascórbico	20	Anna Barbasz [110]

## 9.2 UV-Vis de Ag NPs

Mediante espectroscopía UV-Vis se confirmó la formación de plata metálica. De acuerdo con la literatura, el plasmón característico de las Ag NPs se observa un máximo de absorbancia a alrededor de los de los 400-450 nm dependiendo de su forma, tamaño, método de síntesis, entorno y su grado de dispersión de tamaño [66], [67], es por ello que sus

espectros de absorción se estudiaron en un rango de longitud de onda de 300 nm a 480 nm como se observa en la Figura 23.



*Figura 23 Plasmón característico UV- Vis obtenido mediante la medición de Ag NPs usando ácido ascórbico como agente reductor y citrato de sodio como agente estabilizante.*

En nuestro caso, se puede observar en la Figura 23 que el pico del espectro se encuentra ubicado alrededor de los 400nm, lo que permite inferir que se ha obtenido la formación de plata metálica. La forma e intensidad obtenida se explica ya que a medida que aumenta el diámetro promedio de las partículas, la banda de resonancia de plasmón se desplaza hacia longitudes de onda más largas, además de tornarse más ancho. En nuestro caso se mantiene cerca de los 400 nm lo cual nos indica tamaños relativamente pequeños de Ag NPs [111]. Si bien, estos valores difieren de los obtenidos mediante Potencial Z y STEM considerando que las mediciones de UV-Vis fueron realizadas inmediatamente después de realizada la síntesis de Ag NPs, lo cual sugiere que para las mediciones antes mencionadas hubo un crecimiento y aglomeración en la semana posterior.

Así mismo, el plasmón obtenido es el esperado de acuerdo al proceso de síntesis seguido para la obtención de Ag NPs, para el cual se tomó como referencia los estudios realizados por Yaqiong Qin y colaboradores [102], donde se demostró que la variación en el pH afecta el ancho y alto del plasmón, esto debido al tamaño de las Ag NPs sintetizadas, lo cual se puede observar en la Figura 24.

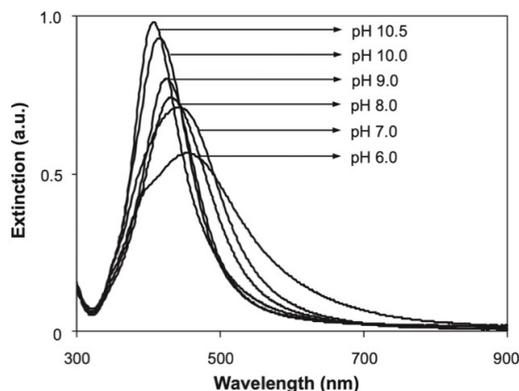


Figura 24 Espectros UV-Vis de las nanopartículas de plata obtenidas de las partículas de plata preparadas a pH 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 10,5 horas.[102].

### 9.3 STEM de Ag NPs

Con el objetivo de estudiar la morfología y distribución de tamaños de las Ag NPs se examinaron las imágenes obtenidas por la técnica de STEM.

De acuerdo a la síntesis seguida mediante la técnica estudiada por Yaqiong Qin y colaboradores [102], los cambios en el pH no afectan la forma de las Ag NPs solo su tamaño. Para el caso de las Ag NPs sintetizadas con pH de 10.5, se puede observar en la Figura 25 que estas presentan forma cuasiesféricas así como tamaños promedio de 20nm.

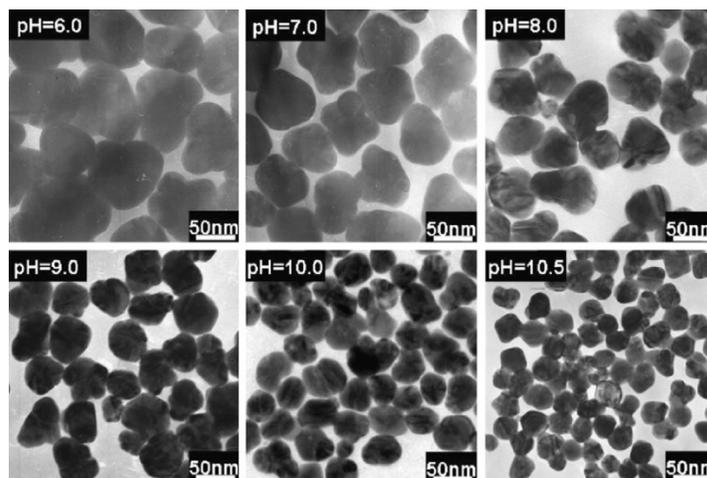


Figura 25 Imágenes TEM de las Ag NPs preparadas a pH 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 10,5 después de 15 min de las reacciones a 30 ° C. [[102]]

En nuestro caso, mediante las micrografías mostradas en la Figura 26 se puede confirmar la formación de Ag NPs debido al contraste que presentan. Así mismo, no se identificó un cambio en la morfología ni una alteración en el tamaño. Se observa que se

obtienen valores de tamaño entre 23-35 nm y morfología cuasi-esférica, lo cual corresponde con los resultados obtenidos mediante la técnica de DLS.

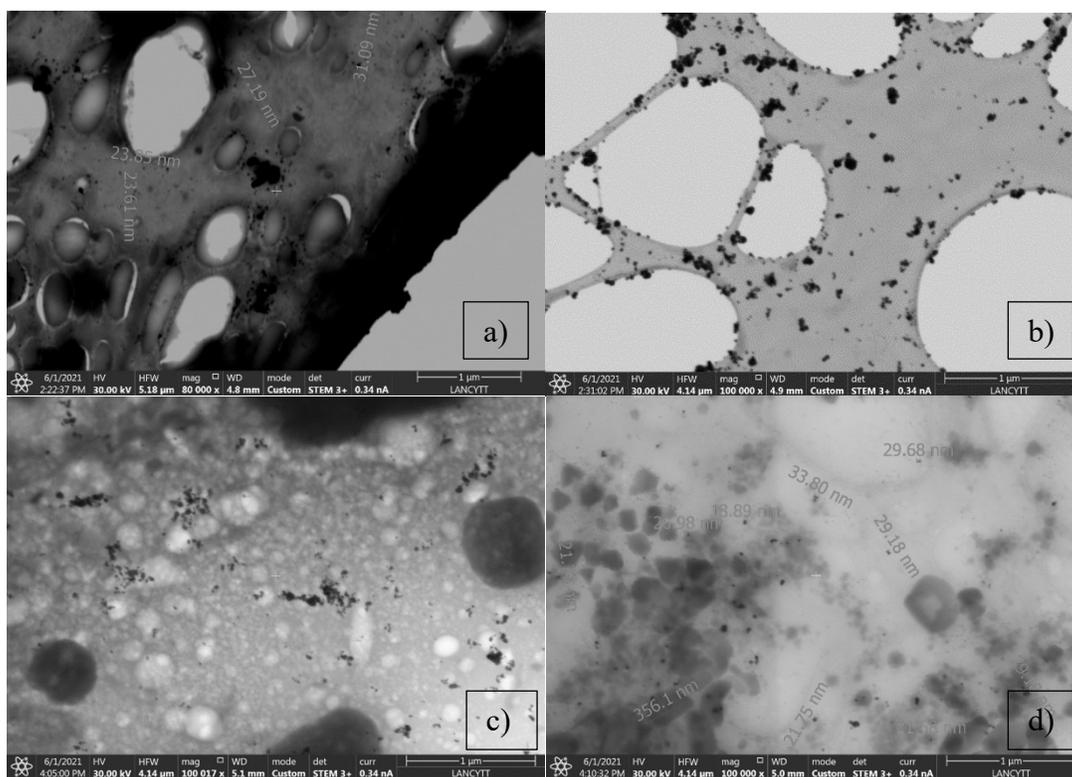


Figura 23 Imágenes STEM de Ag NPs reducidas con ácido ascórbico y estabilizadas con citrato de sodio.

Así mismo, podemos ver en la Figura 25 como afecta el pH a las Ag NPs sintetizadas con ácido ascórbico como agente reductor y citrato de sodio como estabilizador. En nuestro caso, se escogió un pH de 10.5 para lograr la formación de Ag NPs de 20nm. Las Ag NPs sintetizadas presentan valores en un rango de 23-35 nm, la diferencia con lo reportado por Y. Qin y colaboradores [102] es que sus mediciones se llevaron a cabo mediante microscopía TEM 15 minutos después de ser realizada la reducción, mientras que en nuestro caso fueron tomadas por microscopía STEM después de 3 semanas de haber sido sintetizadas, lo cual puede ocasionar un crecimiento de los coloides en suspensión acuosa.

Derivado de las microfografías correspondiente a nuestra síntesis de Ag NPs con pH de 10.5, se pudo obtener un histograma mediante el software ImageJ analysis, en el cual se determinó que el valor promedio de tamaño de nanopartículas se encuentra en el rango de 20 a 30nm ya que existe una mayor concentración de estas, pero también existe la formación de Ag NPs más pequeñas y grandes (Figura 24), esto se comprueba mediante la técnica de DLS donde los valores de desviación estándar calculados confirman la polidispersidad de las Ag NPs sintetizadas.

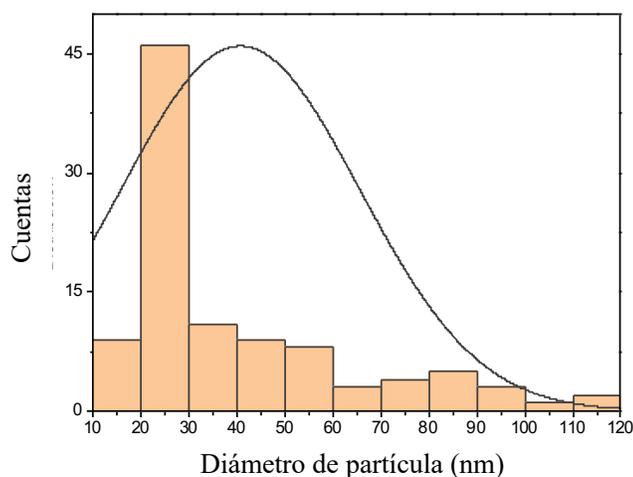


Figura 24 Histograma de tamaños de Ag NPs a 1ug/ml

El tamaño de Ag NPs es óptimo para ser añadido al hidrogel, debido a que se buscaba sintetizar Ag NPs no menores a 15 nm, ya que, de acuerdo con lo reportado por diversos autores, el tener Ag NPs de diámetros pequeños puede ser perjudicial en hidrogeles para bio-tintas 3D, considerando que tamaños pequeños pueden atravesar la membrana celular y ser tóxicos para el cuerpo humano debido a que producen mayores niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) [109], [112], [113].

#### 9.4 FTIR-ATR de Hidrogel sin Ag NPs

El entrecruzamiento del ácido hialurónico, colágeno y quitosano se confirmó utilizando espectros infrarrojos transformados de Fourier (FTIR).

En la Figura 25 podemos ver la banda en  $1589\text{ cm}^{-1}$ , la cual es la más característica del quitosano [114]. Dicha banda podemos notar que se encuentra en nuestro espectro obtenido desplazada hacia  $1591\text{ cm}^{-1}$ , lo cual nos indica una interacción química con el material. La banda en  $1645\text{ cm}^{-1}$  tiene relación directa con las interacciones entre el quitosano y el ácido hialurónico, la cual será descrita más adelante.

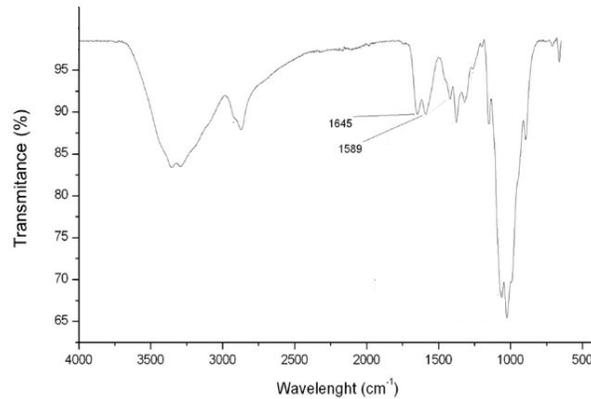


Figura 25 Espectro FTIR de quitosano con signo característico como evidencia [114].

Con base a lo reportado por Ramasamy Sripriya y Ramadhar Kumar, las interacciones de las amidas I, II y III del colágeno están presentes en  $1636$ ,  $1549$ ,  $1237\text{ cm}^{-1}$  respectivamente [115], como se muestra en la Figura 26. Los espectros FTIR de los hidrogeles sintetizados, mostraron que los picos de absorción aparecen a  $1634\text{ cm}^{-1}$  (amida I),  $1539\text{ cm}^{-1}$  (amida II) y  $1232\text{ cm}^{-1}$  (amida III), que fueron los picos de absorción característicos de C=O, N-H y C-N respectivamente, presentes en el colágeno, los corrimientos en las bandas nos indican que en efecto hay una interacción con los polímeros que conforman el hidrogel.

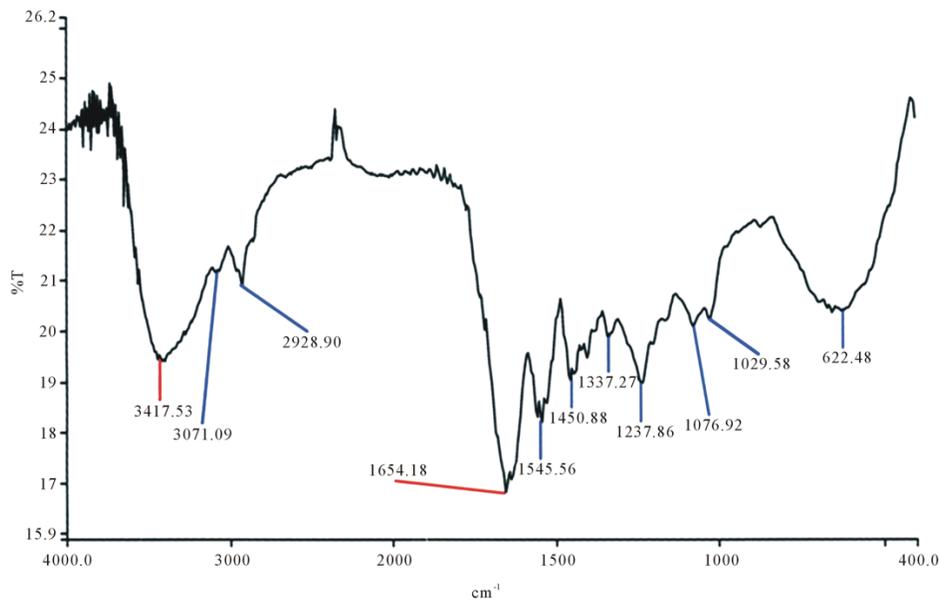


Figura 26 Los espectros FT-IR muestran la estructura secundaria de las proteínas de colágeno tipo 1, como banda amida I, amida II y amida III [115].

En la Figura 27 se presenta el espectro del ácido hialurónico estándar [116]. La banda característica de este material se encuentra en  $1637\text{ cm}^{-1}$  que señala la amida I presente en el material. En nuestro material, la banda en  $1646\text{ cm}^{-1}$  están relacionadas al grupo amida I, y son observadas cuando se tiene una solución quitosano-ácido hialurónico, que indican la formación de un vínculo entre éstos.

