



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigación Químico Biológicas
Doctorado en Ciencias Químicas

Síntesis de Materiales Nanoestructurados
Base Biopolímeros Asistida por Disolventes
Eutécticos Profundos (DES)

Tesis

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas
presenta:

M.C. Luis Humberto Delgado Rangel

Directores de tesis:

Dra. Janett Betzabe González Campos
(Directora de tesis)

Dr. Josué David Mota Morales
(Co-director de tesis)



Morelia Michoacán, Junio de 2023

Dedicatoria

*A Mayra que ha sido mi soporte y cuyo amor me ha llenado de felicidad desde
que la conocí.*

*Y por su puesto a Jani quien siempre me enseña cosas nuevas, y con solo su
presencia logra que pueda sonreír.*

Agradecimientos

Primero que nada a las instituciones que han hecho esto posible, el IIQB y el programa de doctorado en ciencias químicas, a la UMSNH y al CONAHCYT.

A la Dra. J. Betzabe González Campos, directora de este proyecto, a quien agradezco su paciencia, su apoyo y sobre todo el que creyera no solo en este proyecto sino también en mí. La admiración que tengo hacia usted como investigadora, como madre, como persona es muchísima, es de verdad un ejemplo de profesionalidad y calidez humana que se refleja en el cariño y respeto que todos los que hemos compartido la suerte de estar en su grupo de trabajo le tenemos.

Al Dr. Josué David Mota Morales co-director de este proyecto, gracias por sus comentarios siempre certeros y enriquecedores, gracias por no ser un simple espectador, y siempre haber estado presente para brindarnos su apoyo con dudas, material, equipo e incluso colaboraciones.

Al comité sinodal, D.C. Judit A. Aviña Verduzco, D.C. Yliana López Castro y el D.C. Manuel Arroyo Albitar, sus comentarios, preguntas y crítica siempre constructiva ayudó a que este proyecto y mi formación académica fueran de mejor calidad. Adicionalmente agradezco a la D.C. Yliana por su apoyo desde la coordinación académica del programa de doctorado.

Agradezco también al D.C. Juan Pablo quien nos apoya siempre con una sonrisa en la obtención de los espectros de IR así como en detalles técnicos que pueden pasar en el laboratorio. y al D.C. Álvaro que nos ayudó con las muestras que se analizaron en CFATA UNAM.

Un agradecimiento especial a todo el personal académico, administrativo y de mantenimiento que forman parte del IIQB y facilitan la estancia en el mismo.

A la Dra. Claudia quien me dio espacio para realizar labores de divulgación, que es un área de la ciencia que me fascina, gracias por escuchar y apoyar mis propuestas, pero sobre todo gracias por brindarme su confianza y amistad.

Agradezco a todos los compañeros del IIQB, ya sea que tuviera la oportunidad de convivir o no con ellos. Gracias a los que les dieron un voto de confianza al ser partícipes del programa de *Pláticas de Ciencia y Divulgación*. Me habría encantado poder platicar con cada uno de ustedes. Y con respecto a divulgación, agradezco al M. en C. Uber y la M. en C. Katia, con quienes coincidí gracias a la divulgación y a quienes admiro su labor en esa área. Gracias especiales a quienes como yo fueron o son parte del grupo de trabajo de la Dra. Betzabe, los de un principio, Ale, Fanny e Ismael, a los más recientes, Liz, Vane, Andrés y Antonio, si bien no fue posible convivir de la misma manera con todos la verdad es que a todos los aprecio y les brindo mi amistad sincera.

A las chicas y chicos de que han trabajado conmigo realizando su tesis o servicio social, Roció, Diana, Verónica, Karina, Pedro, Sergio y Leonardo. Gracias por confiar en mí y trabajar siempre con ánimo.

Algunos agradecimientos especiales:

- A Ale y Mario a quienes considero amigos y con quienes disfruto siempre de una buena plática, gracias Ale por tu contribución en este proyecto y a los dos por sus buenos consejos, los admiro a ambos en individual y como pareja.
- A Fanny a quien además de su amistad, le agradezco el cariño que le tiene a Jani y su apoyo en este proyecto el cual fue de gran importancia. Espero seguir colaborando contigo.
- A Vianey, gracias por tu amistad y confianza, en poco tiempo nos hicimos buenos amigos y espero que seamos amigos por mucho tiempo.
- A mis amigas de la prepa y la licenciatura que aun a la distancia siguen dándome ánimos y consejos, Lluvia, Liz, Olguita, Brenda, Marianne, Andrea y mi querida Faby que en paz descanse, gracias por su amistad.

Para finalizar quiero agradecer a mi familia, mi mamá, mis hermanos Manuel y Francisco, y claro Marito que junto a mi papá nos dan su apoyo desde el lugar donde sus almas descansan. A la familia de Mayra (la Sra. Agustina, Lupe, Cynthia, Nancy, Raúl y Luis, su mamá, hermanas y hermanos respectivamente, pero también a los que no son tan directos, Gera, y Wilber esposos de Nancy y Lupe, Sirenia y su esposo Usiel, Eva incluida, el Sr

Clemente y su esposa Ilda) quienes nos apoyan de muchas maneras y a quienes les tengo gran cariño y les agradezco todo lo que hacen por Mayra, por Janikua y por mí. Y claro está, el agradecimiento más grande es para Mayra y Janikua a quienes amo y admiro, son parte clave de mi felicidad, gracias por su paciencia, por su cariño, por sus palabras, son la *nur* de mis ojos y el regalo más grande que me dio esta vida.

Contenido

Abstract.....	1
Resumen.....	3
Palabras clave.....	4
Presencia en congresos y artículos publicados.....	5
1. Introducción	6
2. Justificación	10
3. Hipótesis	11
4. Objetivos.....	12
4.1. Objetivo general	12
4.2. Objetivos específicos	12
5. Antecedentes	14
5.1. Biopolímeros	14
5.2. Quitosano y materiales porosos basados en quitosano (CTS)	14
5.3. Separación de fase inducida por evaporación (EIPS).....	17
5.4. Disolventes eutécticos profundos (DES)	19
5.4.1. DES en la preparación de materiales base quitina y quitosano.....	21
5.5. Aplicaciones de materiales porosos basados en quitosano.....	22
6. Metodología	24
6.1. Reactivos	24
6.2. Preparación de soluciones y mezclas	24
6.2.1. Solución de CTS en AA _(ac)	24
6.2.2. Soluciones de PVA	24
6.2.3. Solución de colágeno (CG).....	24
6.2.4. Solución de CTS-CuSO ₄	25
6.2.5. Solución de CTS-MCCu ₂ O.....	25
6.2.6. Soluciones de CTS-AgnP	25
6.2.7. Soluciones de sales de hierro	25
6.2.8. Preparación del DES	26
6.3. Preparación de la AgnP y películas simples de CTS-AgnP	26
6.4. Pruebas de solubilidad de los polímeros en DES	27
6.5. Producción de Materiales Porosos	27
6.5.1. Producción de materiales porosos de CTS puro	27

6.5.2.	Producción de otros biomateriales	27
6.5.3.	Producción de materiales de CTS _{AgnP}	28
6.5.4.	Producción de biomateriales CTS-Cu	28
6.5.5.	Producción de biomateriales CTS-Fe	29
6.6.	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	30
6.7.	Determinación del tamaño de poro.....	30
6.8.	Pruebas de hinchamiento.....	30
6.9.	Porosidad.....	30
6.10.	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)	31
6.11.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA)	32
6.12.	Análisis de la inhibición de la formación de biopelículas de <i>V. cholerae</i> en películas porosas de CTS puro.....	32
6.13.	Evaluación de la viabilidad celular	33
6.14.	Evaluación de la actividad catalítica de materiales de CTS-CuSO ₄	33
7.	Resultados y discusión	35
7.1.	Obtención de películas porosas de quitosano puro	35
7.2.	Optimización de las condiciones para la producción de películas porosas de CTS con mayor porosidad.....	39
7.3.	Producción de monolitos porosos de CTS.....	41
7.4.	Pruebas de hinchamiento (%H).....	47
7.5.	Hinchamiento de películas porosas.....	48
7.6.	Porosidad (%P)	49
7.7.	Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)	51
7.8.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría analítica (TGA).....	55
7.9.	Inhibición de la formación de biopelículas de <i>Vibrio cholerae</i> en superficies de quitosano poroso	57
7.10.	Evaluación de la viabilidad celular	60
7.11.	Biomateriales CTS/alcohol polivinílico (PVA)/colágeno (CG)/CCU	63
7.12.	Biomateriales CTS _{AgnP}	65
7.12.1.	CTS-AgnP 0.1 %p/p	66
7.12.2.	CTS-AgnPs 0.05 %p/p	69
7.13.	Biomateriales CTS-Cu.....	71
7.13.1.	Biomateriales CTSCuSO ₄ , monolitos y películas	71
7.13.2.	Biomateriales CTSMCsCu ₂ O, películas.....	73

7.14. Análisis de la capacidad catalítica	75
7.15. Biomateriales CTS-Fe	76
Conclusiones	80
8. Referencias.....	82

Abstract

The use of biopolymers for the development of new materials is of great importance due to the physical and chemical properties that they possess and that allow them to be used in various applications. One of the most studied biopolymers at the moment is chitosan (CTS), which is a derivative of chitin (the second most abundant biopolymer), and thanks to its chemical structure it can be used in various areas such as tissues engineering where it is used as a scaffold, as a growth inhibitor of fungi and bacteria, in catalysis as a catalytic support, in remediation as an absorbent of dyes and/or metallic species, etc.

Although the study of CTS, both in its physical and chemical characteristics as well as the various applications for its use, is very extensive, the reality is that it is still possible to continue the investigation of this biopolymer, which, although it can be very versatile and can be processed in the form of various materials such as films, hydrogels, sponges and nanofibers, its processing is far from trivial, so alternatives are still being sought that allow obtaining CTS based materials.

In the present study, a new methodology in this type of polymers is used, called Evaporation Induced Phase Separation (EIPS), which allows obtaining sponge-like materials either in the form of porous films or monoliths. To carry out this methodology using CTS, the use of Deep Eutectic Solvents (DES) is essential, which function as non-solvent and porogenic agents. The EIPS methodology with the use of DES is a relatively simple, economical methodology (in the sense that the solvents can be reused and that it does not require the use of very sophisticated equipment), versatile and environmentally friendly, in addition to the fact that this work and the publications derived from are the first antecedents of this methodology using DES.

The research focused on the production of CTS-based porous materials using the EIPS methodology with DES implies not only the use of pure CTS, but also mixtures of CTS with other biopolymers such as collagen (CG), polyvinyl alcohol (PVA) and chondroitin sulfate (CS). In addition to the mixtures of CTS with other biopolymers, the incorporation of metallic species such as silver (Ag), copper (Cu) and Iron (Fe) was explored, either during the preparation of the material or after obtaining the material, especially for the iron species.

The obtained materials were tested for various applications such as: bacterial growth inhibitory agent, scaffold for cellular growth and catalytic support. The exploration of these applications was carried out within the working group or outside of it thanks to collaborations with external research groups. In each case, satisfactory results were observed, which shows the potential of both the methodology and the materials obtained.

Resumen

El quitosano (CTS) es uno de los biopolímeros más estudiados para la producción de biomateriales porosos. Su estructura química biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad permiten su aplicación en diversas áreas, entre ellas la ingeniería de tejidos, donde se usa como andamio celular; como inhibidor del crecimiento de hongos y bacterias; en catálisis como soporte catalítico; en remediación como adsorbente de colorantes y/o especies metálicas, entre muchas otras.

El CTS ha sido ampliamente estudiado en relación a sus características fisicoquímicas y formas de procesamiento para diversas aplicaciones, no obstante, es un biopolímero tan versátil que aún es posible explorar nuevas alternativas de procesamiento; ya que, aunque puede ser producido en forma de películas, hidrogeles, esponjas y nanofibras, su procesamiento dista de ser trivial, por lo que se siguen buscando alternativas que permitan obtener materiales porosos basados en CTS con características únicas que puedan contribuir al desarrollo de materiales funcionales.

En el presente estudio se aborda una metodología antes no aplicada para el procesamiento de este biopolímero, denominada *Separación de Fase Inducida por Evaporación* (EIPS). Esta metodología permite la obtención de materiales tipo esponja en forma de películas porosas y monolitos. Para su aplicación, es indispensable el uso de un *Disolvente Eutéctico Profundo* (DES), el cual funciona como el sistema no disolvente y agente porógeno. Ésta es una técnica simple, económica, versátil y amigable con el medio ambiente, ya que el DES puede ser reutilizado y no se requiere el uso de equipos sofisticados.

La investigación implica no solo el uso de CTS puro, sino también de mezclas de CTS con otros biopolímeros como colágeno (CG), y alcohol polivinílico (PVA). Además de estas mezclas, se exploró la incorporación de especies metálicas de plata (Ag) cobre (Cu) y hierro (Fe), durante la preparación del material o posterior a su obtención, como es el caso de las especies de hierro.

Mediante la exploración de sus propiedades a través de diferentes técnicas, se evidencia que los materiales obtenidos presentan características únicas para su aplicación como agente inhibidor del crecimiento bacteriano, andamio celular y soporte catalítico.

Lo anterior, pone de manifiesto la factibilidad de la metodología IEPS para la producción de materiales altamente funcionales a través de una técnica sencilla y amigable con el ambiente. Este trabajo y las publicaciones derivadas del mismo, son los primeros antecedentes de la aplicación de esta metodología utilizando DES para la producción de materiales porosos basados en CTS.

Palabras clave.

Quitosano, cloruro de colina:urea, andamios celulares, catálisis, EIPS.

Presencia en congresos y artículos publicados.

Los resultados de este trabajo han sido presentados en diferentes foros nacionales e internacionales como es el caso de:

- Congreso Nacional de Ciencia Tecnología e Investigación, en su edición del 2017, 2018, 2019, 2020, y 2021.
- Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, en su 16ª edición, 2021.
- Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C., en las ediciones de 2017, 2019 y 2020
- Congreso anual de la Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Membranas A.C., 2020
- AIChE Annual Meeting, 2019
- Foro del Posgrado en Ciencias Químicas, 2018 y 2019

De igual manera, durante el posgrado fue posible publicar los siguientes dos artículos en revistas internacionales:

- Delgado-Rangel, L. H., Hernández-Vargas, J., Becerra-González, M., Martínez-Torres, A., Prokhorov, E., & González Campos, J. B. (2019). Development of Collagen/Poly(vinyl alcohol)/Chondroitin Sulfate and Collagen/Poly(vinyl alcohol)/HA Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering. *Fibers and Polymers*, 20(12), 2470–2484. <https://doi.org/10.1007/s12221-019-9341-x>
- Delgado-Rangel, L. H., Huerta-Saquero, A., Eufrazio-García, N., Meza-Villezcás, A., Mota-Morales, J. D., & González-Campos, J. B. (2020). Deep eutectic solvent-assisted phase separation in chitosan solutions for the production of 3D monoliths and films with tailored porosities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4084–4094. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.254>

1. Introducción

El uso de biopolímeros en la producción de nuevos materiales es de gran interés debido a sus propiedades fisicoquímicas, entre las que destacan su biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad, lo que los hace muy atractivos para diversas aplicaciones en áreas como la ingeniería de tejidos donde desempeñan el papel de andamios celulares. También se han aplicado en la adsorción de compuestos contaminantes como son los colorantes usados en la industria textil, y como soportes de especies catalíticas. Siendo posible que un mismo material pueda destinarse a más de una aplicación sin la necesidad de realizarle modificaciones, o bien haciendo algunas modificaciones que mejoren su función.

En particular, un biopolímero de gran interés es el quitosano (CTS), un derivado de la quitina; el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa. El CTS es un biopolímero muy versátil para su procesamiento, por lo que suele usarse en la producción de hidrogeles, películas, fibras y esponjas. Debido a esta versatilidad para ser procesado en diferentes formas, sus aplicaciones son también variadas, aunque en su gran mayoría los materiales basados en CTS son analizados para su uso en el área biomédica, ya que es un polímero natural altamente biocompatible, biodegradable y de baja toxicidad (Rinaudo, 2006).

El uso de CTS en la producción de materiales porosos es de gran interés para diferentes áreas, en la ingeniería de tejidos por ejemplo se sabe que el CTS es un polímero altamente biocompatible, y si a esta cualidad se le agrega una superficie con porosidad adecuada, con poros de 300 nm o más, que adicionalmente se encuentren interconectados y por tanto permitan un libre flujo de líquido y nutrientes, estos materiales pueden ser ideales para el cultivo celular 3D (Dutta & Dutta, 2018; Ikeda et al., 2014). Por otro lado, el uso de quitosano como soporte catalítico ha sido igualmente importante debido a su capacidad quelante, lo que le permite unirse a diferentes tipos de compuestos metálicos que suelen ser usados como catalizadores (El Kadib & El Kadib, 2015; Guibal, 2005; Lee et al., 2015; Macquarrie & Hardy, 2005). Si además estos soportes presentan una alta relación área superficial/volumen, como es el caso de un material poroso, se aumenta la probabilidad de interacciones entre el catalizador y los reactivos, con la ventaja extra de que el soporte poroso pueda ser fácilmente retirado al terminar la reacción y de esta forma recuperar el catalizador.

La obtención de biomateriales porosos (o esponjas) basados en CTS comúnmente involucra métodos que requieren condiciones y equipos especiales para cumplir las condiciones de una metodología de separación de fase por inducción térmica (TIPS por sus siglas en inglés); tal es el caso de la liofilización. En este método se emplean bajas temperaturas y sistemas controlados con vacío para eliminar los disolventes volátiles por sublimación (She et al., 2008; You et al., 2004), la necesidad de mantener condiciones controladas de temperatura y presión hace a esta técnica poco accesible y costosa. Otra técnica comúnmente utilizada es la lixiviación de partículas, en la cual se obtienen poros homogéneos mediante el uso de micro o nano partículas, las cuales deben mezclarse con una disolución del polímero del cual se desea obtener el material poroso. Una vez eliminado el solvente de la disolución polimérica mediante evaporación, los sólidos obtenidos son sometidos a la acción de disolventes para la extracción de las partículas (Kim et al., 2001; Mi et al., 2001). Este método implica una gran cantidad de pasos, y la necesidad de producir o comprar las partículas del tamaño deseable para la producción de los poros, aunado a esto, la eliminación de las nanopartículas normalmente involucra el uso de solventes que pueden ser muy tóxicos, como el ácido fluorhídrico (Mi et al., 2001).

Una alternativa prometedora para suplir las metodologías tipo TIPS es la separación de fase inducida por evaporación (EIPS por sus siglas en inglés), la cual es efectiva y simple ya que requiere un mínimo de equipos. Un sistema EIPS típico contiene el o los polímeros a partir de los cuales se desea producir el material poroso, un buen solvente y un no solvente miscibles entre sí (Hong et al., 2005). Los buenos disolventes y no-solventes del polímero actúan como agentes porógeno. El porógeno de solvatación genera micro y mesoporos, mientras que el no-solvente produce meso y macroporos en la estructura del polímero (Mohamed & Wilson, 2012; Shivashankar, M., & Mandal, 2012).

El interés de estudiar nuevas metodologías aumenta si estas son de bajo costo, más simples y amigables con el medio ambiente; lo que puede cumplirse con la incorporación de disolventes eutécticos profundos (DES) para sustituir el uso de disolventes orgánicos tradicionalmente utilizados para la preparación de materiales a base de CTS. Los DES han surgido como una alternativa ecológica, biodegradable, no tóxica, de bajo costo y fácil preparación (Chen et al., 2018; Ferreira et al., 2019; Xiaoxia Li et al., 2018), algunos de ellos

presentan la gran ventaja de poder recuperarse y ser reutilizados, razones por las que en este trabajo de investigación surge el interés de su incorporación en la obtención de materiales porosos de CTS.

En la presente investigación, la implementación de la metodología EIPS utilizando el DES cloruro de colina:urea (CCU) como sistema no-disolvente, resultó ser altamente versátil ya que se han logrado obtener materiales porosos de CTS puro en forma de películas y monolitos, por lo cual se exploró su uso con otros polímeros o combinaciones de polímeros, obteniendo así estructuras porosas de alcohol polivinílico (PVA) y combinaciones de polímeros como lo son CTS/CG (quitosano/colágeno), CTS/PVA y CTS/SC (quitosano/sulfato de condroitina).

Gracias a la versatilidad de esta técnica y aprovechando la capacidad quelante del CTS, que permite su interacción de manera covalente con compuestos metálicos, se han preparado materiales con diferentes especies metálicas como son el sulfato de cobre (CuSO_4) y micro cristales de óxido de cobre (Cu_2O), nanopartículas de plata (AgnP) y sales de hierro (FeCl_2 y FeCl_3), estas últimas son tratadas posteriormente para la obtención de micro o nanopartículas de hierro con propiedades magnéticas.

Las características microestructurales de los materiales obtenidos han resultado ser únicas, lo que ha permitido su exploración en diversas aplicaciones. En este caso, se han explorado las propiedades de algunos de los materiales obtenidos con los que se han realizado estudios *in vitro*. Los ensayos *in vitro* se realizaron en el grupo de trabajo del Dr. Alejandro Huerta-Saquero del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, mediante cultivos de *V. cholerae* para evaluar la formación de biopelículas bacterianas, y por el grupo de trabajo de la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez del Instituto Nacional de Rehabilitación con la participación de la Biol. Julieta García López, donde los materiales se usaron para evaluar la viabilidad celular de fibroblastos de prepucio, fibroblastos de abdominoplastía y fibroblastos de cicatriz hipertrófica. Los resultados obtenidos han demostrado la capacidad de los materiales obtenidos para ser usados como biopelículas para la inhibición del crecimiento bacteriano y como andamios celulares.

En el caso específico de los materiales a los que se le agrego Cu, estos cumplen la función de soporte de una especie catalítica y fueron probados en reacciones de síntesis de bis indolil metanos (BIMs) por la M.C. Estefanía Reyes Mercado, quien es parte del grupo de trabajo liderado por la D.C. J. Betzabe González Campos y de igual manera participa con el grupo de trabajo de la D. C. Yliana López Castro.

La metodología desarrollada es altamente versátil para la producción de materiales porosos basados en biopolímeros, además de resultar más económica y simple que las metodologías comúnmente utilizadas. Aun cuando la metodología EIPS ha sido reportada anteriormente para la producción de materiales porosos, el uso de disolventes eutécticos profundos como sistema no disolvente ha sido descrito por primera vez por nuestro grupo de trabajo, como resultado de este trabajo de investigación (Delgado-Rangel et al., 2020), lo que implica una notable contribución de este trabajo de investigación en esta área.

2. Justificación

El desarrollo de materiales porosos basados en biopolímeros es un área de investigación de gran importancia debido a que la porosidad confiere a los materiales propiedades importantes, como baja densidad, lo que implica un bajo peso, una alta relación área superficial/volumen y una gran área superficial para inmovilizar diferentes moléculas o estructuras en los poros. Los materiales porosos se han probado para su aplicación en áreas muy diversas, que van desde la ingeniería de tejidos hasta el tratamiento de aguas residuales.

El uso de biopolímeros como compuestos básicos en la preparación de nuevos materiales pretende hacer uso de su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad, además de que las materias primas empleadas para su preparación son de fácil obtención por su abundancia de manera natural, tal es el caso del CTS. No obstante, la preparación de nuevos materiales implica también desarrollar nuevas metodologías que faciliten su síntesis, y que además sean metodologías de bajo costo y amigables con el medio ambiente.

El CTS es un polímero muy versátil desde diferentes puntos de vista, sin embargo destaca su versatilidad de procesamiento, ya que puede ser empleado para la formación de películas, hidrogeles, nanofibras y nanopartículas. A pesar de esto, el CTS es compuesto con amplia complejidad en su procesamiento, por lo que la búsqueda de metodologías más sencillas es de amplio interés.

En la última década, el uso de disolventes eutécticos profundos (DES) ha sido de gran interés en el desarrollo de metodologías existentes para la preparación de biomateriales; aplicadas desde el punto de vista de que sean tecnologías sencillas y más amigables con el medio ambiente, ya que los DES se caracterizan por ser biodegradables, no tóxicos y de fácil preparación, además de que en algunos casos pueden ser recuperados y reutilizados en varios ciclos, y pueden sustituir el uso de los disolventes orgánicos convencionales. La inclusión de DES en la preparación de materiales base CTS resulta de gran importancia, al promover el desarrollo de una metodología sencilla, de bajo costo, eficaz y amigable con el medio ambiente para la obtención de biomateriales con un amplio espectro de aplicaciones en diferentes áreas.

3. Hipótesis

Los disolventes eutécticos profundos (DES) pueden emplearse como sistema no disolvente en la metodología EIPS para la preparación de materiales porosos basados en CTS, lo que puede promover la preparación de biomateriales con área superficial aumentada, usando una metodología sencilla y amigable con el medio ambiente. Los materiales porosos obtenidos usando DES se podrán usar en aplicaciones como la ingeniería de tejidos, esto debido a que el DES usado es altamente biodegradable.

La microestructura tridimensional porosa generada mediante la metodología EIPS y la composición de los materiales porosos, son ideales para la aplicación de estos materiales en diferentes aplicaciones debido a sus características estructurales y fisicoquímicas.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Preparar materiales porosos base biopolímeros mediante la metodología EIPS utilizando disolventes eutécticos profundos (DES) como sistema no disolvente y evaluar el efecto de la microestructura generada en diversas aplicaciones.