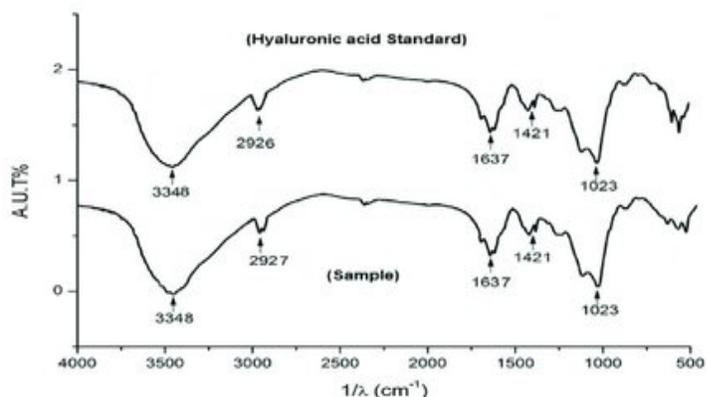


Figura 27 Espectros infrarrojos (FT-IR) del ácido hialurónico estándar [116].

La bentonita tiene tres bandas características presentes en su espectro FTIR como se muestran en la Figura 28, una de ellas se encuentra en  $783\text{ cm}^{-1}$  que está relacionado con el enlace Si-O-Al, mientras que la segunda banda se muestra en  $1034\text{ cm}^{-1}$  se la banda característica del grupo SO el cual coincide con las vibraciones de la bentonita (Si-O). Por último, la banda característica de los grupos OH, se encuentra en  $3442\text{ cm}^{-1}$ . Los resultados obtenidos en nuestro análisis, se ubicaron  $797\text{ cm}^{-1}$ ,  $1040\text{ cm}^{-1}$  y  $3447\text{ cm}^{-1}$ , los corrimientos nos indican una vez más la interacción de los distintos polímeros presentes en el hidrogel [117][118].

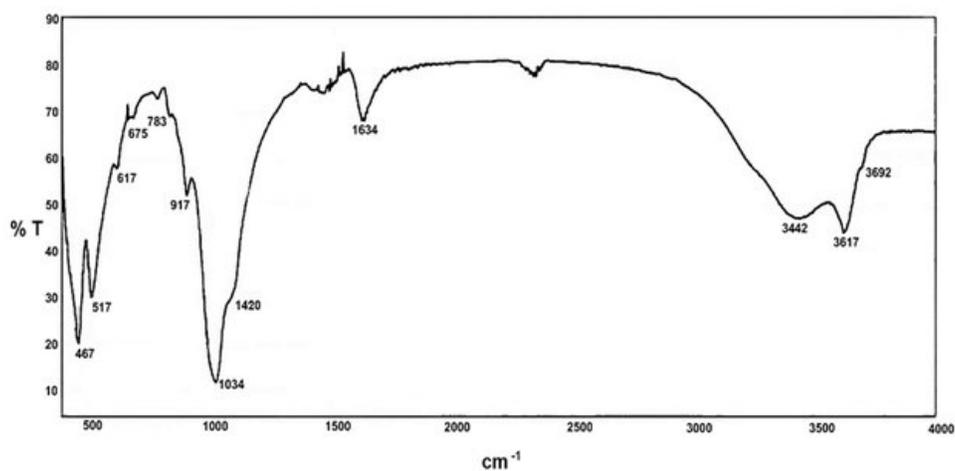


Figura 28 Espectro FTIR de la bentonita [117]

De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 29, Tabla 5), se considera que el hidrogel tiene las interacciones de sus polímeros presentes, lo que asegura que las propiedades por las cuales se escogieron cada uno de ellos, conferirán características viscoelásticas al material.

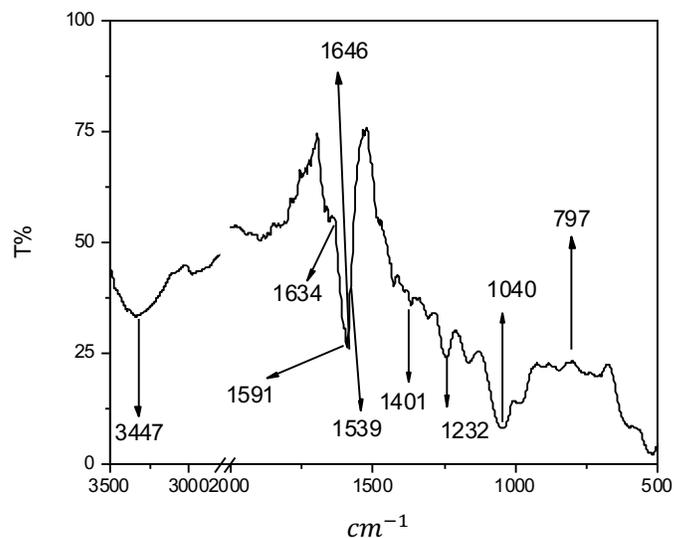


Figura 29 Espectro FTIR-ATR de hidrogeles sin Ag NPs

Tabla 5 Asignación de bandas relacionadas a materiales existentes en hidrogeles sintetizados con colágeno, ácido hialurónico, quitosano y bentonita [114]–[118].

Longitud de onda ( $cm^{-1}$ )	Asignación
3447	Grupos OH
1646	Amida I
1634	Amida I
1591	Quitosano
1539	Amida II
1232	Amida III
1040	Grupo SO
797	Si-O-Al

## 9.5 Swelling

La capacidad de hinchamiento o *swelling* de los hidrogeles, es un equilibrio entre las fuerzas de hinchamiento y elásticas. El diseño adecuado de los parámetros de hinchamiento permite que los andamios de hidrogel controlen la difusión de moléculas bioactivas y la migración de células a través de la compleja estructura de red.

De acuerdo con lo estudiado por el grupo de N. Davidenko para hidrogeles sintetizados con colágeno y ácido hialurónico, el grado de hinchamiento mejora conforme se agrega mayor cantidad del polímero [51]. Así mismo, se puede ver en la Figura 30, que hay mayor porcentaje de *swelling* el ácido hialurónico agregado en 15%, mientras que disminuye cuando se agrega solo un 7.5% de este. Así mismo, el valor mas bajo reportado es para los hidrogeles con colágeno. Esto nos permite deducir que el agregar mayor cantidad de ácido hialurónico que de colágeno al hidrogel, nos ayudara a aumentar los porcentajes de *swelling*.

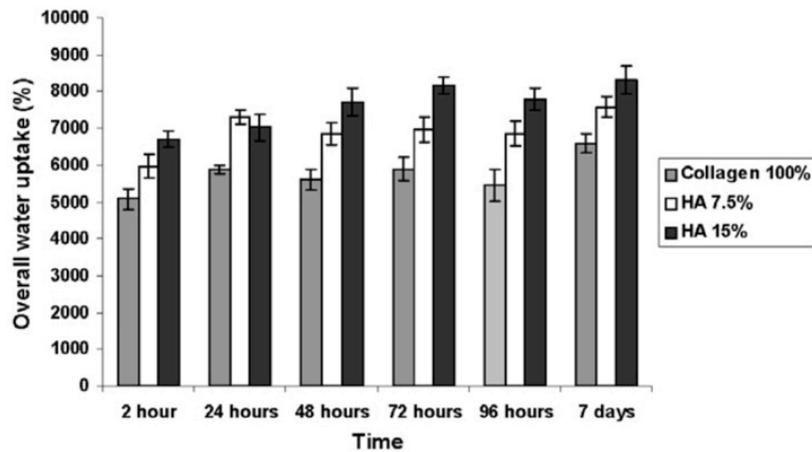


Figura 30 El efecto de la composición del andamio en la absorción total de agua en diferentes tiempos de remojo.

En nuestro caso, los experimentos de *swelling* se llevaron a cabo en solución buffer de PBS a 37°C.

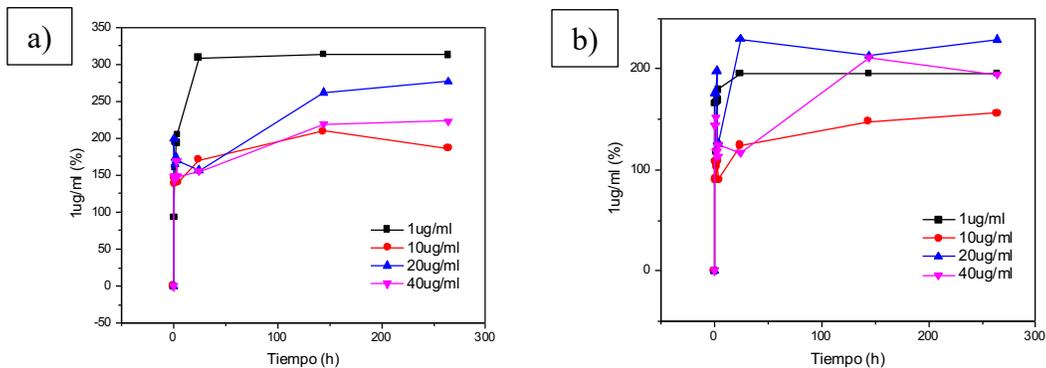


Figura 31 Swelling de hidrogel sintetizado con Ag NPs, colágeno, ácido hialurónico y quitosano polimerizado a: a) 24 horas, b) 48 horas

En la Figura 31 se muestra el porcentaje de hinchamiento con respecto al tiempo de los hidrogeles sintetizados con colágeno, ácido hialurónico, quitosano a diferentes concentraciones de Ag NPs (1, 10, 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$ ) y polimerizados a 24 horas. Tomando como referencia lo estudiado por el grupo de N. Davidenko, se añadió mayor cantidad de ácido hialurónico que de colágeno al hidrogel, en relación 5:1, para garantizar porcentajes más altos de *swelling*.

En el hidrogel sintetizado con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Ag NPs se puede notar que una vez alcanzando su límite de *swelling* (3 horas) la curva se mantiene constante en 310% con 24 horas de polimerización y 194% con 48 horas de polimerización. Podemos observar que el mayor porcentaje de *swelling* se presenta cuando las muestras cuentan con 24 horas de polimerización, lo cual puede ser debido a que, en 48 horas de polimerización, el grado de reticulación es mucho mayor y por tanto su *swelling* es menor. Para el caso de la muestra con 10  $\mu\text{g/ml}$  de Ag NPs (Figura 31 a) se puede observar el decaimiento en la gráfica debido a que el material se rompió. Los resultados obtenidos en todos los hidrogeles son óptimos, ya que para considerarse hidrogel debe al menos retener 10% de agua [50] y en nuestro caso los valores rondan el 300%.

## 9.6 Pruebas Reológicas

### 9.6.1 Viscosidad

La viscosidad es un parámetro de interés debido a que la aplicación final de estos hidrogeles es de usarse como bio-tinta en impresoras 3D, y deben tener baja viscosidad al momento de la extrusión y alta viscosidad al formar el objeto tridimensional.

En la Figura 32, podemos ver las pruebas de viscosidad realizadas para ácido hialurónico y colágeno. Se puede notar que los rangos de ambos materiales rondan de los 0.5 a los 50 Pa·s. Por lo que el adicionarlos juntos mejorará sus capacidades de viscosidad.

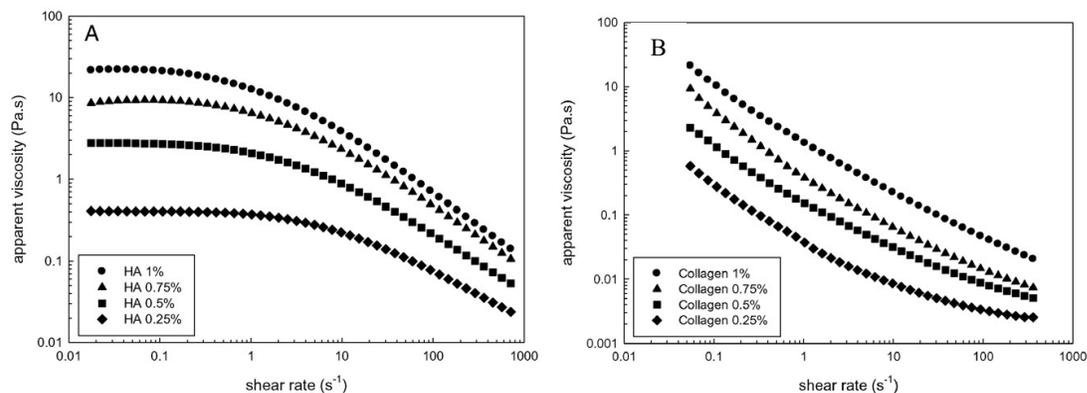


Figura 32 comportamiento reológico de A) ácido hialurónico y B) colágeno a varias concentraciones en soluciones acuosas puras [119].

Se puede observar en la Figura 33 que las síntesis presentan el mismo comportamiento, a bajas tasas de corte  $<1$ , su viscosidad es alta. Sin embargo, al aumentar su tasa de corte  $>1$ , su viscosidad se ve disminuida, mismo caso se presenta en lo reportado por Raluca Vulpe e investigadores [119].

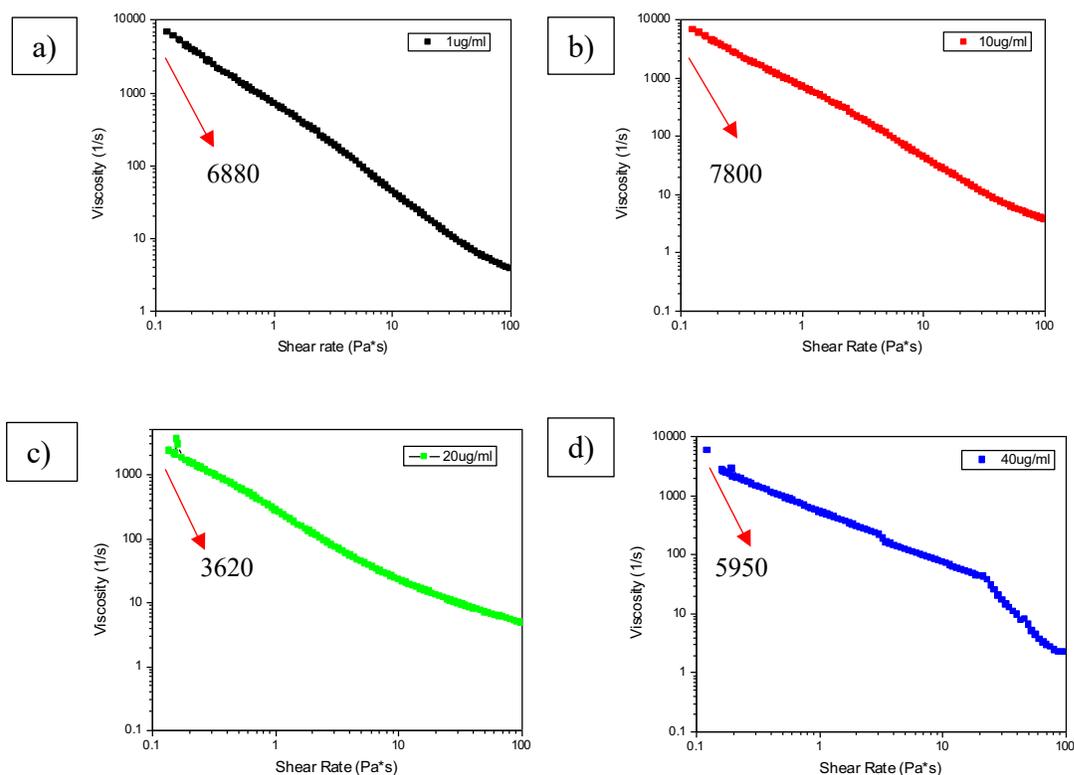


Figura 33 Viscosidad de hidrogeles con ácido hialurónico y colágeno. Variación de Ag NPs de a)  $1\mu\text{g/ml}$ , b)  $10\mu\text{g/ml}$ , c)  $20\mu\text{g/ml}$  y d)  $40\mu\text{g/ml}$ .