4.2. Objetivos específicos

- Sintetizar materiales porosos de quitosano puro mediante la metodología EIPS usando el DES ChCl:U como sistema no disolvente.
- Probar la versatilidad de la metodología EIPS en la obtención de materiales porosos empleando diferentes mezclas de polímeros, como son el alcohol polivinílico (PVA) y colágeno (CG).
- Preparar materiales porosos de CTS que incluyan diferentes especies metálicas (específicamente de Cu, Ag y Fe), adicionadas durante la preparación del material poroso o posterior a su preparación.
- Caracterizar los materiales obtenidos mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo (IR), termogravimetría analítica (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- Analizar la capacidad de los materiales porosos de CTS puro para la inhibición en la formación de biopelículas de *V. cholerae* mediante pruebas biológicas *in vitro*.
- Analizar la capacidad de los materiales porosos de CTS puro como andamio celular mediante pruebas biológicas con fibroblastos de prepucio, fibroblastos de abdominoplastía y fibroblastos de cicatriz hipertrófica.
- Probar la viabilidad del uso de materiales porosos de CTS puro cargados con especies de cobre y analizar su actividad catalítica.

5. Antecedentes

5.1. Biopolímeros

Los biopolímeros como lo indica el prefijo 'bio' son polímeros que se producen inherentemente a partir de materia viva.(George et al., 2020). Químicamente, están compuestos por unidades monoméricas unidas mediante enlaces covalentes que se repiten en cierto orden para formar moléculas orgánicas estructuralmente complejas que se encuentran en forma de cadena, ya sea linealmente o ramificadas/entrecruzadas, las unidades monoméricas de la mayoría de los biopolímeros generalmente consisten en moléculas recurrentes de ácidos nucleicos de nucleótidos, proteínas de aminoácidos o sacáridos derivados de azúcares (George et al., 2020; Rebelo et al., 2017; Russo et al., 2021). Por sus propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, compostabilidad y sostenibilidad ambiental, los biopolímeros representan una alternativa válida respecto de los polímeros tradicionales (Russo et al., 2021), por lo que su estudio está centrado en sus aplicaciones en áreas como el desarrollo de materiales médicos, empaquetamiento, aditivos de cosméticos y alimentos, fabricación de ropa, tratamiento de agua, en la industria de plásticos, adsorbentes, biosensores e incluso para almacenamiento de datos (Biswal, 2021; Jang & Jia, 2020; Rebelo et al., 2017).

Uno de los biopolímeros de interés para su estudio es el quitosano (CTS), esto es debido a la gran gama de aplicaciones que puede tener, pero además por su abundancia natural. Siendo de gran importancia no solo el estudio del quitosano puro, sino también de las diversas mezclas de este biopolímero con otros biopolímeros, o bien del quitosano empleado como matriz para la incorporación de especies metálicas para la fabricación de materiales compuestos.

5.2. Quitosano y materiales porosos basados en quitosano (CTS)

El CTS es un polisacárido derivado de la quitina, el segundo biopolímero más abundante del planeta después de la celulosa (Cavallaro et al., 2021; Kou et al., 2021; Negm et al., 2020; Shariatinia, 2019; W. Wang et al., 2020). Fue descrito en 1859 por Rouget, y es considerado un polisacárido de gran importancia (Ali & Ahmed, 2018; Raafat & Sahl, 2009). Químicamente

es un heteropolisacárido catiónico, lineal, de alto peso molecular y está formado por los monosacáridos *N*-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, unidos mediante un enlace glucosídico β -(1 \rightarrow 4) (Figura 1) (Kou et al., 2021; Raafat & Sahl, 2009; Rinaudo, 2006).

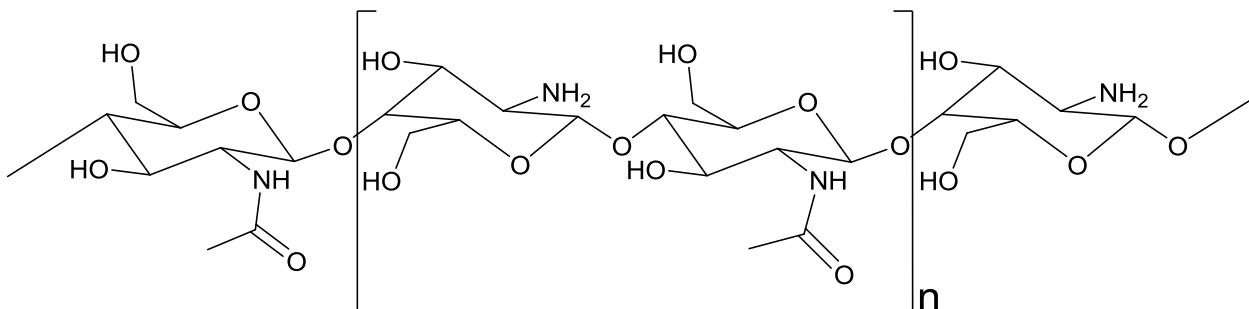


Figura 1. Estructura general de una molécula de CTS.

Los grupos -NH_2 presentes en la cadena del CTS le confieren gran versatilidad, ya que facilitan la formación de complejos de CTS con diferentes metales y la preparación de diferentes derivados, para lo cual se pueden diferenciar reacciones específicas que involucran el grupo -NH_2 en la posición C-2 o reacciones no específicas de grupos -OH en las posiciones C-3 y C-6 (especialmente esterificación y eterificación) (Rinaudo, 2006). Esta capacidad permite modificar o mejorar las posibles aplicaciones que los materiales basados en CTS puedan tener.

Este biopolímero presenta una fascinante actividad antibacterial, buena biodegradación, alta biocompatibilidad, nula toxicidad, excelentes propiedades fisicoquímicas y bajo costo debido a su gran biodisponibilidad (Bakshi et al., 2020; J. Li & Zhuang, 2020; Shariatinia, 2019). Gracias a sus cualidades, el CTS puede ser usado para diferentes y variadas aplicaciones, como su uso en sistemas de administración de fármacos, ingeniería de tejidos, tecnología alimentaria, curación de heridas, en la industria textil para la remoción de colorantes, como soporte de catalizadores y biotecnología ambiental, entre otras (Kumar, 2000; Pal et al., 2021; Reyes-Mercado et al., 2021; Shariatinia, 2019).

Una de las cualidades que destacan al CTS sobre otros biopolímeros biocompatibles, es su actividad antimicrobiana y antifúngica. Se ha observado un fuerte efecto antibacterial del CTS puro frente a bacterias *gram*-positivo y *gram*-negativo, así como un marcado efecto

antifúngico (Ke et al., 2021; Moeini et al., 2020; Si et al., 2021; Zheng & Zhu, 2003). Su actividad antimicrobiana puede potenciarse con la adición de algunos metales en forma de nanopartículas a la matriz polimérica, como pueden ser oro, plata cobre o zinc, los cuales mejoran la actividad de materiales de CTS frente a *S. aureus* y *E. coli* (J. Li & Zhuang, 2020; W. Wang et al., 2020). Esta cualidad lo hace altamente atractivo en aplicaciones biomédicas, como la ingeniería de tejidos.

El CTS se ha utilizado en la regeneración de cartílago, hueso, piel, de vasos sanguíneos, discos intervertebrales, de corneas y tejido periodontal (Islam et al., 2020), ya sea puro o en combinación con otros biopolímeros (Ahmed et al., 2018). Puede ser utilizado en forma de hidrogeles, películas, fibras o esponjas, dependiendo del tipo de tejido o aplicación que se esté estudiando (Balagangadharan et al., 2016; Nilsen-Nygaard et al., 2015; Pérez-Nava et al., 2018; Rinaudo, 2006; Seol et al., 2004; Xing Ma et al., 2011).

Las aplicaciones del CTS no se limitan al área biomédica; también se ha explorado su uso en la absorción de colorantes y como soporte de especies metálicas con actividad catalítica. En ambos casos, su estructura única permite una alta afinidad por diferentes clases de colorantes, así como por diferentes metales (Desbrières et al., 2018; Kumar, 2000; Pal et al., 2021). La incorporación de especies metálicas a estructuras basadas en CTS puede ayudar a mejorar la adsorción de colorantes, como es el caso de especies oxidadas de hierro (Vallejo-Macías et al., 2020), o bien, este tipo de materiales pueden ser dirigidos a su aplicación en catálisis como se ha observado con el uso del CTS como soporte de especies de cobre (Reyes-Mercado et al., 2021).

Si bien el CTS puede ser utilizado ya sea en forma de hidrogeles, películas, fibras o materiales porosos tipo esponja, es de particular interés el estudio de la producción de materiales base CTS en forma de materiales porosos tipo esponja, ya que debido a sus características microestructurales, en conjunto con las propiedades intrínsecas de éste biopolímero, estos materiales resultan atractivos por su alta relación área superficial/volumen; resultado de la porosidad que presentan. En el caso de la ingeniería de tejidos, la porosidad presente en los materiales utilizados como andamios celulares permite el crecimiento de las células en un espacio similar al de la matriz extracelular, ya que pueden crecer en un espacio

tridimensional y desarrollar sus funciones, además, su porosidad interconectada permite una mejor distribución de los nutrientes por todo el material y la posibilidad de angiogénesis al ser colocados como injertos (Chun et al., 2008; Di Martino et al., 2005; Zeltinger et al., 2001). De igual manera, una alta relación área superficial/volumen brinda una mayor cantidad de sitios activos para la interacción de los materiales con componentes considerados contaminantes de agua como pueden ser colorantes, metales pesados, e incluso fármacos (Vallejo-Macías et al., 2020; Zhu et al., 2019). Esta misma disponibilidad de más sitios activos en materiales con alta porosidad permite que su uso como soportes catalíticos sea de gran importancia, por un lado es posible una mayor distribución y exposición del catalizador que se ancla en los sitios activos del soporte y por otro lado la interconectividad de los poros permite que los reactivos a catalizar tengan una mayor probabilidad de reaccionar.

Las metodologías más comunes para la obtención de materiales porosos tipo esponja son la liofilización y la lixiviación de partículas (Kim et al., 2001; Mi et al., 2001; She et al., 2008; You et al., 2004). No obstante, una metodología de nuestro interés es la denominada separación de fase inducida por evaporación (EIPS por sus siglas en inglés), la cual es efectiva y simple ya que requiere un mínimo de equipos. Sin embargo, dicha metodología puede mejorarse, ya que comúnmente los disolventes empleados para la disolución de los polímeros, son compuestos orgánicos, que pueden ser tóxicos y contaminantes, además de que ésta metodología no se había reportado previamente para la producción de materiales porosos basados en CTS.

5.3. Separación de fase inducida por evaporación (EIPS)

Un sistema EIPS típico contiene el o los polímeros a partir de los cuales se desea producir el material poroso, un buen solvente y un no solvente; miscibles entre sí (Hong et al., 2005). Los buenos disolventes y no-disolventes del polímero actúan como agentes porogénicos. El porógeno de solvatación genera micro y mesoporos, mientras que el no-solvente produce meso y macroporos en la matriz polimérica (Mohamed & Wilson, 2012; Shivashankar, M., & Mandal, 2012). La propiedad de un solvente como un buen/mal generador de poros afecta significativamente la separación de fase, lo que influye en las propiedades del polímero (Mane, 2016). La implementación efectiva de un proceso tipo EIPS requiere que el no-

disolvente no se evapore a la temperatura utilizada para evaporar al buen disolvente, por tal razón, el uso de un DES es ideal para desarrollar esta metodología; cuando se requiere evaporar disolventes poco volátiles como el agua o el ácido acético, y los DES basados en ChCl presentan evaporación despreciable.

En la Figura 2 se propone esquemáticamente el mecanismo para la producción de poros usando una metodología tipo EIPS. Tal como se muestra, el proceso puede ser dividido en tres etapas: 1) La formación de la mezcla, donde se inicia con el polímero disuelto en el buen solvente y se adiciona el no-disolvente. Ya que el buen solvente y el no-disolvente son miscibles entre sí, estos interactúan entre ellos de tal manera que el no-disolvente se aísla del polímero por la formación de una delgada capa del buen solvente. 2) La evaporación del buen disolvente genera que el polímero y el no-disolvente interactúen de forma directa, provocando que el polímero coagule en forma de un sólido o gel. 3) La extracción del no-disolvente induce la generación de poros en los sitios antes ocupados por el no-disolvente.