Las síntesis con concentraciones de  $1\mu\text{g/ml}$  y  $10\mu\text{g/ml}$ , tienden a tener valores de viscosidad más elevados llegando a rebasar  $6.5\text{KPa}\cdot\text{s}$  en comparación con las síntesis con concentraciones  $20\mu\text{g/ml}$  y  $40\mu\text{g/ml}$  en donde el valor más alto fue de  $5.9\text{KPa}\cdot\text{s}$ , además de que estas últimas presentan un salto en la medición que las otras concentraciones no generan, esto podría deberse al contenido de Ag NPs y que durante la medición estos hidrogeles se rompieron antes de terminar la medición.

Datos reportados indican que para hidrogeles con quitosano y ácido hialurónico la viscosidad puede variar desde  $25\text{Pa}$  a  $4740\text{Pa}$  [14], en nuestra caso los hidrogeles sintetizados con Ag NPs, colágeno, ácido hialurónico y quitosano presentaron una viscosidad que oscila entre  $6800$  y  $7800\text{Pa}$ , atribuyendo la mejora de la viscosidad a la mezcla de los tres polímeros [87]. Recordemos que la viscosidad adecuada para impresión 3D oscila entre  $10^3$  y  $10^4\text{Pa}\cdot\text{s}$  para evitar la alta presión de extrusión [15], por lo cual la viscosidad obtenida durante las mediciones, garantiza una buena extrusión del material en la impresora 3D.

### 9.6.2 Módulo de almacenamiento y pérdida $G'$

Se observa en la Figura 34 el comportamiento de Módulo de almacenamiento y pérdida para hidrogeles con A) ácido hialurónico y B) colágeno en diferentes concentraciones. Se puede notar que los valores de  $G'$  son mayores que los de  $G''$ , lo cual indica la formación de un gel. Así mismo, para el caso de los hidrogeles con ácido hialurónico hay un entre cruzamiento de los módulos. Los valores de estas muestras estudiadas rondan los valores de 0.1 a 10 Pa, considerando que los resultados fueron obtenidos en hidrogeles independientes, por lo cual en las síntesis elaboradas con ambos materiales se esperan valores de  $G'$  y  $G''$  más altos.

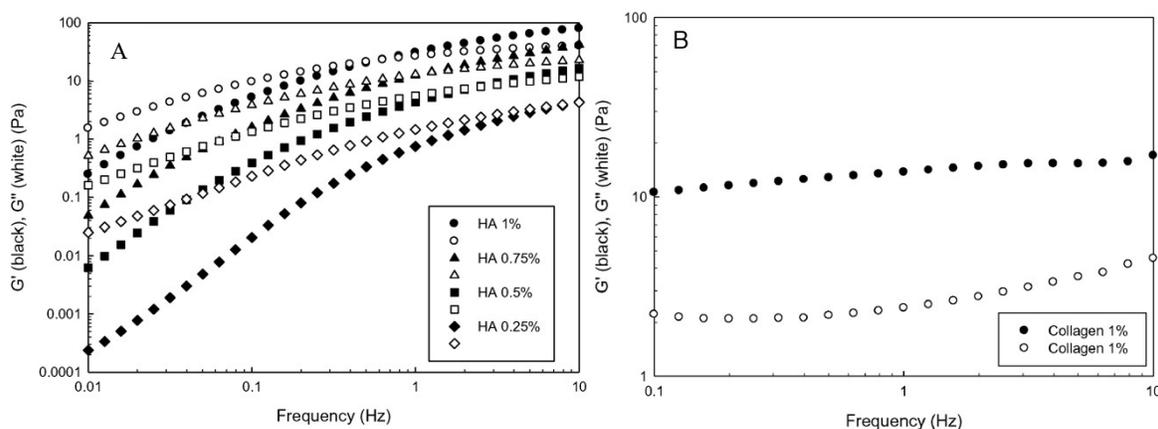


Figura 34 comportamiento reológico de A) ácido hialurónico y B) colágeno a varias concentraciones en soluciones acuosas puras [119]

Las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles fueron caracterizadas por medio de Reología obteniendo los módulos  $G'$  (módulo de almacenamiento) y  $G''$  (módulo de pérdida) lo cual nos indica que el material es un gel. Las mediciones se llevaron a cabo en hidrogeles en estado de *swelling* en solución PBS a temperatura corporal constante ( $37^{\circ}\text{C}$ ).

En la Figura 35 podemos observar la gráfica de los módulos  $G'$  y  $G''$  (almacenamiento y pérdida) así como el factor de amortiguamiento. Se puede notar que los hidrogeles sintetizados con  $1\mu\text{g/ml}$  y  $10\mu\text{g/ml}$  de Ag NPs, presentan un comportamiento relativamente lineal, esto está relacionado con el entrecruzado o entrelazado de las cadenas poliméricas [120]. Por otro lado, en los hidrogeles sintetizados con  $20\mu\text{g/ml}$  y  $40\mu\text{g/ml}$  de Ag NPs, se puede observar que existen frecuencias en las que los módulos  $G'$  y  $G''$  se interceptan, debido a que el hidrogel tiene una transición a un comportamiento de fluido [120].

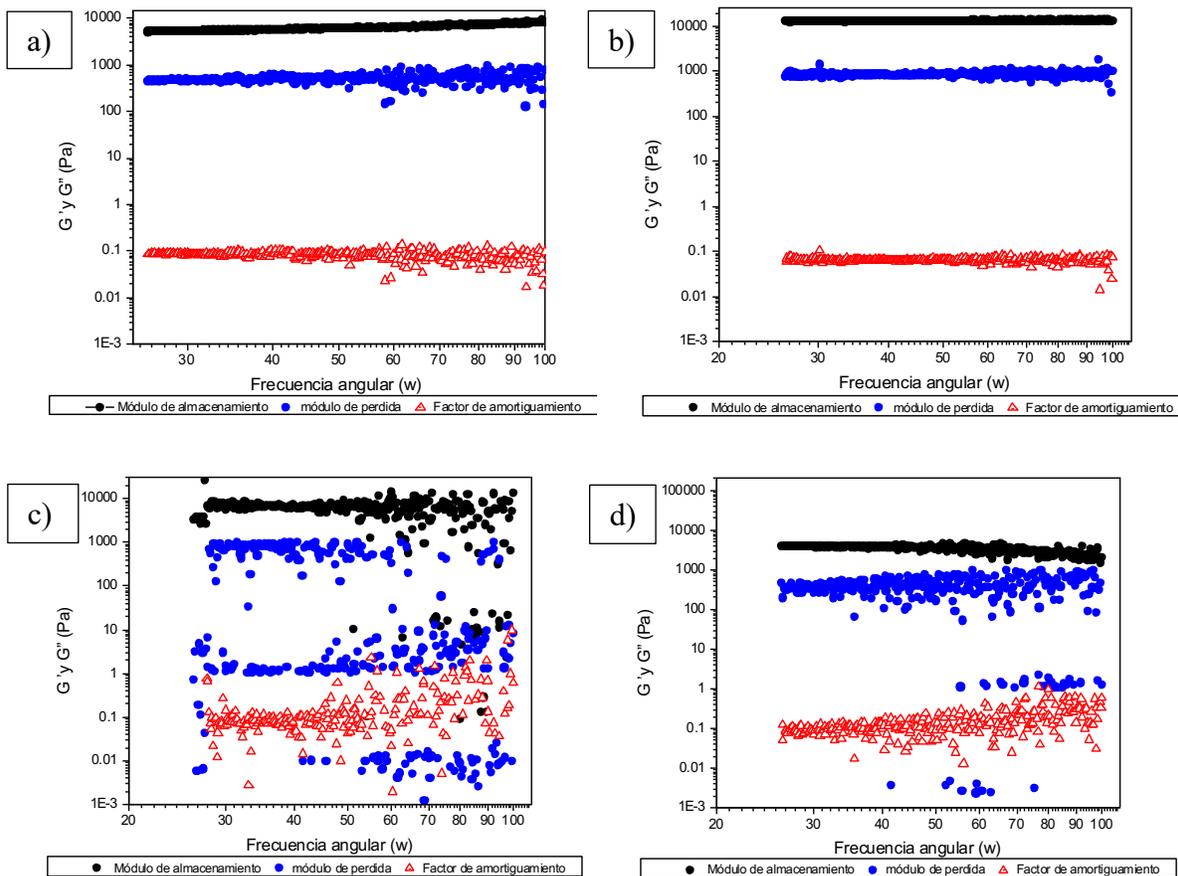


Figura 35 Módulos  $G'$  (negro),  $G''$  (azul) y factor de amortiguamiento (rojo) de hidrogel sintetizado con colágeno, ácido hialurónico, quitosano y Ag NPs a diferentes concentraciones a) 1  $\mu\text{g/ml}$ , b) 10  $\mu\text{g/ml}$ , c) 20  $\mu\text{g/ml}$  y

d) 40  $\mu\text{g/ml}$ , hinchados en PBS.

En la Figura 36 se muestra un promedio de las mediciones realizadas. De manera general, en todas las muestras  $G'$  es mayor a  $G''$ , lo cual indica que las muestras medidas tienen comportamiento de hidrogel. A pesar de que los mejores promedios fueron los del hidrogel sintetizado con 20  $\mu\text{g/ml}$  de Ag NPs, este no tuvo un comportamiento lineal, como se mostró en la Figura 35, por lo cual se descartó como opción para impresión 3D ya que no tiene un comportamiento predecible.

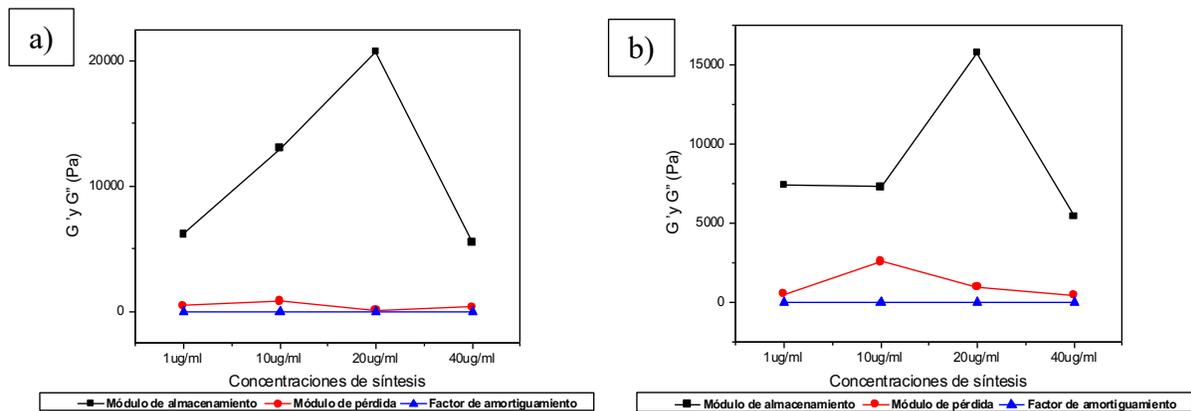


Figura 36 Módulo de pérdida, módulo de almacenamiento y factor de amortiguamiento correspondiente a hidrogeles polimerizados a) 24 horas, b) 48 horas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en reología y *swelling*, se considera que los hidrogeles ideales para ser impresos de manera 3D son aquellos con las concentraciones de  $1 \mu\text{g/ml}$  y  $10 \mu\text{g/ml}$  de Ag NPs. Este hecho también fue coincidente con las muestras que tuvieron mejor comportamiento en las pruebas antimicrobianas como se describe a continuación.

### 9.7 Pruebas antibacterianas

Los resultados obtenidos mediante las pruebas antibacterianas se muestran en la tabla 6 y su representación gráfica en la Figura 37.

Tabla 6 Porcentajes de inhibición de los hidrogeles con y sin Ag NPs en caldo inoculado.

Porcentaje de inhibición. Ag NPs $\mu\text{g/ml}$	Bacteria Staphylococcus aureus inoculada	Bacteria E. coli inoculada
<b>Sin Ag NPs</b>	-80%	42.5%
<b>1</b>	80%	69.7%
<b>10</b>	61.56%	89.19%
<b>20</b>	52.15%	48.09%
<b>40</b>	49.6%	58.5%

Podemos observar que la muestra control (hidrogeles sin Ag NPs) presenta los valores más bajos de inhibición, y en el caso de la bacteria *Staphylococcus aureus* se aprecia un valor negativo, lo que indica que contrario a una inhibición de bacterias hay un crecimiento de éstas. Este valor es muy significativo, ya que demuestra que los hidrogeles preparados con Ag NPs ayudan a inhibir el crecimiento de las bacterias desde un 50 a 80%.

Los mecanismos exactos de la toxicidad de las nanopartículas contra varias bacterias no se conocen por completo. Las Ag NPs pueden adherirse a la membrana de las bacterias por interacción electrostática y alterar la integridad de la membrana bacteriana. La nanotoxicidad generalmente se desencadena por la inducción de estrés oxidativo por la formación de radicales libres [121].

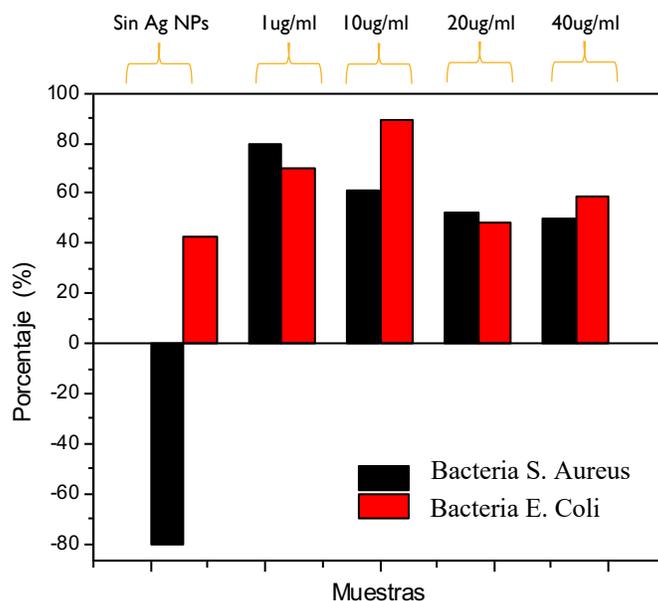


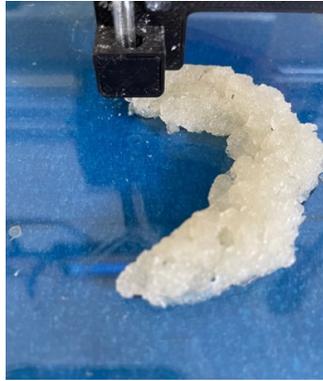
Figura 37 Porcentajes de inhibición de los hidrogeles con y sin Ag NPs en caldo inoculado.

Las muestras que presentan un mayor porcentaje de inhibición son las que se sintetizaron a bajas concentraciones de Ag NPs  $1 \mu\text{g/ml}$  y  $10 \mu\text{g/ml}$ , coincidiendo estos valores con las caracterizaciones anteriores (*swelling*, viscosidad, modulo  $G'$  y  $G''$ ). Así mismo, se obtuvieron valores comparables con otros hidrogeles que se utilizan para ingeniería de tejido articular ya que presentan un valor entre 50 y 80 %de inhibición bacteriana lo que deriva en una favorable actividad antimicrobiana contra bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (E. coli).

## 9.8 Impresión 3D

Como se muestra en la Figura 38, se llevó a cabo la impresión 3D de un menisco lateral y medial obtenidos por medio de segmentación de imágenes, mediante el uso de un archivo de resonancia magnética con extensión STL.

La impresión 3D se realizó utilizando el hidrogel constituido de colágeno, ácido hialurónico, quitosano y  $1 \mu\text{g/ml}$  de Ag NPs, ya que fue el hidrogel que mejores resultados obtuvo en *swelling*, viscosidad, módulos  $G'$  y  $G''$  además de que presentó un 80% de inhibición para el caldo inoculado con la bacteria *Staphylococcus aureus*, y un 69.7% de inhibición para el caldo inoculado con la bacteria *Escherichia coli* (E. coli).