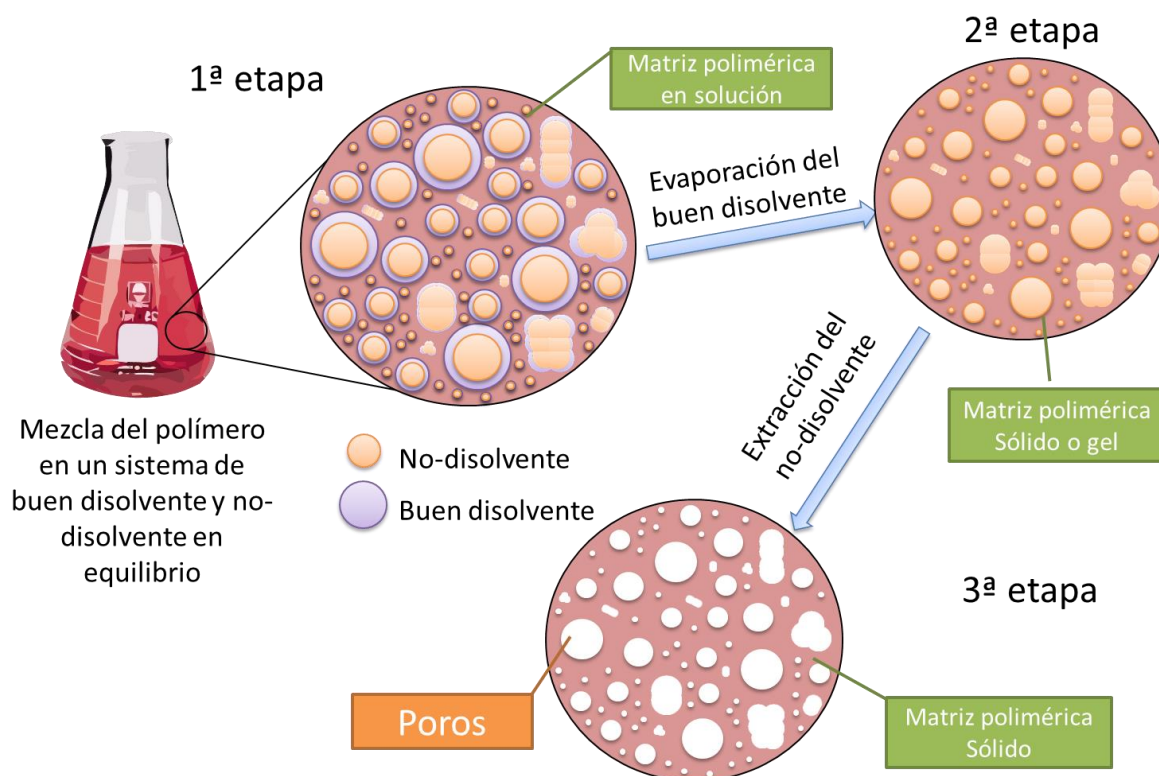


Figura 2. Esquema para la producción de materiales porosos mediante la metodología tipo EIPS.

Esta metodología suele usar componentes de fácil evaporación como buenos disolventes y componentes de difícil evaporación como no-disolventes. Un ejemplo es el tetrahidrofurano (THF) en combinación con agua para la preparación de materiales porosos de poli-metilmacrilato (PMMA) (Samuel et al., 2011; Zhao et al., 2013). No obstante, debido a la necesidad de desarrollar tecnología amigables con el medio ambiente, la búsqueda de nuevas alternativa al uso de solventes orgánicos es de gran interés en la actualidad; condición que puede cumplirse con el uso de disolventes eutécticos.

5.4. Disolventes eutécticos profundos (DES)

Los DES son una nueva generación de disolventes “verdes” que se caracterizan por su capacidad para ser utilizados en diferentes áreas, como la biocatálisis, electroquímica, captura de CO₂, extracción de productos naturales y biomedicina (Paiva et al., 2014a). Son obtenidos por la complejación entre un compuesto aceptor de hidrógeno y uno donador de enlaces de hidrógeno, para lo cual pueden utilizarse compuestos de origen natural como los ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y derivados del catión colina (Figura 3). El cloruro de colina es uno de los componentes más utilizados para la síntesis de DES, ya sea en compañía de azúcares como la glucosa, de ácidos orgánicos como el ácido cítrico u otros componentes como la urea.

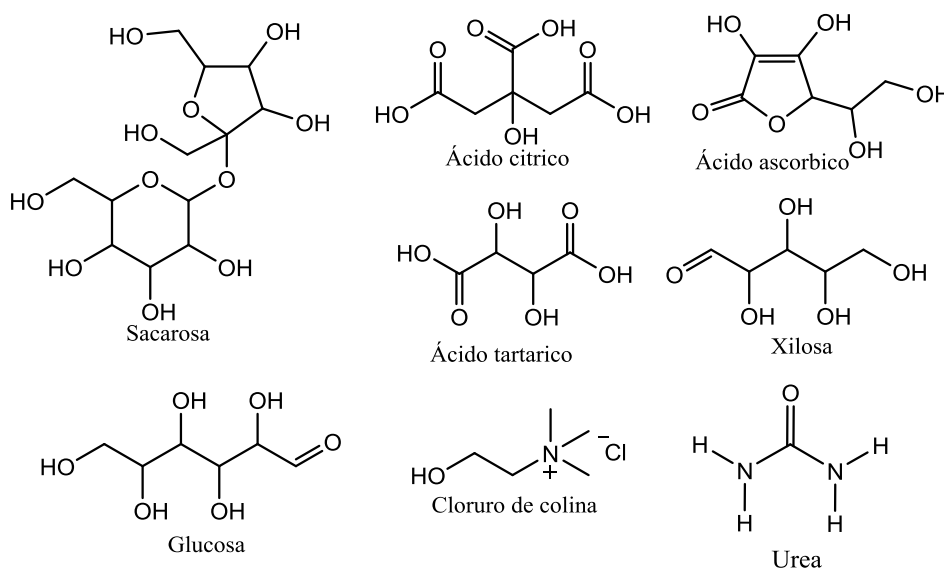


Figura 3. Algunos compuestos utilizados para la síntesis de DES.

Los DES presentan características particulares, siendo de especial importancia el punto de fusión de la mezcla, ya que determina su potencial uso como disolvente a temperaturas menores de 100°C. Si el punto de fusión del DES se encuentra debajo de la temperatura ambiente, entonces la mezcla resultante es líquida. Para componentes que no interactúan, el punto de fusión varía linealmente con la fracción molar. Sin embargo, cuando los componentes interactúan (como es el caso de los DES), pueden ocurrir desviaciones de dicha relación. En la Figura 4 se muestra esquemáticamente la variación del punto de fusión con la fracción molar en un eutéctico (mezcla de componentes que muestra un punto de fusión menor a los de sus componentes puros). La deslocalización de la carga en los componentes cargados (aniones/cationes) durante la formación de un DES, provoca una disminución en el punto de fusión con respecto al que tendría una simple mezcla de los componentes individuales que forman al fluido, los cuales generalmente se presentarían en estado sólido a temperatura ambiente, mientras que como mezcla eutéctica, es posible utilizarlos en estado líquido, incluso a temperatura ambiente.

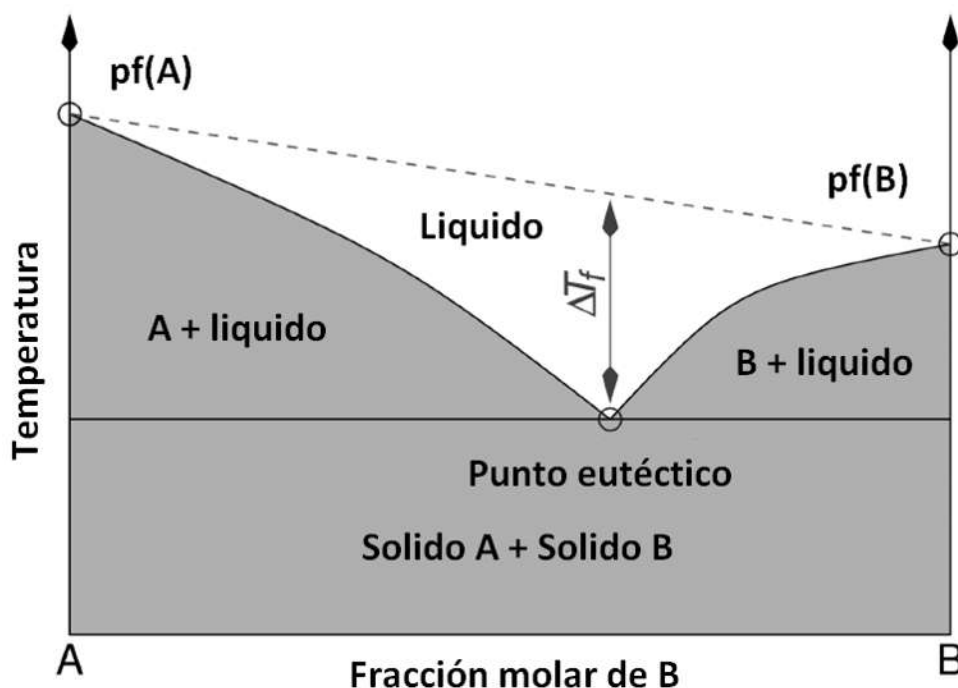


Figura 4. Diagrama de fases que representa el diferencial en la temperatura de fusión al obtener un DES comparada con la de los compuestos que le componen (Paiva et al., 2014).

La composición en la que se observa el punto de fusión más bajo es conocido como punto eutéctico. La palabra *eutéctico* viene del griego *eutektos* que se traduce como “que se derrite fácilmente”.

5.4.1. DES en la preparación de materiales base quitina y quitosano

La quitina y su derivado principal el CTS son dos biopolímeros de gran interés para su funcionalización en forma de nanofibras, sin embargo son poco solubles en agua y disolventes orgánicos comunes, lo que dificulta su procesamiento. Para este fin, se han empleado DES como una alternativa viable y amigable con el ambiente para solubilizar quitina. Sharma y colaboradores (Sharma et al., 2013) analizaron la disolución de quitina en diferentes DES, entre los que destaca el compuesto por cloruro de colina y urea por su capacidad de disolver hasta en un 8 % p/v la quitina bajo diferentes condiciones: a 100°C, a 80°C con ultrasonido y a 80°C con irradiación de microondas, obteniendo en general buenos resultados.

Por su parte, Ramírez–Wong y colaboradores (Ramírez-Wong et al., 2016), reportaron la producción de películas de quitina con el DES ChCl:Urea en proporción 2:1, observando que el método para la formación de las películas de quitina produce un cambio en la fase cristalina de la quitina, pasando de la estructura α a la estructura γ , proponiendo una estructura nueva y totalmente indexada de γ -quitina. También se ha estudiado el uso de DES y líquidos iónicos (ILs) para la producción de nanofibras por entrecruzamiento, obteniendo buenos resultados con el uso del DES cloruro de colina:tiourea en una proporción molar de 1:2 (Mukesh et al., 2014), sobre la producción de nanofibras de quitina con el uso de DES.

Por otro lado, el desarrollo de un DES capaz de disolver el CTS sigue siendo un desafío. Hasta ahora, solo se han publicado pocos informes sobre el uso de DES en la producción de materiales a base de CTS. Los DES se han utilizado como agentes plastificantes de CTS para la producción de bioplásticos (Bangde et al., 2016; Sokolova et al., 2018; Zhang et al., 2012), como agentes metilantes para la síntesis de CTS metilado (Bangde et al., 2016), como monómeros funcionales para la producción de materiales de CTS magnético a base de polímeros (Ma et al., 2018) y como promotor de la conducción de protones (Abbott et al., 2003).

De tal forma que, el hecho de que al momento no se había reportado un DES capaz de disolver al quitosano, fue empleado como una ventaja en la presente investigación, de tal forma que se propuso el uso del DES cloruro de colina:urea como mal-solvente, y por ende como agente porógeno en la metodología EIPS. Es importante mencionar que, antes de este trabajo de investigación, no había informes sobre el uso de DES como agente porógeno para la producción de materiales a base de CTS a través de la técnica EIPS.

5.5. Aplicaciones de materiales porosos basados en quitosano

La importancia del uso de materiales porosos de CTS radica por un lado en que su estructura brinda una gran área superficial en muy poco volumen y, por otro lado las cualidades propias del CTS como biocompatibilidad, biodegradabilidad además de su capacidad para interactuar con diferentes tipos de moléculas y o iones. Estas cualidades permiten que los materiales porosos basados en este biopolímero sean ideales para varias aplicaciones.

Una de las aplicaciones del CTS mas exploradas debido a su biocompatibilidad y bidegradabilidad, es su uso en aplicaciones biomédicas, específicamente como andamio celular en ingeniería de tejidos. Por citar algunos ejemplos, se ha visto que el uso de materiales posos de CTS puro o en combinación con otros compuestos, facilita el crecimiento de diferentes líneas celulares como son MDA-MB-231 (de cáncer de mama), PC3,C4-2B,22Rv1 (líneas celulares de cáncer de próstata) MC3T3-E1 (de tejido óseo) y BM-MsCs (células madres mesenquimales) (Hou & Hsu, 2020; Le et al., 2021; Yaxin Liu et al., 2018; J. Wang et al., 2020; K. Xu et al., 2019; Y. Xu et al., 2018), observando de manera general un desarrollo adecuado de las células, las cuales no solamente se dividen, sino que se mantienen activas de manera similar a como lo harían en la matriz extracelular nativa, esto ayuda al estudio de los diferentes procesos celulares en un ambiente controlado y fácil de monitorear para las líneas celulares de cáncer, mientras que para las líneas celulares sanas representa la oportunidad de desarrollar injertos para cuestiones médicas. Para este tipo de aplicaciones es importante la actividad antimicrobiana del CTS, la cual puede ser potenciada con la adición de nanopartículas de plata, como lo demuestra su capacidad para inhibir el crecimiento de *Eschericha coli* y *Staphylococcus aureus* (Venkatesan et al., 2017).

Otra aplicación de los materiales porosos de CTS; en este caso por propiedades de absorción y capacidad quelante, es la posibilidad de usarlos como adsorbentes, siendo importante recalcar que al tener una mayor área superficial, la interacción entre el CTS y los compuestos a adsorber aumenta, mejorando por lo tanto la capacidad de adsorción de los materiales basados en CTS. En este caso, el CTS ha sido utilizado en la absorción de diferentes tipos de colorantes como son el negro de eriocromo T (EBT), el azul de metileno (MB), rodamina B (RB), direct blue 15 (DB15) y rosa de bengala (RB) (Heydaripour et al., 2019; Ying Liu et al., 2018; Mokhtari et al., 2021; Shi et al., 2017; Zia et al., 2021). En este caso no solo han sido utilizados como adsorbentes de colorantes, sino también de especies metálicas como son el cobre (Cu), cromo (Cr) y cesio (Cs) por ejemplo (González-López et al., 2020; Sahebamee et al., 2020; K. Wang et al., 2019; Zia et al., 2020), además de compuestos orgánicos como son los fenoles (Heydaripour et al., 2019).

La capacidad del CTS para interactuar con especies metálicas permite también que los materiales base CTS puedan ser usados como soportes de especies metálicas con actividad catalítica, en este caso la porosidad también repercute en la cantidad de catalizador que se puede tener disponible para las reacciones en que se quieran aplicar. En este sentido, se puede mencionar el uso de paladio (Pd), cinc (Zn) y cobre (Cu), en diferentes tipos de reacciones de acoplamiento (Rafiee, 2019; Reyes-Mercado et al., 2021), o bien en reacciones de degradación de tetraciclina usando como catalizador óxido de hierro (Xiaoyang Li et al., 2020).

6. Metodología

6.1. Reactivos

Se utilizó quitosano (CTS, obtenido de cascara de camarón con un grado de desacetilación de $\leq 75\%$), colágeno tipo 1 (CG, obtenido de tendón de Aquiles bovino), alcohol polivinílico (PVA, Mw 89,000-98,000, +99% hidrolizado), cloruro de colina (CC, con una pureza $\geq 98\%$), urea (U, con una pureza $\geq 98\%$), y 1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol (HFIP, con una pureza $\geq 99\%$), todos de Sigma-Aldrich. Y ácido acético ($AA_{(ac)}$) J. T. Baker (AA, con una pureza de 99.94%), cloruro de hierro (II) (98%, Sigma-Aldrich), cloruro de hierro (III) (97%, Sigma-Aldrich), sulfato cúprico (Karal SA de CV), nitrato de plata (99+%, Aldrich), y microcristales de óxido de cobre II obtenidos dentro del grupo de trabajo (Reyes-Mercado et al., 2021).

6.2. Preparación de soluciones y mezclas

6.2.1. Solución de CTS en $AA_{(ac)}$

Se utilizó una disolución acuosa de AA al 40% v/v y la cantidad correspondiente de CTS en forma de hojuelas para obtener una disolución 2% p/v, manteniendo agitación magnética a temperatura ambiente hasta obtener una disolución homogénea (esta disolución se etiquetó como CTS).

6.2.2. Soluciones de PVA

Se prepararon disoluciones acuosas al 8 y 2% p/v, la primera se preparó agregando la cantidad correspondiente de PVA en agua destilada con agitación constante a 90°C hasta obtener una mezcla homogénea, y la segunda se preparó haciendo una dilución de la primera solución (las disoluciones de PVA al 8% p/v y 2% p/v se etiquetaron como PVA8 y PVA2 respectivamente).

6.2.3. Solución de colágeno (CG)

Se utilizó una solución de colágeno al 2.5% p/v en HFIP, la cual se preparó a temperatura ambiente y con agitación constante por aproximadamente 2 meses hasta obtener una disolución lo más homogénea posible (la disolución se etiquetó como CG).

6.2.4. Solución de CTS-CuSO₄

Se preparó una solución al 2% p/v de hojuelas de CTS, las cuales previamente habían sido impregnadas con CuSO₄•5H₂O en una proporción de 10% p/p con respecto al peso del CTS (se etiquetó como CTS-CuSO₄ 10%). A partir de la solución de CTS-CuSO₄ 10% se prepararon diluciones usando la solución de CTS puro al 2% p/v, de tal manera que se obtuvieran proporciones de CuSO₄ de 7.5, 5, 2.5 y 1% p/p, etiquetándose como CTS-CuSO₄ 7.5%, CTS-CuSO₄ 5%, CTS-CuSO₄ 2.5% y CTS-CuSO₄ 1%.

6.2.5. Solución de CTS-MCCu₂O

Se preparó una solución al 2% p/v de hojuelas de CTS, las cuales previamente habían sido impregnadas con microcristales de óxido de cobre (I) (MCCu₂O) en una proporción de 10% p/p con respecto al peso del CTS (se etiquetó como CTS-MCCu₂O 10%). A partir de la solución de CTS-MCCu₂O 10% se prepararon diluciones usando la solución de CTS puro al 2% p/v, de tal manera que se tuvieran proporciones de MCCu₂O de 5, 2.5 y 1 % p/p, etiquetándose como CTS-MCCu₂O 5% CTS-MCCu₂O 2.5% y CTS-MCCu₂O 1 %, respectivamente. Lo anterior de acuerdo a la metodología previamente reportada por el grupo de trabajo (Reyes-Mercado et al., 2021).

6.2.6. Soluciones de CTS-AgNP

En la preparación de soluciones de CTS con nanopartículas de plata (AgNP) se utilizó una película de CTS con AgNP en una proporción de 1% p/p de AgNP con respecto al peso de CTS. Esta se cortó y se pesó junto con CTS puro, de tal manera que se tuvieran proporciones de 0.1 % p/p, 0.05 % p/p, 0.025 % p/p y 0.018% p/p de AgNP con respecto al CTS. De cada una de las proporciones porcentuales se disolvieron en soluciones en ácido acético (40% v/v) en una concentración del 2% p/v.

6.2.7. Soluciones de sales de hierro

Se prepararon dos soluciones de sales de hierro, la primera usando FeCl₃ en una concentración 2 M y la segunda de FeCl₂ en una concentración 1 M.

6.2.8. Preparación del DES

La obtención del DES se realizó mezclando cloruro de colina y urea en una proporción molar 1:2, manteniendo la mezcla a 80 °C hasta obtener una mezcla homogénea (la mezcla eutéctica se etiquetó como CCU).

6.3. Preparación de la AgnP y películas simples de CTS-AgnP

La preparación de las AgnP en solución de CTS fue realizada según la metodología descrita por nuestro grupo de trabajo (Pérez-Nava et al., 2018), realizando las modificaciones correspondientes para obtener la concentración de AgnP deseada:

- Se preparó una disolución de CTS al 1 % p/v en disolución acuosa de ácido acético (1 % v/v).
- A partir de una disolución acuosa de AgNO_3 10 % p/v, se adicionó la cantidad correspondiente de AgNO_3 a la disolución de CTS para obtener una concentración del 1 % p/p de Ag respecto al peso seco de CTS.
- Una vez preparadas las disoluciones CTS/ AgNO_3 1% p/p, se procedió a exponerlas a la radiación solar directa: IUV alto = 7 y 19°C para inducir la reducción química empleando al CTS como agente reductor.
- La reducción $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ se efectuó en un lapso de 30 min. Durante este periodo de tiempo, se realizó el monitoreo de la reducción midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro de absorción UV-Vis (Thermo Scientific; GENESYS 10S UV-VIS SPECTROPHOTOMETER) en intervalos de 5 min. Las mediciones se realizaron en el rango de 200 a 800 nm.

La solución de CTS-AgnP se vertió en placas de Petri y se llevaron al horno de convección para la obtención de películas simples de CTS con un contenido de 1% p/p de AgnP mediante la evaporación del solvente.

6.4. Pruebas de solubilidad de los polímeros en DES

Las pruebas de solubilidad de los polímeros se hicieron con el DES CCU al 100% utilizando calentamiento a 100 °C y agitación magnética, y a 80 °C empleando ultrasonido.

6.5. Producción de Materiales Porosos

6.5.1. Producción de materiales porosos de CTS puro

6.5.1.1. Monolitos de CTS puro

La metodología propuesta es un proceso que consta de tres etapas: 1) mezcla de soluciones de CTS y CCU, 2) evaporación de disolvente acuoso a 60 °C y 3) extracción del CCU con metanol. Se probaron las siguientes proporciones de volumen de soluciones CTS y CCU: CTS/CCU (3:1), CTS/CCU (2:1), CTS/CCU (1:1), CTS/CCU (1:2) y CTS/CCU (1:3), como parte del análisis y la estandarización de los parámetros de la etapa 1. En la etapa 2, se probaron diferentes tiempos de evaporación de los componentes más volátiles a 24 h, 48 h y 72 h. Finalmente, en la etapa 3 se utilizó metanol para la extracción de CCU, seguido de un secado en estufa a 60 °C durante 1 h.

6.5.1.2. Películas porosas de CTS puro

La metodología para la producción de películas porosas de CTS es similar a la usada para preparar los monolitos: 1) la obtención de la mezcla CTSCCU, 2) evaporación de los disolventes, y 3) la extracción del CCU utilizando metanol. En este caso se realizaron algunas modificaciones durante el proceso para mejorar la técnica, las cuales se comentan en la sección de resultados.

6.5.2. Producción de otros biomateriales

Se obtuvieron combinaciones de CTS con otros biopolímeros con el fin de observar si es posible implementar esta metodología para obtener materiales bi-componentes; empleando las soluciones descritas en la metodología de PVA (PVA8, PVA2) y colágeno (CG), los cuales se mezclaron de forma independiente con el CTS en proporción 1:1 (etiquetando como CTS+PVA8, CTS+PVA2 y CTS+CG respectivamente). Posteriormente, se obtuvieron las mezclas con CCU en proporción 1:1 con las mezclas CTS+PVA8 y CTS+PVA2, y en

proporción 1:2 con la mezcla CTS+CG. Además de las mezclas probadas, se produjeron materiales con PVA puro. Para todos los casos, en la etapa 2 el tiempo de evaporación fue de 72 h.

Además de los materiales ya mencionados, se exploró la adición de CuSO_4 para la producción de materiales porosos de CTS, esto con el objetivo de obtener catalizadores heterogéneos para su posible uso en síntesis orgánica empleando al CTS como soporte. Para esto, se utilizó una disolución al 2% p/v de hojuelas de CTS previamente cargadas con la sal de cobre en AA 40% v/v, probando la obtención de materiales con la disolución inicial y posteriormente con disoluciones con menor concentración de CuSO_4 .

6.5.3. Producción de materiales de CTS-AgNP

Empleando las películas obtenidas anteriormente, se prepararon cuatro soluciones de CTS-AgNP en $\text{AA}_{(\text{ac})}$ con diferentes concentraciones de AgNP; 0.1% p/p, 0.05% p/p, 0.025% p/p y 0.018% p/p, utilizando una disolución acuosa de AA al 40% v/v y la cantidad correspondiente de CTS-AgNPs 1% p/p en forma de película, y ajustando la cantidad correspondiente con CTS en forma de polvo para obtener una disolución de CTS 2% p/v.

La preparación de las películas porosas se realizó mediante la metodología previamente reportada por nuestro grupo de trabajo como resultado de éste trabajo de investigación (Delgado-Rangel et al., 2020), el cual es un proceso que consta de tres etapas; 1) mezcla de soluciones de CTS-nPsAg y CCU en proporción 1:1, 2) evaporación de disolvente acuoso a 60 °C y 3) extracciones sucesivas del CCU con metanol, seguido de tres lavados con acetona para acelerar el secado final de las muestras a 60 °C.

6.5.4. Producción de biomateriales CTS-Cu

Los materiales de CTS- CuSO_4 se obtuvieron en forma de monolitos y películas porosas, siguiendo la metodología ya descrita para inducir la porosidad. Para la producción de monolitos, se utilizó una solución de CuSO_4 de 7.5 % p/p, la cual se mezcló con el DES CCU en proporción volumétrica 1:1, se dejó en evaporación por 72 h, para posteriormente extraer el DES con metanol y secar a 60 °C en estufa.

Para la preparación de películas porosas de CTS-CuSO₄ se utilizaron las soluciones CTS-CuSO₄ 5%, CTS-CuSO₄ 2.5% y CTS-CuSO₄ 1 %, las cuales se mezclaron con el DES CCU en proporción volumétrica 1:1, vertiendo la solución en cajas de Petri de 60 mm de diámetro para su evaporación por un mínimo de 24 h a 60 °C, posteriormente se realizó la extracción del DES con metanol y el secado a 60 °C.

Para la preparación de películas porosas de CTS-MCCu₂O, se utilizaron las soluciones CTS-MCCu₂O 5%, CTS-MCCu₂O 2.5% y CTS-MCCu₂O 1%, las cuales se mezclaron con el DES CCU en proporción volumétrica 1:1. Las soluciones se vertieron en cajas de Petri de 60 mm de diámetro para su evaporación por un mínimo de 24 h a 60 °C, posteriormente se realizó la extracción del DES con metanol y el secado a 60 °C.