*Figura 38 Impresión 3D de menisco*

Las piezas obtenidas mediante impresión 3D fueron polimerizadas durante 48 horas, debido a los resultados obtenidos mediante FTIR y *swelling* que mostraron ser el mejor intervalo de tiempo a usar (Figura 39), así mismo se puede observar que presentan su forma circular y de “c” a pesar de haber sido polimerizadas.



*Figura 39 Meniscos medial y laterales obtenidos mediante impresión 3D y con proceso de polimerización de 48 horas.*

Finalmente, las piezas fueron sumergidas en PBS a una temperatura controlada de 37 °C, la Figura 40 fue tomada 72 horas posterior a introducirlas en PBS, tomando en cuenta que el punto más alto de *swelling* se alcanza después de las 3 horas. Se puede observar que las piezas cambian no su forma después de ser polimerizadas, y que presentan un crecimiento al ser hinchadas.



*Figura 40 Meniscos obtenidos por impresión 3D, después de 72 horas de ser sumergidos en PBS.*

## 10 CONCLUSIONES

Se sintetizaron cuatro configuraciones de hidrogeles: Colágeno, ácido hialurónico y quitosano, en presencia de Ag NPs a 1, 10, 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$ , donde se formaron redes poliméricas interpenetradas (IPN's).

Se obtuvieron Ag NPs cuasiesféricas con tamaño de 25-29 nm y carga negativa de -55.3 mV. El plasmón de resonancia superficial se encuentra ubicado alrededor de 400nm.

La funcionalización del hidrogel fue estudiada por espectroscopía FTIR encontrando interacciones entre colágeno, ácido hialurónico y quitosano entre 797-3447  $\text{cm}^{-1}$ .

La incorporación de 1 $\mu\text{g/ml}$  Ag NPs, colágeno y ácido hialurónico mejoraron las propiedades viscoelásticas del hidrogel sintetizado en este trabajo, se obtienen valores de 7 kPa\*s, siendo un valor adecuado para la impresión 3D. Además de conducir a una alta absorción de agua alcanzando su valor más alto de *swelling* a 310% a las 3 horas de iniciar la medición. Las propiedades mecánicas se midieron por medio de los módulos  $G'$  y  $G''$ , demostrando que  $G' > G''$  lo cual garantiza que se tiene un hidrogel.

Se obtuvo un 80% de inhibición para el caldo inoculado con la bacteria *Staphylococcus aureus*, y un 69.7% de inhibición para el caldo inoculado con la bacteria *Escherichia coli* (E. coli) demostrando su actividad antimicrobiana debido a la adición de Ag NP's.

La adición de colágeno y ácido hialurónico tuvieron gran influencia en la mejora de las propiedades reológicas y mecánicas en el hidrogel sintetizado, mientras que las Ag NPs aportan propiedades antibacterianas, por ello pueden ser utilizados como biotinta para impresión 3D de prótesis de menisco.

## ***11 TRABAJO A FUTURO***

Como propuestas y mejoras a futuro del trabajo realizado se plantean las siguientes propuestas:

- Realizar pruebas de citotoxicidad en células que se asemejen mejor al ambiente en el que se encontraría la prótesis de menisco, es decir, células de osteoblastos o fibroblastos.
- Mejorar las condiciones de la impresora 3D, añadiendo un aditamento para realizar el proceso de polimerización mientras se realiza la impresión 3D.
- Aumentar las cantidades de colágeno y ácido hialurónico para ver si mejoran las propiedades viscoelásticas y los módulos de almacenamiento y pérdida.
- Optimizar el proceso de síntesis, utilizando agitación mecánica con algún aparato que mantenga las revoluciones constantes.

## 12 ANEXO 1

### 12.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

#### 12.1.1 Espectroscopía de absorción ultravioleta visible UV-Vis

La espectroscopía UV o espectrofotometría UV-visible (UV-Vis o UV/Vis) se refiere a la espectroscopia de absorción o espectroscopia de reflectancia en parte del ultravioleta y las regiones visibles adyacentes completas del espectro electromagnético (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) [122]. El principio básico de la técnica de UV-Vis es la absorción de radiación de una frecuencia determinada en el rango de longitudes de onda de UV-Vis, realizada por una molécula para producir una transición de un nivel de baja energía a un nivel de mayor energía, el único requisito es que la muestra absorba en la región UV-Vis, es decir, que sea un cromóforo.

Siendo relativamente económica y fácil de implementar, esta metodología es ampliamente utilizada para la detección de grupos funcionales, detección de impurezas, análisis cualitativo y cuantitativo de analitos, medicamentos con grupos cromóforos entre otras aplicaciones [122] [123].

Metales como Oro (Au), Plata (Ag), Cobre (Cu), y los metales alcalinos que poseen electrones libres muestran plasmón de resonancia en el espectro visible, dando lugar a colores no observados en los mismos materiales a escala micrométrica. Por ejemplo, las nanopartículas de plata muestran una intensa resonancia del plasmón de superficie (RPS) principalmente en los intervalos de longitud de onda de 400-420 nm (Figura 41) [124].

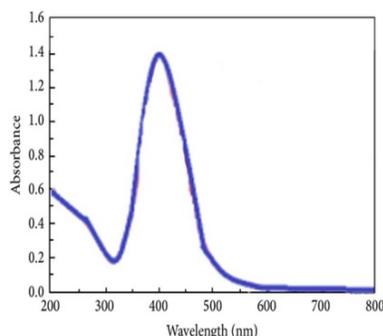


Figura 41 Espectro de absorción UV/Vis de Ag NPs [66].

La RPS y, por lo tanto, algunas propiedades ópticas de nanopartículas dependen en gran medida de tamaño, forma, composición, índices de refracción del metal, el medio circundante, la presencia de especies adsorbidas y la distancia media entre nanopartículas vecinas. Se puede encontrar una diversidad de espectros de resonancia del plasmón de superficie de nanopartículas de plata en la región visible y las coloraciones que van del amarillo al azul [33].

La espectroscopia de absorción es complementaria a la espectroscopia de fluorescencia. Los parámetros de interés, además de la longitud de onda de medición, son la

absorbancia (A) o la transmitancia (%T) o la reflectancia (%R), y su cambio con el tiempo [125].

En la Figura 42, se puede observar el principio de funcionamiento de un espectrómetro UV-Vis.

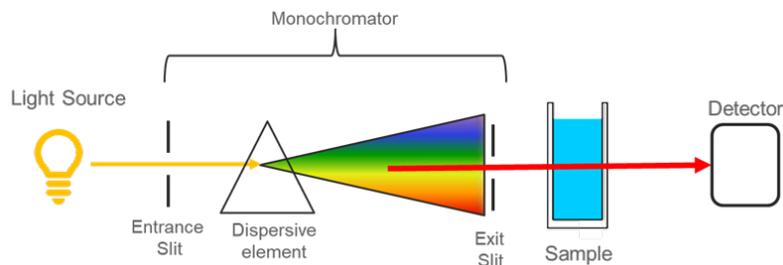


Figura 42 Principio de 3.2.1 Espectrofotometría de absorción ultravioleta visible UV-Vis [126].

### 12.1.2 Espectroscopía FTIR-ATR

La reflexión total atenuada (ATR) es una técnica de muestreo utilizada junto con la espectroscopia infrarroja tradicional, que en última instancia califica las muestras para observarlas directamente en estado sólido o líquido, sin preparación adicional. FTIR significa espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier: una técnica que se puede utilizar para obtener un espectro infrarrojo de la emisión o absorción de una muestra líquida, sólida o gaseosa [127], [128].

Un espectrómetro FTIR recopila sincrónicamente los datos de alta resolución espectral en un amplio rango. Esto es una ventaja sobre el espectrómetro dispersivo tradicional que solo mide la intensidad espectral en un rango mucho más pequeño de longitudes de onda en un momento dado. El término "espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier" se basa en el proceso de transformada de Fourier, que se requiere para convertir los datos sin procesar en espectros [127].

El tiempo total de análisis del polímero mediante la técnica ATR es de menos de 1 minuto. Con el muestreo ATR se dirige el haz de infrarrojos hacia un cristal de índice de refracción relativamente más alto. El haz de infrarrojos se refleja en la superficie interna del cristal y crea una onda evanescente, que se proyecta ortogonalmente en la muestra en íntimo contacto con el cristal ATR. Parte de la energía de la onda evanescente es absorbida por la muestra y la radiación reflejada (parte ahora absorbida por la muestra) se devuelve al detector como se muestra en la Figura 43 [128].

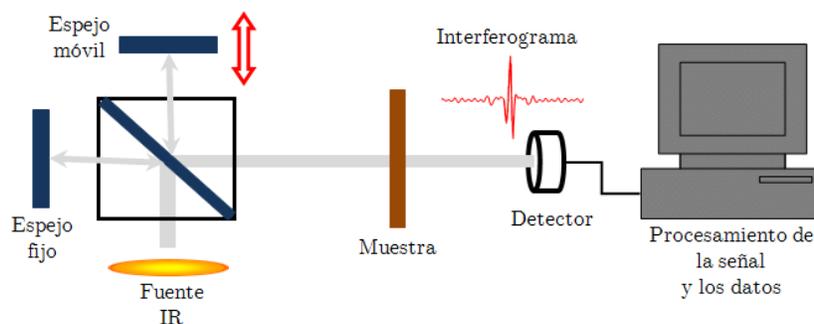


Figura 43 Representación esquemática de un sistema ATR-FTIR [129].

### 12.1.3 Microscopía Electrónica de Barrido de transmisión STEM

La microscopía electrónica se utiliza, entre muchas otras cosas más, para el estudio de la morfología de muestras a escalas muy pequeña (micrómetro y nanómetros). Para la visualización de los objetos se utiliza un haz de electrones acelerados a un alto voltaje.

La microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM) combina los principios de la microscopía electrónica de transmisión y la microscopía electrónica de barrido y se puede realizar en cualquier tipo de instrumento. Al igual que el TEM, el STEM requiere muestras muy delgadas y analiza principalmente los electrones de haz transmitidos por la muestra. Una de sus principales ventajas sobre TEM es que permite el uso de otras señales que no pueden correlacionarse espacialmente en el TEM. En el SEM / STEM se trabaja a bajas tensiones de aceleración pero podemos lograr resoluciones subnanométricas (0.6 nm), lo que lo convierte en una alternativa muy eficiente desde el punto de vista económico a un TEM / STEM [130].

Como en SEM, la técnica de STEM desliza un haz de electrones fino y focalizado a lo largo de la muestra. La interacción entre este haz y los átomos de la muestra generan un flujo de señales que se correlacionan con la posición del haz para construir una imagen virtual donde la intensidad de señal en cualquier localización de la muestra es representada por la intensidad en la escala de gris de la correspondiente localización en la imagen. La principal ventaja respecto al SEM convencional es la mejora en la resolución espacial [109].

Como en TEM, la técnica de STEM requiere muestras muy finas y detecta principalmente los electrones transmitidos a través del espécimen. Su principal ventaja respecto al TEM convencional es que permite el uso de otras señales que no puede ser espacialmente correlacionados en TEM, como los electrones secundarios, electrones dispersados, rayos X característicos y pérdidas de energía de los electrones.

La obtención de contraste en el TEM se puede realizar de dos modos en función de los electrones seleccionados en el sistema de creación de la imagen: mediante campo claro (BF, Bright Field), donde se recogen los electrones del haz directo, o campo oscuro (DF, Dark Field), donde se seleccionan los electrones dispersados. En el STEM, también se seleccionan estos dos tipos de electrones, pero mediante detectores en lugar de aperturas.

Para seleccionar los electrones del haz directo, se utiliza un detector situado en el eje del haz (on-axis), mientras que para recoger los electrones dispersados, se utiliza un detector anular alrededor (off-axis) [131], [132].

En la Figura 44, se puede observar el principio básico de funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido de transmisión (STEM).

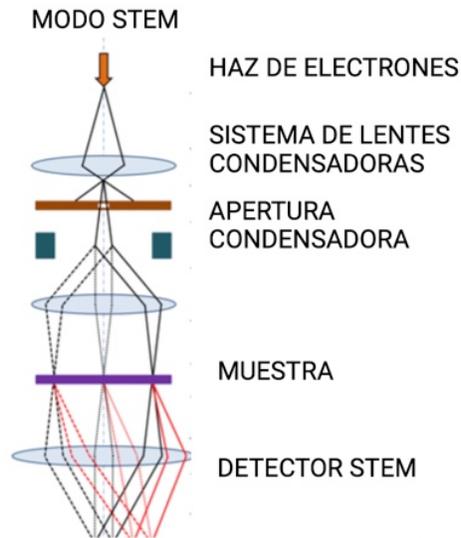


Figura 44 Diagrama esquemático de un microscopio STEM [107].

#### ***12.1.4 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)***

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada en la caracterización de nano y micropartículas, ya que brinda una amplia gama de información como lo es la determinación del tamaño y potencial zeta de partículas en suspensión.

#### ***12.1.5 Distribución de tamaño***

Esta medición se adquiere cuando una partícula es irradiada con un láser, y esta dispersa esa radiación en todas direcciones, y es obtenida mediante un detector que recibe estos fotones dispersados por parte de miles de partículas, formando así un patrón de puntos luminosos[133]. Las partículas viajan en todas direcciones, debido al movimiento browniano, en donde migran las más pequeñas a mayor velocidad y las más grandes a menor velocidad. Dicha relación está dada por la Ec. de Stokes-Einstein, generando así un patrón de difracción el cual es capturado por el detector que se modifica a través del tiempo debido a dichos movimientos de las partículas, lo que permite relacionar la velocidad de cambio de dicho patrón con el tamaño de las partículas en suspensión [133].

El tamaño hidrodinámico medido por el DLS se define como “el tamaño de una esfera rígida hipotética que se disemina del mismo modo que la partícula que se mide”. Sin embargo, en la práctica, las partículas o macromoléculas en solución no son esféricas, dinámicas (circulantes), y solvatadas. Debido a esto, el diámetro calculado a partir de las propiedades difusionales de la partícula indica el tamaño real de la partícula dinámica hidratada y solvatada, de ahí la terminología “diámetro hidrodinámico”. Por lo tanto, el diámetro hidrodinámico o de Stokes, es el diámetro de una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión traslacional que el de la partícula que se mide, suponiendo una capa de hidratación que rodea la partícula o molécula [134].

### ***12.1.6 Potencial Zeta***

El Potencial Z es una técnica analítica que es aplicada para la determinación de la carga superficial de las nanopartículas en soluciones coloidales. La superficie de la carga atrae una capa fina de carga opuesta y se une firmemente a ella, formando una fina capa llamada capa de *Stern* (por estrella en Alemán). Cuando la partícula se difunde en solución estará envuelta por una capa difusa externa que consiste en iones débilmente asociados, como resultado de lo cual se crea una doble capa eléctrica [135]. Los valores de potencial z se encuentran en el rango de +100 a -100 mV y la magnitud predice la estabilidad del coloide. Usualmente los valores  $>+25$  mV y  $<-25$  mV tienen alto grado de estabilidad [135].

El equipo DLS posee una celda especial para la medición del potencial zeta, la cual consta de dos electrodos en sus extremos, en la que se realiza una micro electroforesis. En esta técnica, se aplica un potencial para que las partículas cargadas migren hacia el electrodo de carga opuesta, y así poder medir la velocidad de migración obteniendo la movilidad electroforética y mediante la aplicación de la ecuación de Henry, es posible calcular el potencial Z [136].

### ***12.1.7 Hinchamiento (Swelling)***

El hinchamiento es una medida de la cantidad de fluido que puede absorber el hidrogel en su interior [52]. En numerosos estudios se ha demostrado que al variar la composición inicial y la densidad de entrecruzamiento de un hidrogel, se afecta su índice de hinchamiento. Al incrementar el contenido de incorporación del monómero hidrófilo en la reacción de copolimerización, éste aporta una mayor cantidad de grupos afines a las moléculas de agua, favoreciendo así la interacción del hidrogel con las soluciones acuosas. Sin embargo, si se incrementa la proporción de un monómero hidrófobo, este comportamiento se invierte. Esto se debe a que se favorece el aumento de las interacciones entre las cadenas de polímeros, disminuyendo en consecuencia las interacciones de la cadena con las moléculas de agua [137].