6.5.5. Producción de biomateriales CTS-Fe

Se produjeron biomateriales de CTS-Fe utilizando películas porosas de CTS puro previamente preparadas por la metodología EIPS. Se realizó el recubrimiento con especies de hierro utilizando la metodología denominada co-precipitación, con la cual se ha reportado la posibilidad de obtener nanopartículas de óxido de hierro (II) (γ -Fe₂O₃, Magemita) (Vallejo-Macías et al., 2020), la metodología fue optimizada para ser usada con las películas porosas de CTS puro, quedando de la siguiente manera:

- Se utiliza una mezcla de las soluciones de FeCl₃ y FeCl₂ en una proporción volumétrica 1:1, de tal manera que la proporción molar de las dos sales sea 2:1 respectivamente.
- Las películas porosas de CTS son impregnadas cada una con 5 gotas de la mezcla de sales de hierro y se llevan a sequedad a 60 °C.
- Las películas secas se hacen reaccionar en una solución de NaOH calentada a 100 °C durante 5 min.
- Se realizan los lavados necesarios hasta obtener un pH neutro, y las películas se llevan a sequedad a 60 °C.

6.6. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El análisis de la morfología de los poros y la topografía de la superficie de los materiales porosos se realizó con un microscopio electrónico de barrido (FESEM) por emisión de campo Jeol JSM 7600F.

6.7. Determinación del tamaño de poro

Para la determinación del tamaño de poro se utilizó el programa ImageJ, en el cual se analizaron las imágenes SEM obtenidas a X10,000 haciendo las mediciones de la longitud de la apertura de 1,000 poros. Los datos obtenidos se procesaron en el programa OriginPro 8, con el que se obtuvo el tamaño promedio y los histogramas correspondientes.

6.8. Pruebas de hinchamiento

El porcentaje de hinchamiento (H%) se determinó empleando diferentes medios a temperatura ambiente, utilizando la siguiente fórmula:

$$H\% = \left(\frac{W_0 - W_d}{W_d} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

donde W_d y W_0 son los pesos de la muestra seca y húmeda respectivamente.

Los medios empleados fueron: agua destilada, medio ácido (HCl buffer pH 1-2), medio básico (NaOH buffer pH 11-12) y disolución salina (NaCl 0.9%). Se determinó la cinética de hinchamiento obteniendo los pesos de las muestras a diferentes tiempos hasta saturación. El exceso de líquido fue removido antes de la determinación del peso de cada muestra.

6.9. Porosidad

Para la determinación de la porosidad efectiva de los materiales, se utilizó el método de Arquímedes con mediciones micro-volumétricas empleando metanol como el medio líquido (Moradi et al., 2014). Junto a la determinación de la porosidad se hicieron los cálculos para

determinar la densidad aparente de los materiales. Los valores de porosidad y densidad se calcularon empleando las siguientes ecuaciones:

$$\%P = \frac{V_2(\mu\text{L})}{V_2(\mu\text{L}) + V_1(\mu\text{L})} \times 100 \quad \text{Ec.2} \quad \text{Densidad} = \frac{\text{Peso}(g)}{\text{Volumen}(m\text{L})} \quad \text{Ec.3}$$

Donde V_1 es el volumen ocupado por el polímero, mientras que V_2 se refiere al volumen del líquido que se encuentra en las cavidades del material. Las mediciones se realizaron en una pipeta volumétrica (como se observa en la Figura 5), a partir de la cual se obtienen fotografías que posteriormente son analizadas en el programa ImagenJ para determinar los volúmenes en μL .

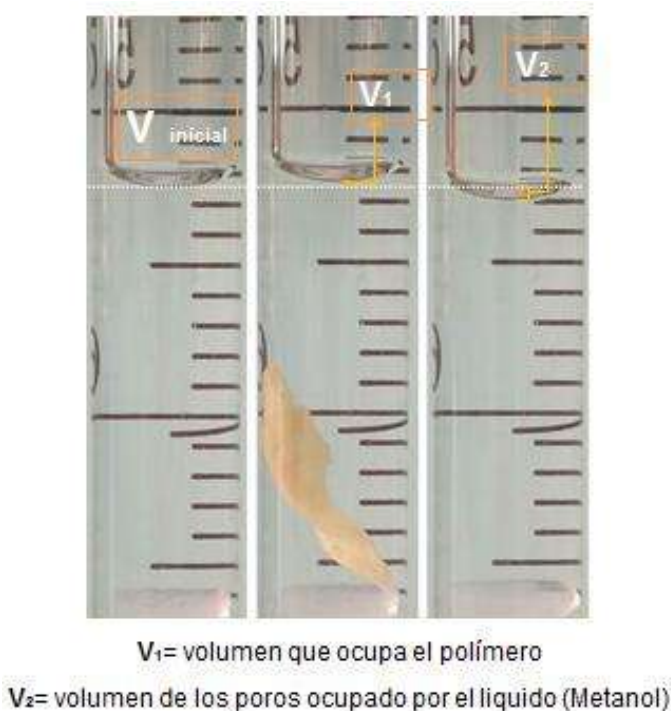


Figura 5. Ejemplo del uso de imágenes para la determinación microvolumétrica de la porosidad.

6.10. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Las interacciones moleculares entre los componentes se analizaron mediante espectroscopia de infrarrojo de transformación de Fourier en un espectrofotómetro Perkin-

Elmer, utilizando un accesorio ATR en el rango de 4000-650 cm^{-1} , la resolución se ajustó a 4 cm^{-1} y los espectros mostrados son un promedio de 32 barridos.

6.11. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis DSC y TGA se realizaron empleando el equipo SDT Q600 V20.9 Build 20. Se utilizaron muestras con un peso mínimo de 10 mg, realizándose en porta muestras de aluminio con atmosfera de argón con una razón de flujo de 100 mL/min.

Para las pruebas se realizó un primer calentamiento desde la temperatura ambiental hasta 120 °C con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min y manteniendo una isoterma de 120 °C durante 30 min para eliminar la humedad. Después las muestras se enfriaron hasta 40 °C, temperatura de la cual se inició el segundo calentamiento hasta 500 °C con una velocidad de 5 °C/min.

6.12. Análisis de la inhibición de la formación de biopelículas de *V. cholerae* en películas porosas de CTS puro

La capacidad antimicrobiana del CTS está bien documentada (Ke et al., 2021; Moeini et al., 2020; Si et al., 2021; Zheng & Zhu, 2003), por lo que ésta actividad se probó en la inhibición del crecimiento de biopelículas de bacterias en la superficie de las películas porosas de CTS producidas por la metodología EIPS. Se evaluó empleando la bacteria *V. cholerae* O1 El Tor que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). Se hizo crecer durante la noche en caldo lisogénico (LB) a 30°C, 200 rpm, y se usó como inóculo para cultivos de 1 mL de LB ajustados a 1×10^4 células. Las bacterias crecieron en placas de 24 pocillos que contenían portaobjetos de CTS de $10 \pm 0,1$ mm de diámetro o cubreobjetos de vidrio utilizados como control. Brevemente, los portaobjetos de la película no porosa de CTS obtenida mediante el método de evaporación del solvente, la película porosa de CTS (CTS- CCU 1:1) y los cubreobjetos de vidrio se esterilizaron con luz UV; los portaobjetos de CTS se hidrataron en PBS estéril durante 1 hora. Luego, se inocularon placas de cultivo que contenían portaobjetos de CTS y se incubaron a 30 °C en condiciones estáticas (sin agitación) para

promover la formación de biopelículas de *V. cholerae* durante 12, 24 y 48 h. Luego, se retiró el sobrenadante y se lavaron los discos de CTS y CTS-CCU 1:1 con PBS para eliminar las células planctónicas. La formación de biopelículas se monitorea por fluorescencia bacteriana mediante microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) empleando un equipo Olympus FV1000. GFP se excitó a 488 nm y se detectó emisión de fluorescencia a 510 nm. Se usó el software FV10-ASW Viewer para el análisis de las imágenes.

6.13. Evaluación de la viabilidad celular

Para la evaluación de las películas porosas de CTS puro como andamio celular, se utilizaron fibroblastos de prepucio, fibroblastos de abdominoplastía y fibroblastos de cicatriz hipertrófica, los cuales se sembraron en los andamios de CTS poroso deshidratados (previamente hidratados para elaborar su corte) y en andamios de CTS sin poro (películas delgadas obtenidas mediante evaporación del solvente). Se realizó la esterilización con luz UV de los andamios durante 30 min por un lado y 30 min por el otro lado, y se utilizó una densidad de 10,000 células/cm², sembrado 1,962 cel/10 µl en la parte central del andamio el cual se deja 1 h en incubación a 37 °C y 5 % CO₂, para finalmente agregar el medio complementado donde permanecen 24, 48 y 72 h.

6.14. Evaluación de la actividad catalítica de materiales de CTS-CuSO₄

La actividad catalítica del material poroso empleado como soporte de especies de cobre, se evaluó en la síntesis de un bis(indolil)metano (BIM) por la MC. Estefanía Reyes Mercado y reportada en su tesis de Maestría (Reyes Mercado, 2019). Para la síntesis se utilizó un matraz balón de 20 mL provisto de agitación magnética, se adicionaron 100 mg de indol **1** (2 equivalentes), por dos equivalentes de benzaldehído **5** y 10 mg de CTS-CuSO₄ (esto se realizó tanto con un monolito de CTS-CuSO₄ así como con hojuelas de CTS recubiertas de CuSO₄). El esquema de reacción se muestra en la Figura 6. La reacción se llevó a cabo a 80 °C durante 24 h en agitación constante, el crudo de reacción fue disuelto en DCM, y para el caso de las hojuelas se filtró con algodón para recuperar el catalizador, mientras que en el caso del monolito simplemente se retiró con una pinza y se lavó con el DCM usado para disolver el crudo de reacción. Finalmente, se evaporó el disolvente y se realizó la purificación

mediante cromatografía en columna, usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil diferentes mezclas de hexano y/o acetato de etilo.

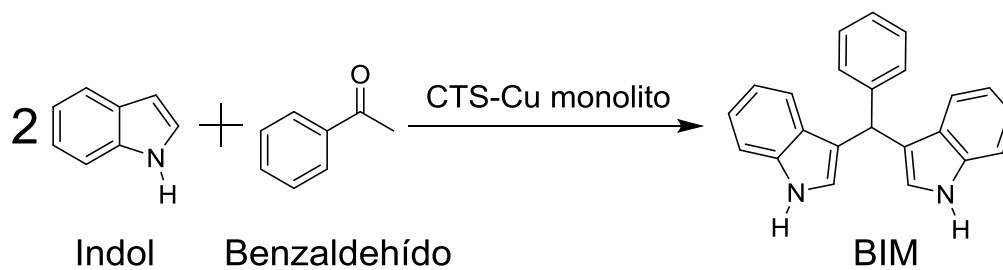


Figura 6. Esquema general de la reacción para la preparación de BIM usando CTS-Cu como catalizador.

7. Resultados y discusión

7.1. Obtención de películas porosas de quitosano puro

La idea del uso del DES como agente porógeno surgió a partir de la producción de nanofibras de CTS mediante la técnica de electrohilado, ya que se trabajó con soluciones conteniendo pequeñas cantidades de DES para la generación de nanofibras con una superficie porosa. No obstante, en ninguna de las muestras preparadas y analizadas se encontraron nanofibras pero si algunas zonas con orificios que podrían atribuirse a los lugares donde se encontraba el DES, por lo que se decidió hacer películas con una mezcla de CTS (solución ácida) con el DES ChCl:U, pensando en la posibilidad de formar películas porosas.

En los primeros experimentos se obtuvieron dos películas de CTS. Para la película 1 (CTSP1) se utilizó la disolución CTS con un 0.5% v/v de DES (esta solución se había usado previamente al intentar electrohilar), se vertió sobre una caja de Petri y se llevó a estufa a 60 °C hasta la completa evaporación del solvente, posteriormente se hicieron lavados con metanol para retirar el DES. La película resultante es delgada y transparente como se muestra en la Figura 7A), ligeramente flexible pero fácil de quebrar. El análisis por SEM muestra la obtención de una película con gran cantidad de poros de tamaño micro y nano, tal como lo revelan las micrografías de las Figuras 7B, 7C y 7D. La presencia de estos poros son resultado de la remoción del DES tras los lavados con metanol.

Observando los resultados obtenidos de la película 1, se aumentó la cantidad de DES en la mezcla, de tal manera que fuera posible obtener una película con mayor cantidad de poros. La segunda película (CTSP2) se obtuvo de la mezcla de 5 mL de la disolución CTS con 5 mL de DES (es decir una proporción 1:1 volumen/volumen). Tras la agitación de la disolución, esta se vertió en una caja de Petri y se llevó a sequedad en estufa a 60 °C, posteriormente se le hicieron varios lavados con agua y metanol para retirar el DES. Finalmente se obtuvo una película gruesa muy flexible y de color amarillento como se muestra en las Figuras 8A y 8B.

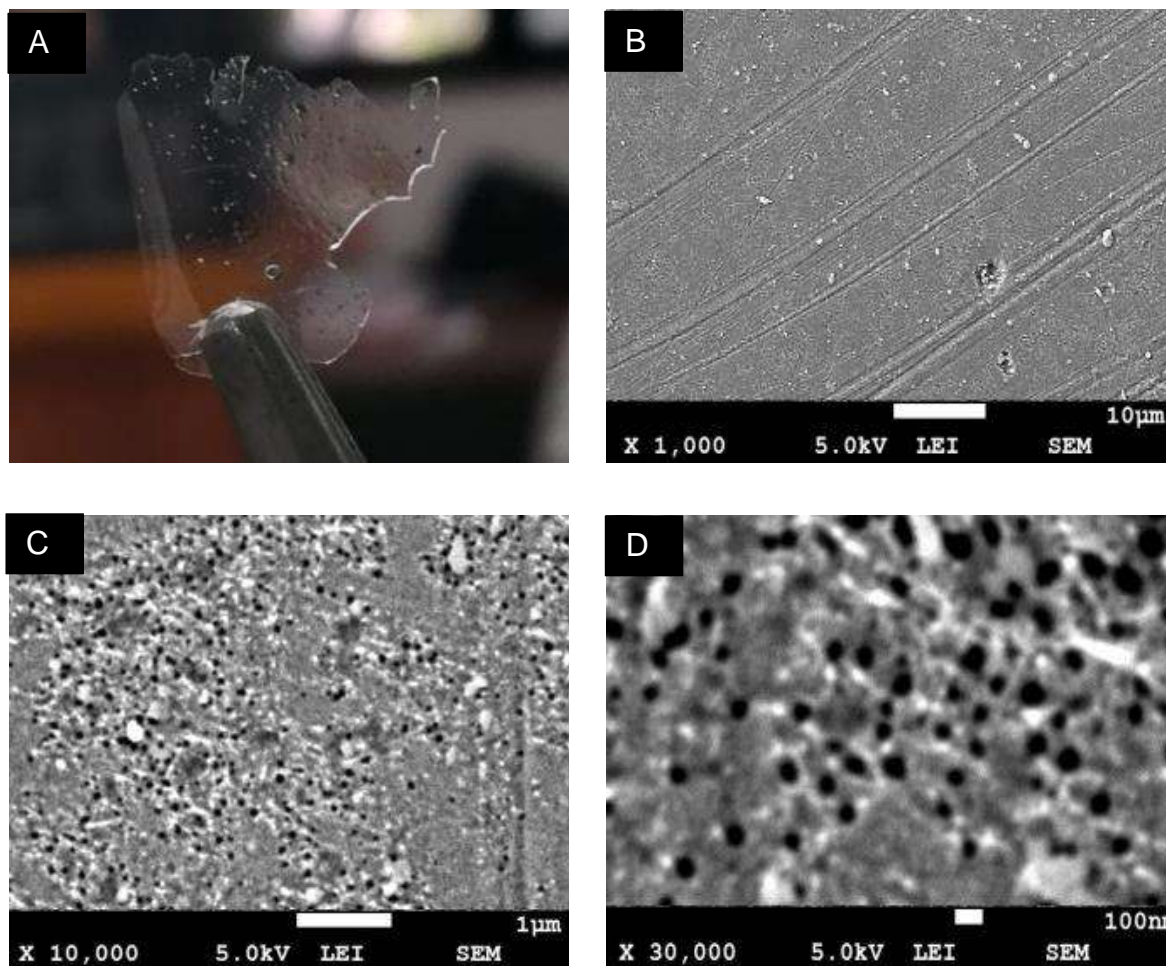


Figura 7. Fotografía de la película CTSP1 A) e imágenes SEM a X1000 B), X10000 C) y X30000 D).

Las Figuras 8C, 8D y 8E muestran la microestructura de la película CTSP2. Se trata de una superficie porosa que asemeja más a la estructura de un material en forma de esponja. Esta forma de esponja y su flexibilidad se atribuye a la presencia de DES remanente, ya que por un lado éste promueve la plastificación de la disolución de CTS y por otro lado genera porosidad una vez que se ha realizado el proceso de extracción con metanol, sin embargo, la formación de poros es mínima (Figura 8 C). Este resultado fue de gran relevancia ya que inicialmente evidenció la efectividad de la técnica EIPS para la producción de materiales porosos y dio pie a continuar con la investigación mediante la variación de diferentes parámetros del proceso.

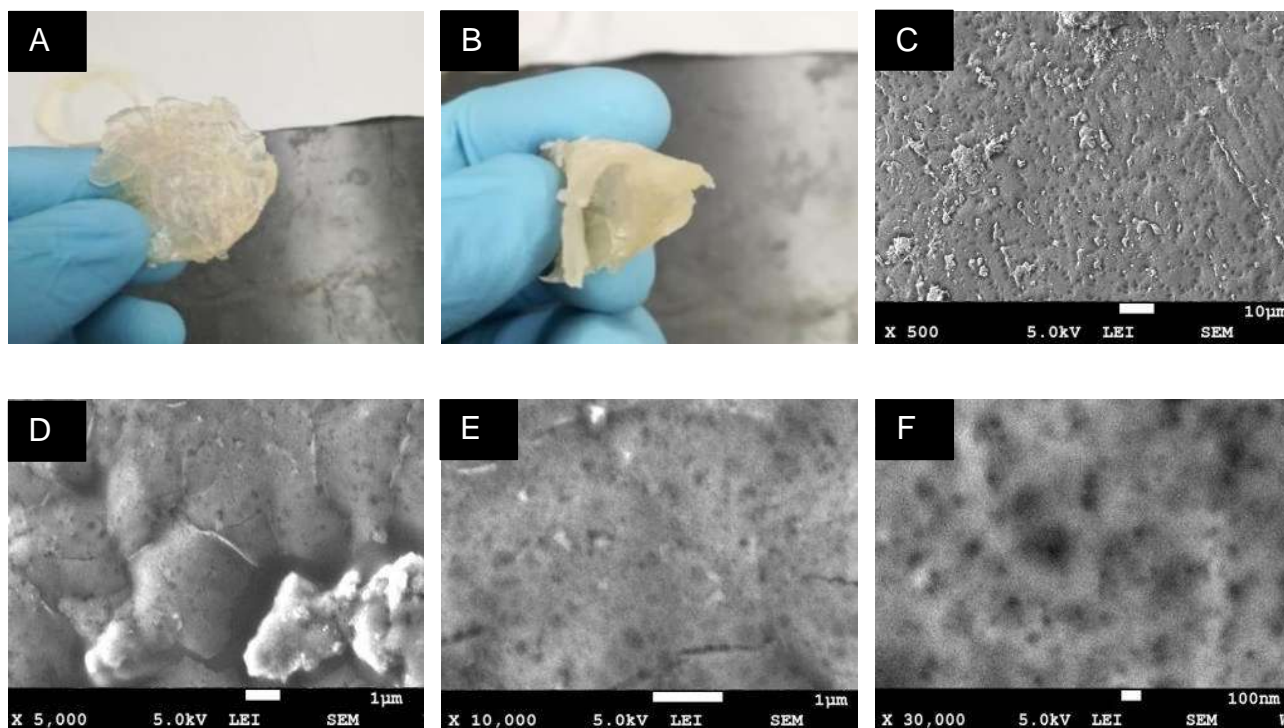


Figura 8. Fotografías de la película CTSP2 A) y B) e imágenes SEM a X500 C), X5000 D), X10000 E) y X30000 F).

A partir de este punto, el trabajo experimental se orientó a la optimización de la metodología para mejorar las características de los materiales porosos de CTS.

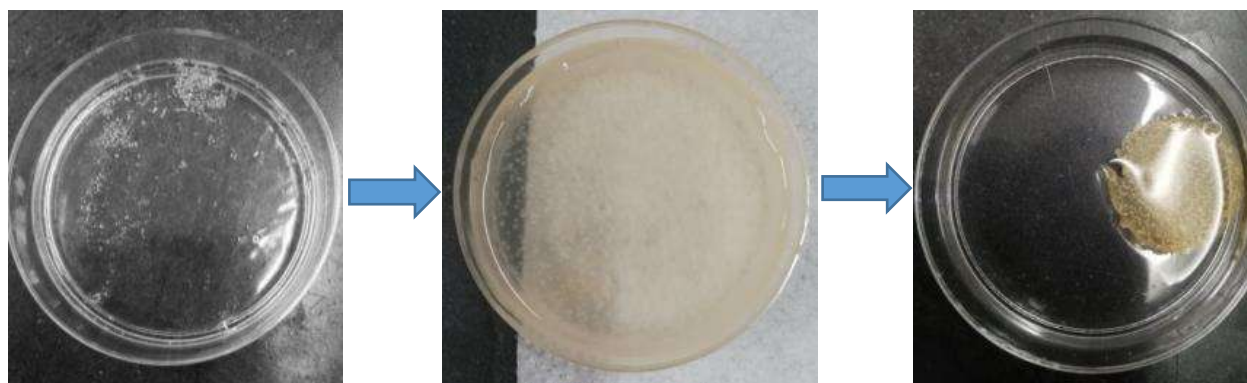
Como muestran los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo, el CTS es insoluble en el DES CCU, pero la combinación de una disolución de CTS en ácido acético con CCU puede inducir a la formación de materiales porosos de CTS. La metodología propuesta en este trabajo de investigación se describe en la bibliografía como la técnica de Separación de Fase Inducida por Evaporación en Solución (Evaporation Induced Phase Separation, EIPS) (Chen et al., 2018), no obstante, el uso de DES en su desarrollo no había sido descrito anteriormente.

En la primera serie de experimentos se desarrolló la metodología preparando mezclas CTS/CCU en proporción 1:1 en volumen, utilizando una disolución de CTS puro al 2% p/v en una disolución acuosa de ácido acético al 40% v/v y el DES CCU 2:1. La preparación de la mezcla CTS/CCU se realizó de dos maneras: 1) Adicionando la disolución de CTS al CCU con

agitación constante y 2) Adicionando el CCU a la disolución de CTS. Se observó que la adición del DES a la disolución de CTS promueve la obtención de una mezcla mucho más homogénea, esto se atribuye a que al adicionar la disolución de CTS al DES, el CTS precipita al no ser soluble en la mezcla CCU, lo que genera una mezcla no homogénea.

Adicionalmente, se trabajó en determinar una metodología adecuada para retirar los disolventes utilizados y de esta forma promover la formación de poros. Para esto, se inició con un proceso de evaporación de los disolventes (ácido acético y agua) en estufa a 60 °C durante una hora, para finalmente realizar la extracción del CCU utilizando metanol.

En la Figura 9 se muestra esquemáticamente las etapas principales del proceso y los productos obtenidos para la formación del material poroso: 1) la obtención de la mezcla CTS/CCU, 2) evaporación de los disolventes, y 3) la extracción del CCU utilizando metanol.



Etapa 1: Obtención de la mezcla CTSCCU

Etapa 2: Evaporación de los disolventes.

Etapa 3: Extracción del CCU con metanol.

Figura 9. Etapas principales del proceso EIPS para la producción de materiales porosos de CTS.

La Figura 10A muestra la microestructura generada del material al adicionar la disolución de CTS al DES, mientras que la Figura 10B, presenta la microestructura generada del material al agregar lentamente el DES a la disolución de CTS, en ambos casos la proporción de CTS y CCU es 1:1 volumen/volumen. Es evidente que la generación de poros se induce al agregar lentamente el DES a la disolución de CTS. Al hacer lo contrario no es posible obtener poros en el material ya que no se logra formar una disolución homogénea que permita generar poros

(Figura 10A). Es importante resaltar que este material (Figura 10B) tiene una mayor cantidad de poros y una distribución mucho más homogénea que el material previamente obtenido (Figura 8), lo cual se asocia a una extracción más eficiente del DES debido al aumento en la cantidad de lavados de 3 a 10.