Por otro lado, a medida que el tamaño de poro de la red decrece, los hidrogeles también pueden exhibir una marcada reducción en el máximo contenido de agua que pueden almacenar. Esta característica puede regularse al incrementar el porcentaje de agente entrecruzante durante la reacción de polimerización. Un aumento del grado de entrecruzamiento reducirá el volumen libre dentro de la estructura de la red del hidrogel, reduciendo el tamaño de los poros [138].

Debido a que el peso, el volumen y los valores dimensionales de los hidrogeles cambian durante el proceso de hinchamiento (Figura 45) cualquiera de estos factores puede ser utilizados para caracterizar su comportamiento. Los cálculos para obtener los valores de *swelling* se realizan con referencia a la siguiente expresión matemática:

$$\%Hinchamiento = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

donde,

$W_t$  es el peso del disco hinchado al tiempo  $t$

$W_0$  es el peso del disco después de la polimerización

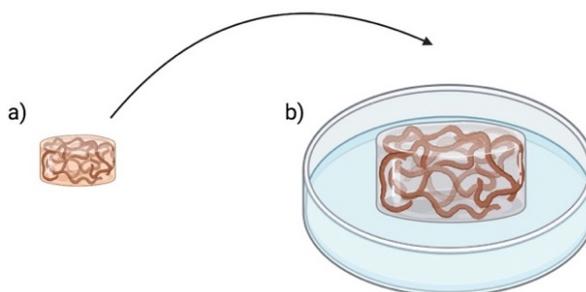


Figura 45 Proceso de hinchamiento en medio acuoso, a) hidrogel polimerizado, b) hidrogel hinchado por solución acuosa (Creado con BioRender.com)

### 12.1.8 Reología

La reología del griego (rhéō) 'flujo', y -λογία (-logia) 'estudio de', es el estudio del flujo de la materia, principalmente en estado fluido (líquido o gaseoso), pero también como "sólidos blandos" o sólidos en condiciones en las que responden con un flujo plástico en lugar de deformarse elásticamente en respuesta a una fuerza aplicada. La reología es una rama de la física, y es la ciencia que se ocupa de la deformación y el flujo de materiales, tanto sólidos como líquidos. La reología de fluidos es usada para describir la consistencia de diferentes fluidos, normalmente mediante dos componentes, la viscosidad y la elasticidad [139].

### 12.1.8.1 Viscosidad

La viscosidad se define como la resistencia a fluir de un material. Para medir y describir el flujo de un material es necesario confinarlo, hacer que ocurra el flujo por medios mecánicos y medir la fuerza requerida para ello. El recíproco de la viscosidad se llama fluidez, una medida de la facilidad de flujo [140].

Para la mayoría de los fluidos, el esfuerzo cortante causado por el flujo es directamente proporcional a la tasa de deformación cortante resultante (*shear strain rate*) o tasa de deformación (*strain rate*). En otras palabras, el esfuerzo cortante dividido por la tasa de deformación cortante es constante para un fluido dado a una temperatura fija. Esta constante se denomina viscosidad dinámica o absoluta y, a menudo, simplemente viscosidad. Los fluidos que se comportan de esta manera se denominan fluidos newtonianos en honor a Sir Isaac Newton, quien formuló por primera vez esta descripción matemática de la viscosidad [141]. Dicho concepto está definido por la Ley de Newton, que relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación (gradiente de velocidad) como se muestra en la siguiente ecuación [142]:

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma}$$

Donde:

$\mu$ , es la viscosidad dinámica (Pa·s)

$\tau$ , es el esfuerzo cortante o de cizalla (Pa)

$\dot{\gamma}$  es la velocidad de deformación (s<sup>-1</sup>)

Cuando la fuerza  $F$  que actúa sobre el cuerpo es paralela a una de las caras mientras que la otra cara permanece fija, se presenta un tipo de deformación denominada de cizallamiento, en el que no hay cambio de volumen, pero sí de forma [142].

En general, la viscosidad depende del estado de un fluido, como su temperatura, presión y tasa de deformación. Sin embargo, la dependencia de algunas de estas propiedades es despreciable en ciertos casos. Por ejemplo, la viscosidad de un fluido newtoniano no varía significativamente con la tasa de deformación. La viscosidad cero (sin resistencia al esfuerzo cortante) se observa solo a temperaturas muy bajas en superfluidos; de lo contrario, la segunda ley de la termodinámica requiere que todos los fluidos tengan una viscosidad positiva [143], [144].

La viscosidad adecuada para la extrusión de un material mediante impresión 3D oscila entre  $10^3$  y  $10^4$  Pa·s para evitar la alta presión de extrusión [15].

### 12.1.8.2 Módulo de almacenamiento y pérdida

Para los materiales elásticos se sigue la Ley de Hooke, la cual establece que el esfuerzo de corte es proporcional al desplazamiento dividido entre el espesor:

$$\gamma = \frac{x}{y} = \frac{dx}{dy}$$

Por lo que el esfuerzo de corte se define como:

$$\tau = G\gamma$$

Donde G es el llamado módulo de elasticidad.

Pero los hidrogeles no son sólo materiales elásticos ni materiales viscosos, sino que tienen características de ambos materiales por lo que se le llaman materiales viscoelásticos, es decir, tienen un componente elástico que absorbe la energía aplicada, transformándola durante la deformación en energía potencial, de forma que cuando esta cesa, la deformación vuelve a su estado inicial; y un componente viscoso que absorbe la energía aplicada transformándola en calor y fluyendo. Estos materiales a bajas deformaciones se comportan como un sólido elástico y a altas deformaciones fluyen como líquidos.

Para obtener información de las propiedades de los hidrogeles se someten a experimentos oscilatorios, los cuales consisten en aplicar un esfuerzo o deformación sinusoidal:

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$$

Y el esfuerzo resultante de la deformación es:

$$\tau = \tau_0 \sin(\omega t + \delta)$$

Donde  $\delta$  es ángulo de fase, el cual es 0 para los sólidos elásticos y 90° para los líquidos Newtonianos. Un fluido viscoelástico exhibe un ángulo de fase entre 0 y 90° como se explica a continuación [120].

Las distintas funciones viscoelásticas que permiten caracterizar el comportamiento viscoelástico de un producto son:

- $G'$ : Módulo elástico o de almacenamiento. Representa la componente elástica del producto. Es directamente proporcional a la energía almacenada por el material en un ciclo de deformación. El módulo de almacenamiento da información sobre la cantidad de estructura presente en un material. Si es mayor que el módulo de

pérdida, el material puede considerarse principalmente elástico, es decir, el cambio de fase es inferior a  $45^\circ$  [145], [146].

- $G''$ : Módulo viscoso o de pérdida. Representa el comportamiento viscoso o la cantidad de energía disipada en la muestra.. Es directamente proporcional a la energía disipada por el material en un ciclo de deformación [145], [146].
- $G^*$ : Módulo complejo. Representa la resistencia total de una sustancia frente a la deformación aplicada. Consta de un componente real  $G'$ , que está en fase, y un componente imaginario  $G''$ , que se encuentra desfasado  $90^\circ$ , como se muestra en la Figura 46. El vector que representa el módulo complejo  $G^*$ , y que, por tanto, lo define, es:  $G^* = G' + iG''$  [145], [146].
- $\delta$ : Ángulo de fase o de desfase. Índice de la viscoelasticidad. Proporciona una primera idea de la naturaleza reológica del material [145], [146].

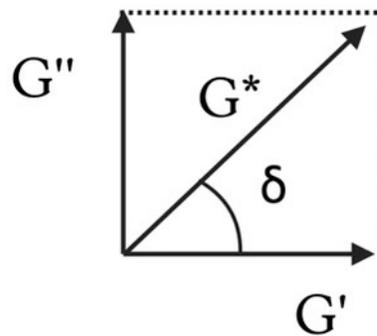
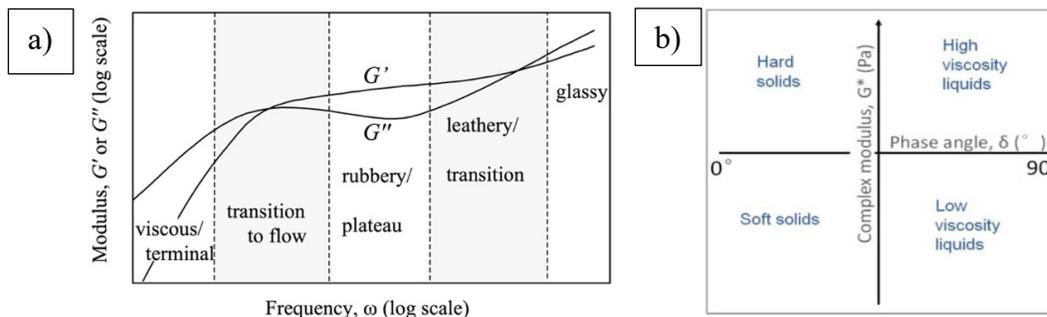


Figura 46 Vector que representa el módulo complejo  $G^*$ , con sus componentes  $G'$  y  $G''$  [120]

Si un material es elástico el esfuerzo y la deformación están en fase ( $\delta \approx 0^\circ$ ), poseerá un módulo elástico elevado ( $G^* \approx G'$ ) y un pequeño módulo viscoso ( $G'' \approx 0$ ). Si un material es viscoso entonces el esfuerzo y la deformación están en desfase ( $\delta \approx 90^\circ$ ) y el modulo viscoso será elevado ( $G'' \approx G^*$ ) y el módulo elástico pequeño ( $G' \approx 0$ ). Si un material es viscoelástico  $\delta$  tendrá valores entre 0 y  $90^\circ$  [146], el cual es el valor esperando en este desarrollo de tesis. Un  $\delta = 45^\circ$  significa que no se da una preponderancia de la componente elástica sobre la viscosa ni viceversa. Un valor tan  $\delta = 1$  indica que el material responde con componentes viscosa y elástica del mismo valor.



Como se observa en la Figura 47 a muy altas frecuencias (equivalentes a bajas temperaturas) el módulo elástico es mayor que el viscoso: el polímero se comporta como un típico polímero cristalino. Como consecuencia de una reducción en la frecuencia (equivalente a un aumento en la temperatura) se produce una mayor movilidad en las cadenas poliméricas y tiene lugar una transición hasta alcanzar un estado de comportamiento “gomoso”, en el que el módulo elástico sigue siendo mayor que el viscoso; la presencia de esta meseta o "plateau" es más notorio en polímeros de alto peso molecular, y según algunos autores está relacionada con el enmarañamiento o entrelazamientos entre cadenas poliméricas [142].

A menores frecuencias (o mayores temperaturas) comienza el flujo del material y el módulo elástico disminuye hacia valores más próximos al viscoso. Entre la región cristalina y la zona gomosa hay una zona de transición en la que se observa una inversión en los valores de los módulos elástico y viscoso al mismo tiempo que se alcanza un máximo en el módulo viscoso, como consecuencia de la aportación de la energía necesaria para producir un aumento en la movilidad de las cadenas del polímero [120].

En resumen, a bajas frecuencias  $G' < G''$  implica que el material se comporta como un líquido. Al aumentar la frecuencia esta tendencia se invierte y cuando  $G'' < G'$  el material se comportará como un sólido [142].

### ***12.1.9 Pruebas Antimicrobianas***

La aplicación de la nanotecnología en ciencia de materiales es un gran paso hacia la producción de materiales con mejores propiedades químicas, mecánicas, ópticas y eléctricas. Actualmente, una potencial aplicación de la nanotecnología es el efecto antibacteriano que pueden exhibir algunas nanopartículas, entre estas, destacan las nanopartículas de plata (Ag NP's) por su excelente efecto bactericida. Es un hecho bien conocido que los iones de plata y los compuestos a base de plata son altamente tóxicos para los microorganismos. Este aspecto de la plata lo convierte en una excelente opción para múltiples funciones en el área biomédica. La plata se usa generalmente en forma de nitrato para inducir el efecto antimicrobiano, pero cuando la plata alcanza la escala nanométrica, su efecto antimicrobiano aumenta. Se ha afirmado que la concentración de nanopartículas de plata que impide el crecimiento bacteriano es dosis-dependiente y es diferente para cada tipo de bacteria [112], [147]. También se ha investigado la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y se ha concluido que la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida es diferente en principio por el tipo de membrana de las bacterias Gram positivas o Gram negativas [112].

Es importante señalar que la acción antibacteriana de las nanopartículas de plata es altamente dependiente del tamaño de la partícula, morfología y dosis. Las nanopartículas de plata deben de ser lo suficientemente pequeñas para penetrar la membrana celular y con ello afectar la homeostasis intracelular. La interacción de las partículas con la bacteria depende del área superficial disponible (partículas pequeñas con una mayor área superficial disponible para la interacción tienen más efecto bactericida que las partículas grandes). Es posible que

las nanopartículas de plata no solo interactúan con la superficie de la membrana, sino que también penetran al interior de la bacteria [112].

Para el estudio de efectividad antimicrobiana de los hidrogeles con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (*E. coli*) son altamente utilizadas [147].

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria miembro de la familia de las enterobacterias y forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de animales homeotermos, como por ejemplo el ser humano [147]. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, algunas variantes, puede causar gastroenteritis, infecciones en el tracto urinario y meningitis neonatal. En casos raros, estas cepas patógenas también son responsables del síndrome urémico hemolítico [148].

*Staphylococcus aureus* es una bacteria muy resistente en el medio ambiente y está ampliamente distribuida en la naturaleza. Su principal reservorio son los animales y las personas. En determinadas condiciones, *S. aureus* produce toxinas estafilocócicas, enterotoxinas muy resistentes que una vez formadas en el alimento son extremadamente difíciles de eliminar. Estas toxinas son las responsables de la mayoría de las toxiinfecciones alimentarias estafilocócicas asociadas al consumo de alimentos contaminados. Los principales síntomas de esta toxiinfección son los habituales de una gastroenteritis [149].

Por estas razones, es muy importante controlar las cepas patógenas de *E. coli* y *S. aureus*, evitando su crecimiento microbiano mediante nuevos agentes bacteriostáticos no convencionales. Dentro de la gama de compuestos con actividad bactericida, las nanopartículas de plata representan un agente antibacteriano muy prometedor que podría ser útil para el tratamiento de bacterias resistentes [150].

Por ello, las nanopartículas de plata se han convertido en un enfoque importante para las aplicaciones en nanobiotecnología en el desarrollo del tratamiento antibiótico de diferentes infecciones bacterianas. Una de las características más notables de las Nanopartículas de plata es su propiedad antimicrobiana. La plata es bien conocida por su efecto inhibitorio sobre muchos microorganismos comúnmente presentes en procesos médicos e industriales [149]. La propiedad antimicrobiana de la plata mejora enormemente si la plata se transforma en una nanopartícula [66] ya que estudios han demostrado que la disminución del tamaño de las nanopartículas de plata aumenta la actividad antimicrobiana de las NP, debido al aumento de la superficie de las nanopartículas de plata, lo que favorece una mayor interacción entre las nanopartículas y la membrana celular [107].

La definición más amplia de un antibacteriano es un agente que interfiere con el crecimiento y la reproducción de bacterias y la actividad antibacteriana está relacionada con compuestos que matan bacterias localmente o ralentizan su crecimiento sin ser tóxicos en general para el tejido objetivo [121]. Las Ag NPs pueden producir radicales libres, lo que da como resultado la inducción de estrés oxidativo (es decir, especies reactivas de oxígeno; ROS). Las ROS producidas pueden dañar irreversiblemente a las bacterias (p. ej., su membrana, ADN y mitocondrias), lo que provoca la muerte bacteriana (Figura 48) [121].

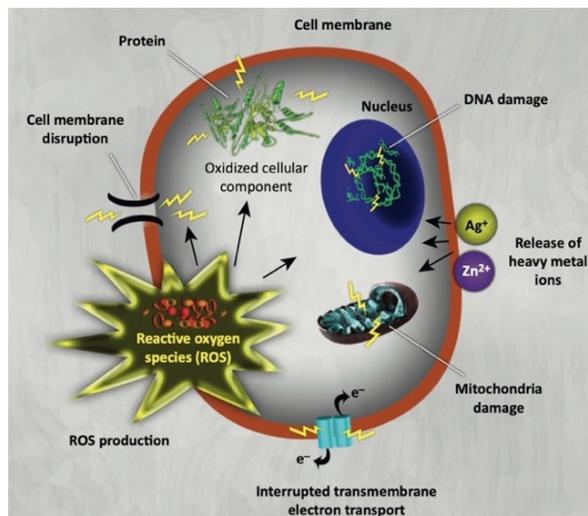


Figura 48 Mecanismos de toxicidad de las nanopartículas (NPs) frente a bacterias [121].

### 12.1.9.1 Cultivo en medio líquido

En la microbiología se debe destacar la importancia de obtener un buen cultivo de bacterias, ya que de esto depende que se puedan observar fácilmente las características de las colonias, propiedades bioquímicas morfología, reacciones de coloración, reacciones inmunológicas y la susceptibilidad de una especie microbiana a los agentes antimicrobianos [121]. En la naturaleza los microorganismos se presentan como cultivos mezclados que contienen una gran variedad de géneros y especies individuales, por ello es necesario aislarlos en un cultivo puro, es decir un cultivo que contenga una sola especie [151]. El medio que requiere para obtener un crecimiento puede ser líquido o sólido [151]. Se debe tener en cuenta que el medio debe tener las propiedades y características apropiadas para el crecimiento así como también las condiciones ambientales óptimas, como son: Temperatura, pH, presión y oxígeno [151]. Al inocular un medio de cultivo (introducción artificial de microorganismos en un medio de cultivo) para hacer crecer cierto microorganismo es necesario tomar una muestra de este, teniendo cuidado de mantener la pureza del cultivo. A este procedimiento se le conoce como técnica aseptica [151].

El cultivo en medio líquido, habitualmente se realiza en tubos, frascos o erlenmeyers. antes y después de realizada la siembra, se debe pasar la boca del recipiente (sin tapa) por la llama del mechero (flameado) para evitar la contaminación del material.

En los cultivos líquidos no tiene lugar la formación de colonias, por lo tanto, no sirven como técnica de aislamiento. La utilización de medios de cultivo líquidos permite la obtención de una población microbiana grande, con un elevado número de microorganismos, para ser utilizados posteriormente. En estos cultivos se examinará la existencia de enturbiamiento más o menos intenso, la formación de una película o velo sobre la superficie, la aparición de sedimento en el fondo del tubo, etc [152].

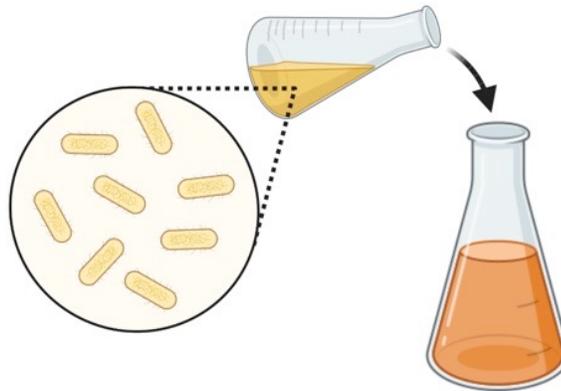


Figura 49 Inoculación de medio de cultivo. (Creado con BioRender.com)

### 12.1.9.2 Observación en medios de cultivo sólido (Colonias)

Es muy importante el estudio macroscópico de la colonia cuando se cultiva a la bacteria en la superficie de un medio sólido; de la multiplicación de cada germen se origina una colonia formando una masa de millones de gérmenes observables a simple vista como se observa en la Figura 49. La morfología de la colonia deriva de cada célula pero es una característica de la masa celular. Las características que se observan y se analizan de cada colonia son:

- Tamaño: uniforme para cada especie o tipo, las dimensiones varían desde muy pequeñas o apenas visibles, hasta unos centímetros de diámetro.
- Consistencia: blanda, seca o viscosa.
- Forma: depende del borde y del espesor. El borde puede ser liso, entero, ondulado, aserrado, etc. El espesor depende de la elevación pudiendo ser chatas, elevadas, convexas, cónicas, crateriformes, etc. De acuerdo a las características antes mencionadas pueden definirse distintos tipos de colonias [152].

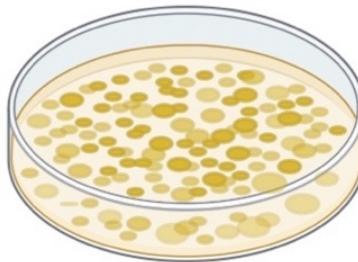


Figura 50 Figura representativa de un cultivo de colonias en medio sólido. (Creado con BioRender.com)

### ***12.1.9.3 Bacterias Gram Positiva (+) y Gram Negativa (-)***

Los fundamentos de la diferenciación entre ambos grupos se basan exclusivamente en las características diferentes de las paredes celulares entre ambos grupos de bacterias. La clave es el peptidoglucano más conocido como mureína, uno de los principales constituyentes de la pared celular, formando una gruesa capa en los Gram+, mientras que tienen una delgada capa en los Gram-. Son muchas las especies de bacterias Gram- que causan enfermedades, teniendo la membrana externa una gran parte de esa responsabilidad patogénica del microorganismo. La membrana exterior está compuesta por un complejo lipopolisacárido que actúan como endotoxinas, y si estas entran en el sistema circulatorio provocan una reacción tóxica en el animal infectado. Las endotoxinas son componentes estructurales exclusivamente de las bacterias Gram- [153].

Pal et al. demostraron que las actividades también dependían de la forma de los AgNPs, e investigaron las propiedades antibacterianas de AgNPs de diferentes formas contra la bacteria Gram-negativa *E. coli*, siendo las nanopartículas triangulares las de mayor actividad, al tener mayor densidad de átomos en sus caras [154].

Se puede concluir que las diferentes formas y tamaños de partícula, así como la aglomeración de éstas, su carga superficial y su concentración, influyen en la actividad biocida contra diferentes bacterias.

La actividad de los AgNPs contra las bacterias Gram depende de su concentración. Se ha demostrado que la concentración de AgNPs que previene el crecimiento bacteriano es diferente para cada tipo de bacteria. Las AgNP pueden actuar como agentes antimicrobianos contra casi 650 especies, incluidas bacterias resistentes a antibióticos, presentan un buen desempeño *in vitro* frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus subtilis* y Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* [154] [155].

### ***12.1.10 Impresión 3D***

La impresión 3D es una tecnología de manufactura inventada a principios de la década de 1980 [85] y se describe como la “impresión sucesiva de capas de material una encima de otra para crear un objeto 3D” [156]. A partir de aquí comenzó una evolución en el concepto de impresión 3D, técnicas y máquinas, creando aplicaciones en campos como la electrónica, la aeroespacial, campo médico y dental [79]. Las ventajas de la impresión 3D es que los prototipos son ilimitados, el diseño es rápido y fácil, y la producción en pequeñas cantidades es barato [95]. El reto en la bio-impresión de tejidos y andamios, es encontrar los materiales que se puedan utilizar en impresión 3D y que sea compatible con células vivas y, además, que tengas las propiedades mecánicas y funcionales [103].

Hay diferentes métodos que se usan para bio-impresión 3D. La elección del método depende de diferentes factores, como la resolución, la densidad y viabilidad celular, así como el material utilizado, el cual tendrá una influencia final en la pieza final [22].

3D Slicer es un programa de código abierto gratuito para el análisis y visualización de imágenes médicas [157]. Dentro de los módulos que maneja este programa se encuentra el de segmentación, que son herramientas que permiten la separación de subregiones individuales en función de determinadas características.

Para realizar la segmentación se utilizaron las siguientes herramientas:

- Grown from seeds, se basa en el algoritmo de Seeded Region Growing (SRG) el cual es un método rápido, eficaz y robusto para la segmentación de imágenes. Comienza colocando un conjunto de semillas en la imagen a segmentar, donde cada semilla podría ser un solo píxel o un conjunto de píxeles conectados. Luego SRG cultiva estas semillas en regiones, agregando sucesivamente píxeles vecinos a ellos. Finaliza, cuando todos los píxeles de la imagen se asignan a una sola región, ya que se asume implícitamente que los píxeles de la misma región comparten el mismo valor de gris.
- Level Tracing, define un contorno donde todos los píxeles tienen el mismo valor de fondo que el píxel actual.
- Paint, se elige el radio del pincel a usar y al contornear una región se deja un rastro de círculos que se aplican cuando se suelta el botón del ratón. El área seleccionada se traduce como un corte en el plano.

La impresión 3D requiere de un equipo *ANET 8* y software “*slicer* “ donde a partir de un diseño o imagen se crea un modelo tridimensional que la impresora reconoce y “lee”, y a partir del cual el objeto se va construyendo por la adición “capa por capa” del material deseado, por lo cual para el diseño de menisco se descargó un archivo MRI correspondiente a una imagen de resonancia magnética de una rodilla. El archivo se descargó de [old.mridata.org/fullysampled/knees](http://old.mridata.org/fullysampled/knees).

## 13 REFERENCIAS

- [1] H. Omidian and K. Park, *Introduction to Hydrogels*, vol. 59. 2010.
- [2] M. Englund *et al.*, “Incidental Meniscal Findings on Knee MRI in Middle-Aged and Elderly Persons,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 11, pp. 1108–1115, 2008, doi: 10.1056/nejmoa0800777.
- [3] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, “Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor,” *Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Third Ed.*, pp. xxv–xxxix, 2013, doi: 10.1016/B978-0-08-087780-8.00153-4.
- [4] O. Wichterle, “Biomaterials Science: An Interdisciplinary Endeavor,” *Nature*, vol. 185, pp. 45–47, 1960.
- [5] P. Sidhu, “Recent Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine,” *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, vol. 26, no. 2, pp. 19733–19739, 2020, doi: 10.26717/bjstr.2020.26.004312.
- [6] L. Ionov, “Hydrogel-based actuators: Possibilities and limitations,” *Mater. Today*, vol. 17, no. 10, pp. 494–503, 2014, doi: 10.1016/j.mattod.2014.07.002.
- [7] K. Naidu, P. Govender, and J. Adam, “Biomedical applications and toxicity of nanosilver: a review,” *Int. J. Pharma Bio Sci.*, vol. 6, no. 1, pp. P772–P784, 2015.
- [8] L. A. Pérez, R. Hernández, J. M. Alonso, R. Pérez-González, and V. Sáez-Martínez, “Hyaluronic acid hydrogels crosslinked in physiological conditions: Synthesis and biomedical applications,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 9, pp. 1–20, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9091113.
- [9] P. Chuysinuan, T. Thanyacharoen, K. Thongchai, S. Techasakul, and S. Ummartyotin, “Preparation of chitosan/hydrolyzed collagen/hyaluronic acid based hydrogel composite with caffeic acid addition,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 162, pp. 1937–1943, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.139.
- [10] R. Lara-Rico, J. A. Claudio-Rizo, E. M. Múzquiz-Ramos, and C. M. Lopez-Badillo, “Hidrogeles de colágeno acoplados con hidroxapatita para aplicaciones en ingeniería tisular,” *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 23, pp. 1–12, 2020, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2020.0.224.
- [11] T. Biswal, S. K. BadJena, and D. Pradhan, “Sustainable biomaterials and their applications: A short review,” *Mater. Today Proc.*, vol. 30, no. xxxx, pp. 274–282, 2020, doi: 10.1016/j.matpr.2020.01.437.
- [12] A. Arjunan, A. Baroutaji, A. S. Praveen, J. Robinson, and C. Wang, “Classification of Biomaterial Functionality,” *Encyclopedia of Smart Materials*. pp. 86–102, 2022. doi: 10.1016/b978-0-12-815732-9.00027-9.
- [13] D. Psimadas, P. Georgoulas, V. Valotassiou, and G. Loudos, “Hydrogels for Tissue Engineering and Delivery of Tissue-Inducing Substances,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 7, pp. 2271–2280, 2012, doi: 10.1002/jps.
- [14] Z. Ma, Z. Mao, and C. Gao, “Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 60, no. 2, pp. 137–157, 2007, doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.06.019.
- [15] Z. Zhang, R. Liu, H. Zepeda, L. Zeng, J. Qiu, and S. Wang, “3D Printing Super Strong Hydrogel for Artificial Meniscus,” *ACS Appl. Polym. Mater.*, vol. 1, no. 8,

- pp. 2023–2032, 2019, doi: 10.1021/acsapm.9b00304.
- [16] B. Huzum *et al.*, “Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review),” *Exp. Ther. Med.*, vol. 22, no. 5, pp. 1–9, 2021, doi: 10.3892/etm.2021.10750.
- [17] A. O. Inyang and C. L. Vaughan, “Functional characteristics and mechanical performance of PCU composites for knee meniscus replacement,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 8, 2020, doi: 10.3390/MA13081886.
- [18] A. O. Inyang, T. Abdalrahman, D. Bezuidenhout, J. Bowen, and C. L. Vaughan, “Suitability of developed composite materials for meniscal replacement: Mechanical, friction and wear evaluation,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 89, no. September 2018, pp. 217–226, 2019, doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.09.025.
- [19] A. C. T. Vrancken, P. Buma, and T. G. Van Tienen, “Synthetic meniscus replacement: A review,” *Int. Orthop.*, vol. 37, no. 2, pp. 291–299, 2013, doi: 10.1007/s00264-012-1682-7.
- [20] M. Majewski, H. Susanne, and S. Klaus, “Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study,” *Knee*, vol. 13, no. 3, pp. 184–188, 2006, doi: 10.1016/j.knee.2006.01.005.
- [21] D. Warnecke *et al.*, “Biomechanical, structural and biological characterisation of a new silk fibroin scaffold for meniscal repair,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 86, no. March, pp. 314–324, 2018, doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.06.041.
- [22] E. Stocco, A. Porzionato, E. De Rose, S. Barbon, R. De Caro, and V. Macchi, *Meniscus regeneration by 3D printing technologies: Current advances and future perspectives*, vol. 13. 2022. doi: 10.1177/20417314211065860.
- [23] A. C. Abraham and T. L. Haut Donahue, “From meniscus to bone: A quantitative evaluation of structure and function of the human meniscal attachments,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 5, pp. 6322–6329, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.01.031.
- [24] N. N. DePhillipo *et al.*, “Quantitative and Qualitative Assessment of the Posterior Medial Meniscus Anatomy: Defining Meniscal Ramp Lesions,” *Am. J. Sports Med.*, vol. 47, no. 2, pp. 372–378, 2019, doi: 10.1177/0363546518814258.
- [25] F. Flandry and G. Hommel, “Normal anatomy and biomechanics of the knee,” *Sports Med. Arthrosc.*, vol. 19, no. 2, pp. 82–92, 2011, doi: 10.1097/JSA.0b013e318210c0aa.
- [26] T. Brindle, J. Nyland, and D. L. Johnson, “The Meniscus: Review of Basic Principles with Application to Surgery and Rehabilitation,” *J. Athl. Train.*, vol. 36, no. 2, pp. 160–169, 2001.
- [27] T. Pufe *et al.*, “Endostatin/collagen XVIII - An inhibitor of angiogenesis - Is expressed in cartilage and fibrocartilage,” *Matrix Biol.*, vol. 23, no. 5, pp. 267–276, 2004, doi: 10.1016/j.matbio.2004.06.003.
- [28] A. McAlinden, J. Dudhia, M. C. Bolton, P. Lorenzo, D. Heinegård, and M. T. Bayliss, “Age-related changes in the synthesis and mRNA expression of decorin and aggrecan in human meniscus and articular cartilage,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 9, no. 1, pp. 33–41, 2001, doi: 10.1053/joca.2000.0347.
- [29] E. A. Makris, P. Hadidi, and K. A. Athanasiou, “The knee meniscus: Structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 30, pp. 7411–7431, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.037.
- [30] enciclopedia médica A.D.A.M, “Artroscopia de rodilla - Serie — Anatomía normal,”

2019. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003247.htm>
- [31] M. A. Sweigart and K. A. Athanasiou, "Toward tissue engineering of the knee meniscus," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 111–129, 2001, doi: 10.1089/107632701300062697.
- [32] J. M. Oliveira, S. Pina, R. L. Reis, and J. S. Roman, *Osteochondral Tissue Engineering*, vol. 1059. 2018. doi: 10.1007/978-3-319-76735-2\_13.
- [33] A. K. Devaraj, K. K. V Acharya, and R. Adhikari, "Comparison of Biomechanical Parameters between Medial and Lateral Compartments of Human Knee Joints," *Open Biomed. Eng. J.*, vol. 14, no. 1, pp. 74–86, 2020, doi: 10.2174/1874120702014010074.
- [34] A. M. Johannsen, D. M. Civitarese, J. R. Padalecki, M. T. Goldsmith, C. A. Wijdicks, and R. F. Laprade, "Qualitative and quantitative anatomic analysis of the posterior root attachments of the medial and lateral menisci," *Am. J. Sports Med.*, vol. 40, no. 10, pp. 2342–2347, 2012, doi: 10.1177/0363546512457642.
- [35] G. J. Klarmann, J. Gaston, and V. B. Ho, "A review of strategies for development of tissue engineered meniscal implants," *Biomater. Biosyst.*, vol. 4, no. August, p. 100026, 2021, doi: 10.1016/j.bbiosy.2021.100026.
- [36] A. A. De Smet, "How I diagnose meniscal tears on knee MRI," *Am. J. Roentgenol.*, vol. 199, no. 3, pp. 181–499, 2012, doi: 10.2214/AJR.12.8663.
- [37] L. Kluyskens, P. Debieux, K. L. Wong, A. J. Krych, and D. B. F. Saris, "Biomaterials for meniscus and cartilage in knee surgery: State of the art," *J. ISAKOS*, vol. 7, no. 2, p. 67, 2021, doi: 10.1136/jisakos-2020-000600.
- [38] H. Pereira *et al.*, "Meniscal allograft transplants and new scaffolding techniques," *EFORT Open Rev.*, vol. 4, no. 6, pp. 279–295, 2019, doi: 10.1302/2058-5241.4.180103.
- [39] N. Lefevre, J. F. Naouri, S. Herman, A. Gerometta, S. Klouche, and Y. Bohu, "A Current Review of the Meniscus Imaging: Proposition of a Useful Tool for Its Radiologic Analysis," *Radiol. Res. Pract.*, vol. 2016, pp. 1–25, 2016, doi: 10.1155/2016/8329296.
- [40] C. Toanen *et al.*, "Polyurethane Meniscal Scaffold for the Treatment of Partial Meniscal Deficiency: 5-Year Follow-up Outcomes: A European Multicentric Study," *Am. J. Sports Med.*, vol. 48, no. 6, pp. 1347–1350, 2020, doi: 10.1177/0363546520913528.
- [41] F. de Caro, F. Perdisa, A. Dhollander, R. Verdonk, and P. Verdonk, "Meniscus Scaffolds for Partial Meniscus Defects," *Clin. Sports Med.*, vol. 39, no. 1, pp. 83–92, 2020, doi: 10.1016/j.csm.2019.08.011.
- [42] R. E. Morales *et al.*, "Reunión multidisciplinaria de expertos en diagnóstico y tratamiento de pacientes con osteoartritis. Actualización basada en evidencias," *Med. Interna Mex.*, vol. 29, no. 1, pp. 67–92, 2013.
- [43] J. Sanchez-Adams and K. A. Athanasiou, "The knee meniscus: A complex tissue of diverse cells," *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 2, no. 3, pp. 332–340, 2009, doi: 10.1007/s12195-009-0066-6.
- [44] M. De Bruycker, P. C. M. Verdonk, and R. C. Verdonk, "Meniscal allograft transplantation: A meta-analysis," *Sicot-J*, vol. 3, 2017, doi: 10.1051/sicotj/2017016.
- [45] P. Ripoll, J. Vaquero, and F. Forriol, "Trasplante de menisco y plantillas de colágeno," vol. 5, no. 4, pp. 339–353, 2009.
- [46] L. McCann, E. Ingham, Z. Jin, and J. Fisher, "Influence of the meniscus on friction

- and degradation of cartilage in the natural knee joint,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 17, no. 8, pp. 995–1000, 2009, doi: 10.1016/j.joca.2009.02.012.
- [47] R. A. Rahman, M. A. A. Radzi, N. M. Sukri, N. M. Nazir, and M. Sha’ban, “Tissue engineering of articular cartilage: From bench to bed-side,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1007/s13770-014-9044-8.
- [48] N. Vázquez-Portalatín, C. E. Kilmer, A. Panitch, and J. C. Liu, “Characterization of Collagen Type i and II Blended Hydrogels for Articular Cartilage Tissue Engineering,” *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 10, pp. 3145–3152, 2016, doi: 10.1021/acs.biomac.6b00684.
- [49] A. Adri and C. Ju, “Fabricación de un sustituto de menisco en impresora 3D suplementado con células troncales mesenquimales provenientes de médula osea humana,” no. February, 2020, doi: 10.13140/RG.2.2.17335.47529.
- [50] J. K. ˇcek and J. Yang, “Hydrogels as smart biomaterials,” *Polym Int*, vol. 55, no. November 2007, pp. 961–969, 2006, doi: 10.1002/pi.
- [51] J. Zhu and R. E. Marchant, “Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds,” *Expert Rev.Med.Devices*, vol. 8, no. 5, pp. 607–626, 2011.
- [52] A. Ramirez, J. L. Benítez, L. R. De Astudillo, and B. R. De Gáscue, “Materiales polimeros de tipo hidrogeles: Revisión sobre su caracterización mediante FTIR, DSC, MEB y MET,” *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.*, vol. 36, no. 2, pp. 108–130, 2016.
- [53] a. Arredondo-Peñaranda and M. E. Londoño-López, “Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos,” *Rev. Ing. Biomédica*, vol. 3, pp. 83–94, 2014, [Online]. Available: <http://repository.eia.edu.co/handle/11190/468>
- [54] P. C. Loras, “Hidrogeles biodegradables para la regeneración de cartílago articular,” pp. 1–46, 2014.
- [55] P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, W. E. Hennink, and F. Alhaique, “Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 9, pp. 1172–1187, 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.04.002.
- [56] N. A. Peppas and D. S. Van Blarcom, “Hydrogel-based biosensors and sensing devices for drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 240, pp. 142–150, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.022.
- [57] W. Wang, Y. Zhang, and W. Liu, “Bioinspired fabrication of high strength hydrogels from non-covalent interactions,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 71, pp. 1–25, 2017, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2017.04.001.
- [58] Y. J. Chuah, Y. Peck, J. E. J. Lau, H. T. Hee, and D. A. Wang, “Hydrogel based cartilaginous tissue regeneration: Recent insights and technologies,” *Biomater. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 613–631, 2017, doi: 10.1039/c6bm00863a.
- [59] S. Y. Zheng *et al.*, “Metal-Coordination Complexes Mediated Physical Hydrogels with High Toughness, Stick-Slip Tearing Behavior, and Good Processability,” *Macromolecules*, vol. 49, no. 24, pp. 9637–9646, 2016, doi: 10.1021/acs.macromol.6b02150.
- [60] Y. Liu, W. He, Z. Zhang, and B. P. Lee, “Recent developments in tough hydrogels for biomedical applications,” *Gels*, vol. 4, no. 2, 2018, doi: 10.3390/gels4020046.
- [61] N. Davidenko, J. J. Campbell, E. S. Thian, C. J. Watson, and R. E. Cameron, “Collagen-hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering,” *Acta Biomater.*,

- vol. 6, no. 10, pp. 3957–3968, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.05.005.
- [62] K. Henriksen and M. A. Karsdal, *Type I collagen*, Second Edi., vol. 2. Elsevier Inc., 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-817068-7.00001-X.
- [63] A. González-jiménez and A. García, “in Bone Tissue Infections,” vol. 5, pp. 27–36, 2020.
- [64] B. Kaczmarek *et al.*, “In vivo study on scaffolds based on chitosan, collagen, and hyaluronic acid with hydroxyapatite,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 118, pp. 938–944, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.175.
- [65] P. de F. Rosa, S. S. R. Cirqueira, M. L. Aguiar, and A. Bernardo, “Synthesis and characterization of silver nanoparticles,” *Mater. Sci. Forum*, vol. 802, pp. 135–139, 2014, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.802.135.
- [66] L. Palliyaguru *et al.*, “Silver Nano-Particles from Diesel Particulate Matter: An Environmental Pollutant to a Potential Antimicrobial Agent and a Photocatalyst,” *Int. J. Sci. Res. Publ.*, vol. 9, no. 5, p. p8992, 2019, doi: 10.29322/ijrsp.9.05.2019.p8992.
- [67] X. Chen and H. J. Schluesener, “Nanosilver: A nanoproduct in medical application,” *Toxicol. Lett.*, vol. 176, no. 1, pp. 1–12, 2008, doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004.
- [68] H. Jiang, S. Manolache, A. C. L. Wong, and F. S. Denes, “Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 93, no. 3, pp. 1411–1422, 2004, doi: 10.1002/app.20561.
- [69] M. Monge, “Anales RSEQ,” *www.rseq.org An. Quím*, vol. 105, no. 1, pp. 33–41, 2009, [Online]. Available: www.rseq.org
- [70] A. Irastorza, I. Zarandona, M. Andonegi, P. Guerrero, and K. de la Caba, “The versatility of collagen and chitosan: From food to biomedical applications,” *Food Hydrocoll.*, vol. 116, no. December 2020, p. 106633, 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106633.
- [71] Q. A. Majid *et al.*, “Natural Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering: A Highly Biocompatible Solution,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 7, no. October, pp. 1–32, 2020, doi: 10.3389/fcvm.2020.554597.
- [72] Z. Mbese, S. Alven, and B. Aderibigbe, “Collagen-Based Nanofibers for Skin Regeneration and Wound,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, p. 4368, 2021.
- [73] E. Connect, “Colágenos : tipos , composición , características y distribución en tejidos,” 2019. <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/colagenos-tipos-composicion-distribucion-tejidos>
- [74] E. Jeevithan, B. Bao, Y. Bu, Y. Zhou, Q. Zhao, and W. Wu, “Type II collagen and gelatin from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) cartilage: Isolation, purification, physicochemical and antioxidant properties,” *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 7, pp. 3852–3873, 2014, doi: 10.3390/md12073852.
- [75] S. A. Oh *et al.*, “Collagen three-dimensional hydrogel Matrix carrying basic fibroblast growth factor for the cultivation of mesenchymal stem cells and osteogenic differentiation,” *Tissue Eng. - Part A*, vol. 18, no. 9–10, pp. 1087–1100, 2012, doi: 10.1089/ten.tea.2011.0360.
- [76] R. C. Gupta, *Nutraceuticals in arthritis*. Elsevier Inc., 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00013-9.
- [77] G. S. Alvarez, C. Hélyary, A. M. Mebert, X. Wang, T. Coradin, and M. F. Desimone, “Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged

- antimicrobial activity for wound infection prevention,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 29, pp. 4660–4670, 2014, doi: 10.1039/c4tb00327f.
- [78] M. C. L. Ramos, B. M. Novelo, J. J. D. García, and L. E. C. Torres, “Efecto de la aplicación de hidrogeles de colágeno, oligouretano y sílice en la curación de heridas cutáneas,” pp. 294–297.
- [79] A. Sionkowska *et al.*, “3D composites based on the blends of chitosan and collagen with the addition of hyaluronic acid,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 89, pp. 442–448, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.085.
- [80] Y. Xue, H. Chen, C. Xu, D. Yu, H. Xu, and Y. Hu, “Synthesis of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking the mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid and low-molecular-weight hyaluronic acid with 1,4-butanediol diglycidyl ether,” *RSC Adv.*, vol. 10, no. 12, pp. 7206–7213, 2020, doi: 10.1039/c9ra09271d.
- [81] M. R. El-Aassar, O. M. Ibrahim, M. M. G. Fouda, N. G. El-Beheri, and M. M. Agwa, “Wound healing of nanofiber comprising Polygalacturonic/Hyaluronic acid embedded silver nanoparticles: In-vitro and in-vivo studies,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 238, no. March, p. 116175, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116175.
- [82] N. V. Rao, *Hyaluronic acid-based hydrogels for tissue engineering*. LTD, 2020. doi: 10.1016/b978-0-08-102906-0.00014-3.
- [83] X. Xu, A. K. Jha, D. A. Harrington, M. C. Farach-Carson, and X. Jia, “Hyaluronic acid-based hydrogels: From a natural polysaccharide to complex networks,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 12, pp. 3280–3294, 2012, doi: 10.1039/c2sm06463d.
- [84] M. E. I. Badawy and E. I. Rabea, “A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection,” *Int. J. Carbohydr. Chem.*, vol. 2011, pp. 1–29, 2011, doi: 10.1155/2011/460381.
- [85] A. Anitha *et al.*, “Chitin and chitosan in selected biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no. 9, pp. 1644–1667, 2014, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008.
- [86] J. Novaes, E. A. Da Silva Filho, P. M. F. Bernardo, and E. R. Yapuchura, “Preparation and characterization of Chitosan/Collagen blends containing silver nanoparticles,” *Polimeros*, vol. 30, no. 2, pp. 2–6, 2020, doi: 10.1590/0104-1428.00919.
- [87] A. Sionkowska, K. Lewandowska, S. Grabska, B. Kaczmarek, and M. Michalska, “Physico-chemical properties of three-component mixtures based on chitosan, hyaluronic acid and collagen,” *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 640, no. 1, pp. 21–29, 2016, doi: 10.1080/15421406.2016.1255501.
- [88] V. Bambole and J. V. Yakhmi, *Tissue engineering: Use of electrospinning technique for recreating physiological functions*. Elsevier Inc., 2016. doi: 10.1016/B978-0-323-42865-1.00014-3.
- [89] J. H. Lee and H. W. Kim, “Emerging properties of hydrogels in tissue engineering,” *J. Tissue Eng.*, vol. 9, pp. 0–3, 2018, doi: 10.1177/2041731418768285.
- [90] H. Zhao, M. Liu, Y. Zhang, J. Yin, and R. Pei, “Nanocomposite hydrogels for tissue engineering applications,” *Nanoscale*, vol. 12, no. 28, pp. 14976–14995, 2020, doi: 10.1039/d0nr03785k.
- [91] Y. Zhong, X. Zhao, G. Li, D. Zhang, and D. Wang, “Mussel-inspired hydrogels as tissue adhesives for hemostasis with fast-forming and self-healing properties,” *Eur. Polym. J.*, vol. 148, no. December 2020, p. 110361, 2021, doi:

- 10.1016/j.eurpolymj.2021.110361.
- [92] M. Farokhi, F. Jonidi Shariatzadeh, A. Solouk, and H. Mirzadeh, “Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 69, no. 4, pp. 230–247, 2020, doi: 10.1080/00914037.2018.1562924.
- [93] A. P. Stylianoul, T. M. Guess, and M. Kia, “Multibody muscle driven model of an instrumented prosthetic knee during squat and toe rise motions,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 135, no. 4, pp. 1–14, 2013, doi: 10.1115/1.4023982.
- [94] R. Cancedda, B. Dozin, P. Giannoni, and R. Quarto, “Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone,” *Matrix Biol.*, vol. 22, no. 1, pp. 81–91, 2003, doi: 10.1016/S0945-053X(03)00012-X.
- [95] A. Eftekhari *et al.*, “The use of nanomaterials in tissue engineering for cartilage regeneration; current approaches and future perspectives,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 2, 2020, doi: 10.3390/ijms21020536.
- [96] N. Eslahi, M. Abdorahim, and A. Simchi, “Smart Polymeric Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering: A Review on the Chemistry and Biological Functions,” *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 11, pp. 3441–3463, 2016, doi: 10.1021/acs.biomac.6b01235.
- [97] Dynapro, “Bioimpresión : qué es y cómo puede aplicarse,” 2021. <https://dynapro3d.com/bioimpresion-puede-aplicarse/>
- [98] X. N. Zhang, Q. Zheng, and Z. L. Wu, “Recent advances in 3D printing of tough hydrogels: A review,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 238, no. April, p. 109895, 2022, doi: 10.1016/j.compositesb.2022.109895.
- [99] C. Adragna and S. Jurczyszyn, “Impresión 3D y caracterización de andamios de colágeno extraído de piel porcina para uso biomédico,” *La Biomed. en un Futur.*, p. 49, 2018, [Online]. Available: [https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/6522/Proyecto Integrador Adragna-Jurczyszyn.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/6522/Proyecto%20Integrador%20Adragna-Jurczyszyn.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [100] Y. S. Zhang and A. Khademhosseini, “Advances in engineering hydrogels,” *Science (80-. )*, vol. 356, no. 6337, 2017, doi: 10.1126/science.aaf3627.
- [101] X. Barceló, S. Scheurer, R. Lakshmanan, and C. J. Moran, “3D bioprinting for meniscus tissue engineering: a review of key components, recent developments and future opportunities,” *J. 3D Print. Med.*, vol. 5, no. 4, pp. 178–187, 2021, doi: 10.2217/3dp-2021-0017.
- [102] Y. Qin, X. Ji, J. Jing, H. Liu, H. Wu, and W. Yang, “Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 372, no. 1–3, pp. 172–176, 2010, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.10.013.
- [103] F. Yang, V. Tadepalli, and B. J. Wiley, “3D Printing of a Double Network Hydrogel with a Compression Strength and Elastic Modulus Greater than those of Cartilage,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 5, pp. 863–869, 2017, doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00094.
- [104] A. Ábalos-Rodríguez, I. Aguilera-Rodríguez, M. Casals-Hung, I. Pérez-Portuondo, and R. Pérez-Silva, “Evaluación mediante espectrofotometría UV-VIS derivativa de la degradación del 2-clorofenol,” *Rev. Cuba. Química*, vol. 25, no. 3, pp. 318–327, 2013, [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543736008.pdf>
- [105] S. Samimi, N. Maghsoudnia, R. B. Eftekhari, and F. Dorkoosh, *Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems*. Elsevier Inc., 2018. doi: 10.1016/B978-0-

- 12-814031-4.00003-9.
- [106] A. C. Manrique, “Fraccionamiento de nanopartículas de plata coloidal sintetizadas por reducción química mediante métodos híbridos de separación por membranas,” p. 45, 2014.
- [107] L. Kvítek *et al.*, “Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs),” *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 15, pp. 5825–5834, 2018, doi: 10.1021/jp711616v.
- [108] A. Bruinink, J. Wang, and P. Wick, “Effect of particle agglomeration in nanotoxicology,” *Arch. Toxicol.*, vol. 89, no. 5, pp. 659–675, 2015, doi: 10.1007/s00204-015-1460-6.
- [109] J. P. Gallo Ramírez and C. P. Ossa Orozco, “Fabricación y caracterización de nanopartículas de plata con potencial uso en el tratamiento del cáncer de piel,” *Ing. y Desarro.*, vol. 37, no. 01, pp. 88–104, 2022, doi: 10.14482/inde.37.1.6201.
- [110] A. Barbasz, M. Oćwieja, N. Piergies, D. Duraczyńska, and A. Nowak, “Antioxidant-modulated cytotoxicity of silver nanoparticles,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 41, no. 11, pp. 1863–1878, 2021, doi: 10.1002/jat.4173.
- [111] C. Kostigen Mumper, A. K. Ostermeyer, L. Semprini, and T. S. Radniecki, “Influence of ammonia on silver nanoparticle dissolution and toxicity to *Nitrosomonas europaea*,” *Chemosphere*, vol. 93, no. 10, pp. 2493–2498, 2013, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.08.098.
- [112] L. Argueta Figueroa, M. C. Arenas-Arrocena, A. P. Díaz-Herrera, S. V. García-Benítez, and R. García-Contreras, “Propiedades antimicrobianas y citotóxicas de un adhesivo de uso ortodóncico adicionado con nanopartículas de plata TT - Antimicrobial and cytotoxic properties of an orthodontic adhesive added with silver nanoparticles applications,” *Mundo nano. Rev. Interdiscip. en nanociencias y nanotecnología*, vol. 12, no. 22, pp. 1–13, 2019, [Online]. Available: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2448-56912019000100004&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.mx/pdf/mn/v12n22/2448-5691-mn-12-22-00004.pdf](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-56912019000100004&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.mx/pdf/mn/v12n22/2448-5691-mn-12-22-00004.pdf)
- [113] R. Chytilék, O. Eibl, L. Hrbková, J. Zagraban, and J. Janovský, “Appearance as a cognitive shortcut in political judgment: An experimental study of the impact of stereotypes on politicians’ evaluation in an issue-rich environment,” *Soc. Stud. Stud.*, vol. 11, no. 1, pp. 81–108, 2014, doi: 10.5817/soc2014-1-81.
- [114] M. F. Queiroz, K. R. T. Melo, D. A. Sabry, G. L. Sasaki, and H. A. O. Rocha, “Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?,” *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 1, pp. 141–158, 2015, doi: 10.3390/md13010141.
- [115] R. Sripriya and R. Kumar, “A Novel Enzymatic Method for Preparation and Characterization of Collagen Film from Swim Bladder of Fish Rohu (&lt;i>Labeo rohita&lt;/i>),” *Food Nutr. Sci.*, vol. 06, no. 15, pp. 1468–1478, 2015, doi: 10.4236/fns.2015.615151.
- [116] A. A. Mohammed and A. K. Niamah, “Identification and antioxidant activity of hyaluronic acid extracted from local isolates of *Streptococcus thermophilus*,” *Mater. Today Proc.*, vol. 60, no. December, pp. 1523–1529, 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2021.12.038.
- [117] H. Xu *et al.*, “Preparation and characterization of injectable chitosan-hyaluronic acid hydrogels for nerve growth factor sustained release,” *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 32, no. 2, pp. 146–162, 2017, doi: 10.1177/0883911516662068.

- [118] T. ALTUN, "PREPARATION AND APPLICATION OF GLUTARALDEHYDE CROSS-LINKED CHITOSAN COATED BENTONITE CLAY CAPSULES: CHROMIUM(VI) REMOVAL FROM AQUEOUS SOLUTION," *Rev. Chil Chem Soc*, vol. 65, no. 2, pp. 1–8, 2020.
- [119] R. Vulpe *et al.*, "Rheological study of in-situ crosslinkable hydrogels based on hyaluronan acid, collagen and sericin," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 388–397, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.07.003.
- [120] T. G. M. Van De Ven, *The flow of suspensions*, vol. 6, no. 4. 1985. doi: 10.1002/pc.750060405.
- [121] M. J. Hajipour *et al.*, "Antibacterial properties of nanoparticles," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 499–511, 2012, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
- [122] L. Barbeş, C. Rădulescu, and C. Stih, "ATR-FTIR spectrometry characterisation of polymeric materials," *Rom. Reports Phys.*, vol. 66, no. 3, pp. 765–777, 2014.
- [123] V. E. E. Falconí, "Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM) Disertación," *Khatulistiwa Inform.*, no. 2, pp. 124–133, 2015.
- [124] O. Eduardo and M. Cruz, "PLASMÓNICOS EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE GRAFENO OXIDADO ( GO ) PARA ESPECTROSCOPIA SERS " Presenta : Omar Eduardo Melo Cruz," 2020.
- [125] M. Picollo, M. Aceto, and T. Vitorino, "UV-Vis spectroscopy," *Phys. Sci. Rev.*, vol. 4, no. 4, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1515/psr-2018-0008.
- [126] N. Gohain, "Studies on the structure and function of phenazine modifying enzymes PhzM and PhzS involved in the biosynthesis of pyocyanin," *Phd Thesis*, no. January 2009, 2008, doi: 10.17877/DE290R-8364.
- [127] H. Tiernan, B. Byrne, and S. G. Kazarian, "ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 241, p. 118636, 2020, doi: 10.1016/j.saa.2020.118636.
- [128] A. J. Margenot, F. J. Calderón, K. W. Goyne, F. N. Dmukome, and S. J. Parikh, "IR spectroscopy, soil analysis applications," *Encycl. Spectrosc. Spectrom.*, pp. 448–454, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12170-5.
- [129] A. Ausili, M. Sánchez, and J. C. Gómez-Fernández, "Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins," *Biomed. Spectrosc. Imaging*, vol. 4, no. 2, pp. 159–170, 2015, doi: 10.3233/bsi-150104.
- [130] A. Ul-Hamid, *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. 2018. doi: 10.1007/978-3-319-98482-7.
- [131] M. Ipohorski and P. Bozzano, "Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales," *Cienc. Invest.*, vol. 63, no. 3, pp. 43–53, 2013, [Online]. Available: <http://aargentnapciencias.org/wp-content/uploads/2018/01/RevistasCeI/tomo63-3/5-MICROSCOPIA-ELECTRONICA-DE-BARRIDO-EN-LA-CARACTERIZACION-DE-MATERIALES-cei63-3-2013-5.pdf>
- [132] C. Urbina Denavarro *et al.*, "Análisis morfológico comparativo de hidrogeles copolímeros por microscopía electrónica de barrido," *Acta Microsc.*, vol. 25, no. 2, pp. 111–120, 2016.

- [133] S. Falke and C. Betzel, *Dynamic Light Scattering (DLS)*. Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-28247-9\_6.
- [134] Guialab, “Comprendiendo y desafiando los límites de la técnica DLS,” 2018. <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/comprendiendo-y-desafiando-los-limites-de-la-tecnica-dls/>
- [135] A. J. Shnoudeh *et al.*, *Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles*. Elsevier Inc., 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9.
- [136] M. Goetz, “Extremely Sensitive Optical Detection Systems for Stopped-Flow Measurements of Reactions With Very High Rate Constants or Small Absorbance Changes,” *Berichte der Bunsengesellschaft/Physical Chem. Chem. Phys.*, vol. 91, no. 6, pp. 616–619, 1987, doi: 10.1002/bbpc.19870910608.
- [137] A. Ramirez, J. Benitez, D. Contreras, P. Guzman, and B. R. de Gáscue, “INTERACCIONES DE HIDROGELES DE POLI ( ACRILAMIDA – co – ÁCIDO ITACÓNICO ) ESTUDIADAS EN SOLUCIONES DE Ca ( NO 3 ) 21,” *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 12, no. 6, pp. 308–316, 2011.
- [138] T. Caykara, S. Kiper, and G. Demirel, “Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: Synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants,” *Eur. Polym. J.*, vol. 42, no. 2, pp. 348–355, 2006, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2005.07.006.
- [139] H. . Ramming and Z. K. Elsevier, “Numerical Modelling of Marine Hydrodynamics,” *Adv. Ser. Ocean Eng.*, vol. 47, pp. 315–337, 2019, doi: 10.1142/9789813275911\_0010.
- [140] G. Stojkov, Z. Niyazov, F. Picchioni, and R. K. Bose, “Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications,” *Gels*, vol. 7, no. 4, 2021, doi: 10.3390/gels7040255.
- [141] T. E. of E. Britannica, ““viscosity,”” *Encyclopedia Britannica*, 2022. <https://www.britannica.com/science/viscosity>. Accessed 28 June 2022.
- [142] J. C. Garcia, “Viscoelasticidad,” p. 33, 2008, [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/10045/3624>
- [143] S. Avgeri, M. J. Assael, M. L. Huber, and R. A. Perkins, “Reference Correlation of the Viscosity of Benzene from the Triple Point to 675 K and up to 300 MPa,” *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 43, no. 3, 2014, doi: 10.1063/1.4892935.
- [144] M. J. Assael *et al.*, “Reference Values and Reference Correlations for the Thermal Conductivity and Viscosity of Fluids,” *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 47, no. 2, 2018, doi: 10.1063/1.5036625.
- [145] P. T. Oliag, “Caracterización del un alimento mediante un ensayo oscilatorio,” *Univ. Politécnica València*, pp. 1–6, 2016.
- [146] M. Dogan, A. Kayacier, Ö. S. Toker, M. T. Yilmaz, and S. Karaman, “Steady, Dynamic, Creep, and Recovery Analysis of Ice Cream Mixes Added with Different Concentrations of Xanthan Gum,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 6, no. 6, pp. 1420–1433, 2013, doi: 10.1007/s11947-012-0872-z.
- [147] N. Allocati, M. Masulli, M. F. Alexeyev, and C. Di Ilio, “Escherichia coli in Europe: An overview,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 10, no. 12, pp. 6235–6254, 2013, doi: 10.3390/ijerph10126235.
- [148] D. Paredes, C. Ortiz, and R. Torres, “Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA),” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9,

- no. 1, pp. 1717–1729, 2014, doi: 10.2147/IJN.S57156.
- [149] I. D. E. B. Department of Health, Epidemiology and Response Division, “¿Qué es el SARM?,” *Man. Investig. Control Sel. Commun. Dis.*, no. December, p. 1, 2018.
- [150] N. V. Ayala-Núñez, H. H. Lara Villegas, L. Del Carmen Ixtepan Turrent, and C. Rodríguez Padilla, “Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant staphylococcus aureus: Nanoscale does matter,” *Nanobiotechnology*, vol. 5, no. 1–4, pp. 2–9, 2009, doi: 10.1007/s12030-009-9029-1.
- [151] M. A. C. J. R. AGUILERA and M. E. Y. M. ROMERO, “Manual de laboratorio de HMA.pdf,” *Univ. VERACRUZANA*, pp. 16–23, 2018.
- [152] N. R. Albany, J. A. Vilchez, S. León, A. R. Nava, L. J. Martínez, and M. A. Molina, “Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.),” *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 17, no. 1, pp. 24–31, 2015, doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50669.
- [153] X. Mora, “Bacterias Gram positivas y Gram negativas,” *Sel. Avícolas*, p. 3, 2012, [Online]. Available: <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf>
- [154] B. T. Fernández, “Estudio de las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata,” *Univ. Sevilla*, p. 39, 2017, [Online]. Available: [https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/66375/Fernández Bueno%2C Teresa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/66375/Fernández%20Teresa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [155] J. Echeverry-Chica, A. Naranjo-Díaz, and P. Araque-Marín, “Nanopartículas de plata funcionalizadas in situ con D-limoneno: efecto en la actividad antibacteriana,” *Rev. ION*, vol. 33, no. 1, pp. 79–92, 2020, doi: 10.18273/revion.v33n1-2020008.
- [156] Felipe Andrés OLate Moya, “Con Óxido De Grafeno Para Impresión 3D De,” p. 93, 2020.
- [157] R. Kikinis, S. Pieper, J. Christophe, and F. Robin, “3D Slicer image computing platform | 3D Slicer,” 2020. <https://www.slicer.org/>