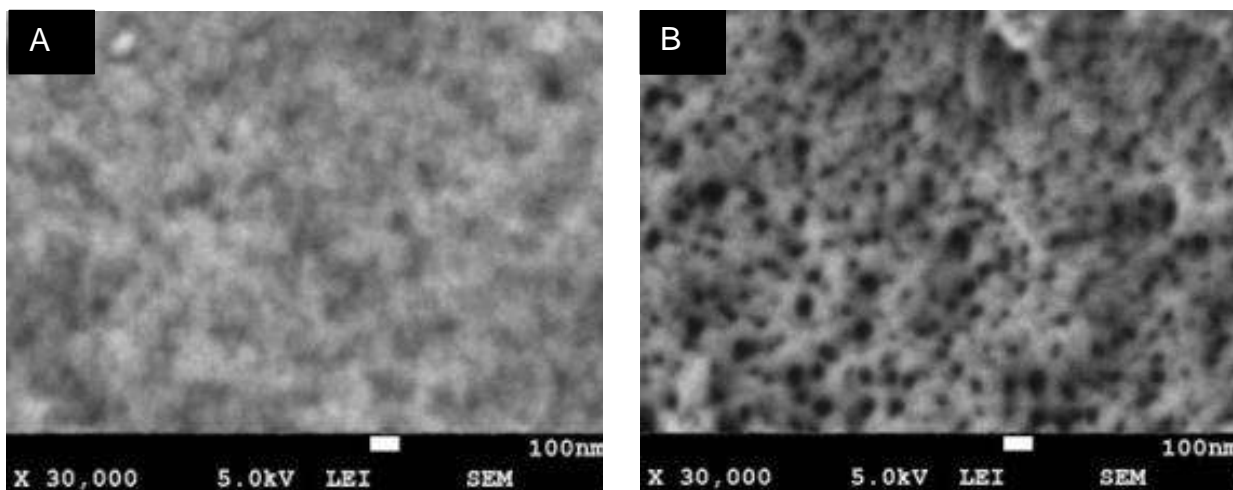


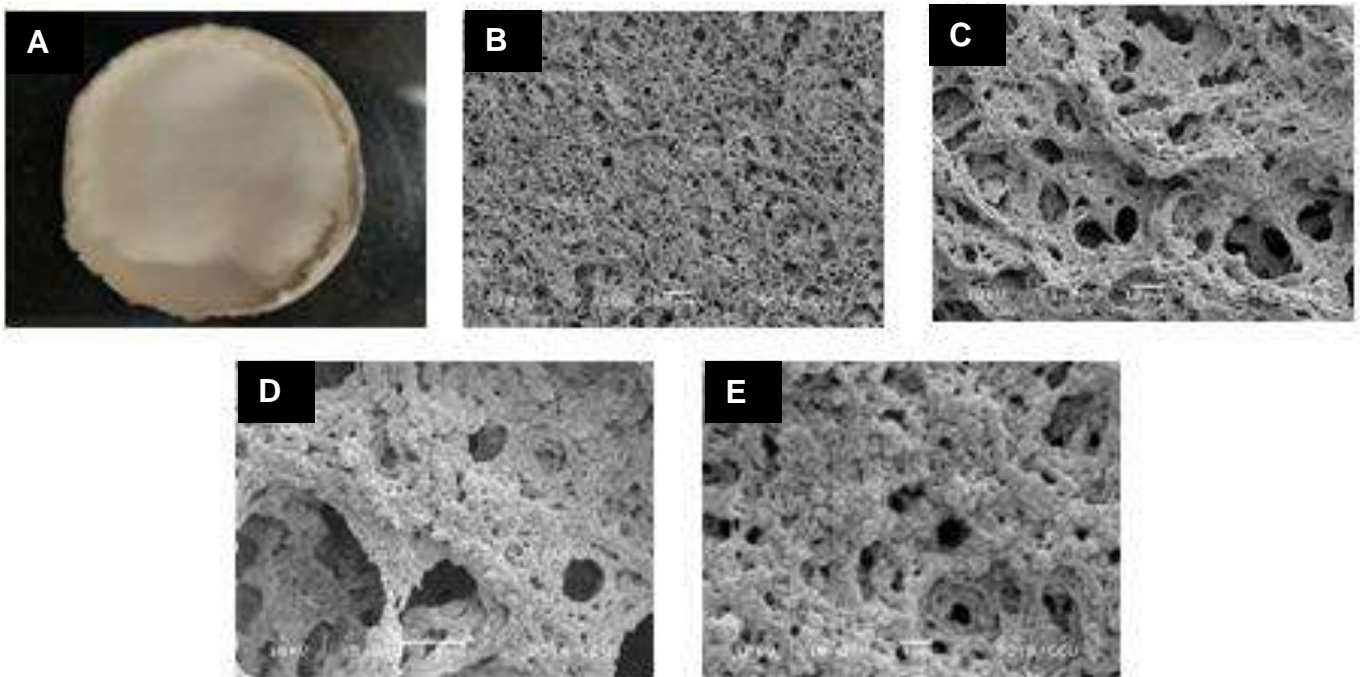
Figura 10. Imágenes SEM de la microestructura generada al A) adicionar la disolución de CTS al DES y B) adicionar el DES a la disolución de CTS.

7.2. Optimización de las condiciones para la producción de películas porosas de CTS con mayor porosidad

El uso de películas porosas en el área de ingeniería de tejidos requiere de poros de mayores dimensiones a los obtenidos previamente, por lo que se continuó en la búsqueda de condiciones para la obtención de poros de mayor tamaño. Para lograrlo, se modificaron dos parámetros de los empleados en la metodología inicial para la obtención de películas porosas; el tiempo de evaporación del disolvente se aumentó a 24 h, y se agregaron lavados con acetona posterior a los lavados con metanol para mejorar la extracción del DES y para promover un secado más rápido del material, esto último debido a la mayor facilidad de evaporación de la acetona con respecto al metanol.

La película obtenida en la etapa 1 a partir de la mezcla CTS/DES 1:1, con un tiempo de evaporación de 24 h en la etapa 2, y realizando la extracción del DES con la secuencia metanol-acetona en la etapa 3, resulta una película de color blanco con una estructura

macroscópica muy diferente a la generada en películas no porosas, las cuales son comúnmente transparentes (Figura 11A), además, la película es manejable y estable en medios acuosos. Las imágenes obtenidas por SEM (Figura 11B-11E) muestran una estructura altamente porosa con un diámetro promedio de poro de $1.7 \mu\text{m}$, y diámetros menores a $1 \mu\text{m}$ como se observa en el histograma correspondiente (Figura 11F). Con estos resultados, la metodología EIPS se establece como una técnica versátil y efectiva para la producción de películas delgadas con porosidad adecuada para su uso como andamio celular en ingeniería de tejidos.



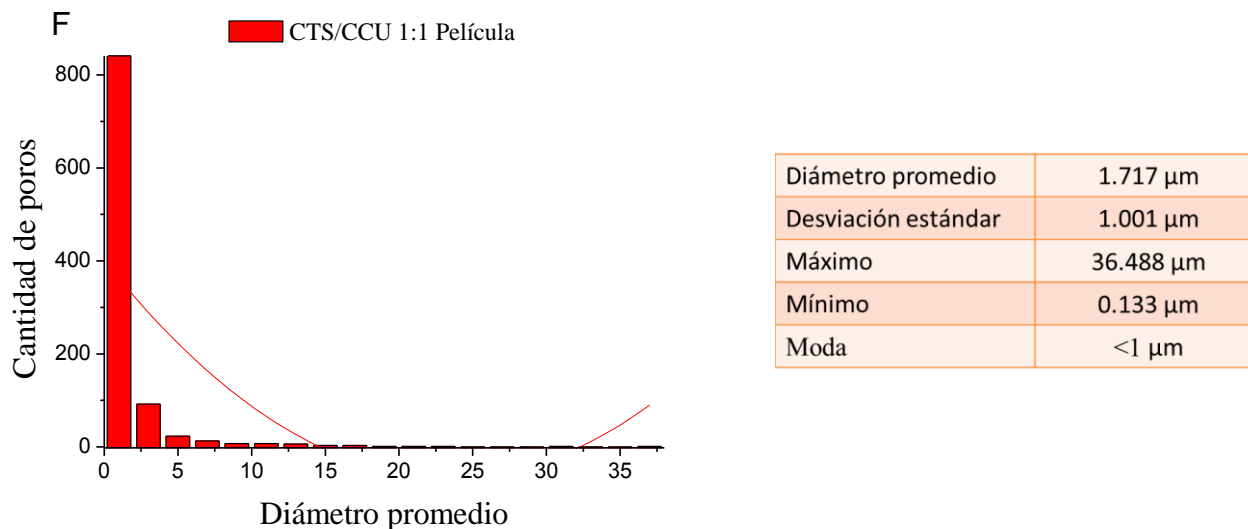


Figura 11. A) Apariencia macroscópica de la película porosa obtenida, B-E) microestructura de la película obtenida y F) histograma de distribución de tamaño de poros.

7.3. Producción de monolitos porosos de CTS

Una vez establecida la metodología, se probó la versatilidad de la técnica para la obtención de diferentes morfologías macroscópicas, para esto, se trabajó en la obtención de monolitos cilíndricos porosos, para diversificar las aplicaciones de estos materiales. Se empleó la misma metodología usada para la producción de las películas porosas, sustituyendo el uso de cajas de Petri por viales de vidrio en la segunda etapa, lo que implica también el empleo de una mayor cantidad de la mezcla CTS/CCU que permita la formación de monolitos porosos. Adicionalmente, se analizó como se afecta la producción de poros y su tamaño al utilizar diferentes cantidades de DES con respecto al volumen final de la mezcla CTS/DES. Para lo cual se usó el DES en proporciones CTS/DES 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:3. Lo anterior utilizando disoluciones de CTS al 2% p/v.

La obtención de los materiales en forma de cilindro no fue posible en todos los casos, y las porosidades no fueron las esperadas. Ya que se esperaba que al aumentar la proporción del DES, la porosidad aumentaría. Lo anterior se atribuye a que los materiales se deforman durante la última etapa debido a que contienen una gran cantidad de ácido acético y agua, ya

que el tiempo de evaporación fue de solo 1 hora, al igual que con las películas porosas obtenidas anteriormente.

La experimentación anterior y el análisis de los resultados derivó en la modificación de la etapa 2 de la metodología inicial descrita en la Figura 9. En una nueva serie de experimentos, se aumentó el tiempo de evaporación de la mezcla CCU y la disolución de CTS al 2% p/v, pasando de un tiempo de 1 hora a 24, 48 y 72 h.

La microestructura de los materiales obtenidos con 24 h de evaporación es muy similar en los 5 materiales sintetizados, por lo que se presenta solamente las imágenes de la muestra etiquetada como CTS/CCU 1:1 24 h. Macroscópicamente, los materiales presentan una coloración amarillo-ámbar y son relativamente quebradizos (Figura 12A). Las imágenes obtenidas por SEM a X1000 presentan una superficie con zonas tanto lisas como rugosas (Figura 12B). Es posible observar la presencia de poros a mayor magnificación (X10,000 y X30,000, Figuras 12C y 12D).

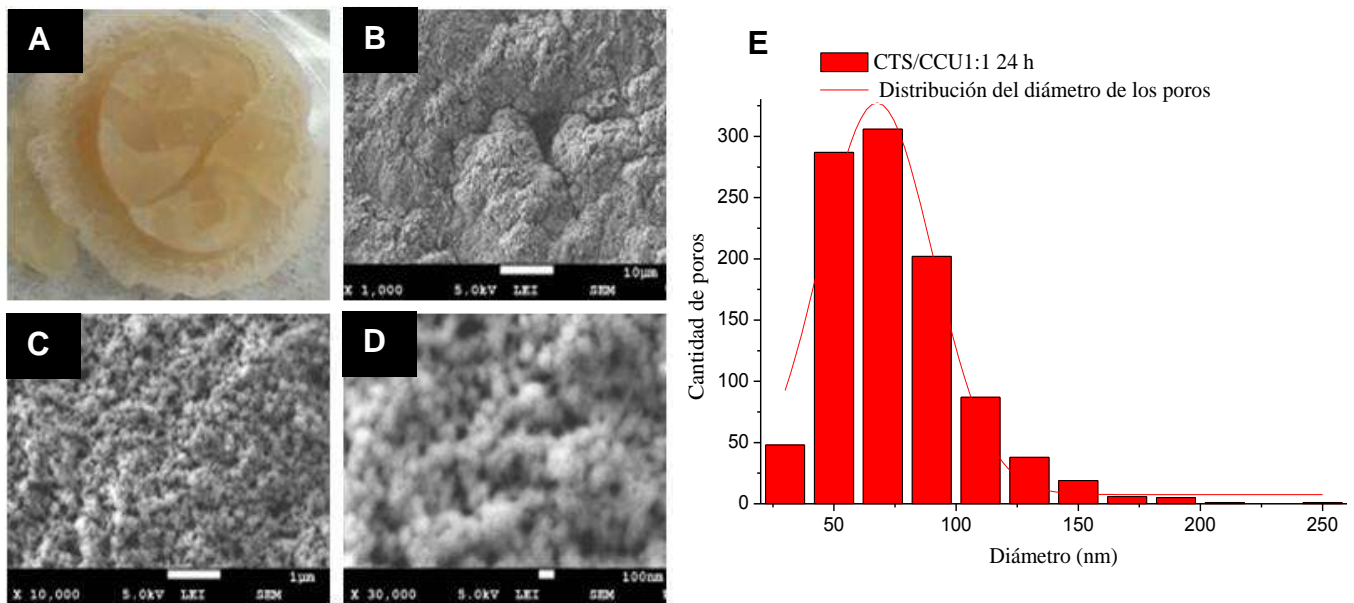


Figura 12. Fotografía del material CTS/CCU 1:1 24 h A), e imágenes obtenidas por FESEM con aumentos de X1,000 B), X10,000 C) y X30,000 D). E) Histograma obtenido del análisis de la imagen FESEM con aumento de X10,000 ilustrando la distribución de tamaños de poro.

Tras el análisis de la imagen SEM a X10,000 aumentos (Figura 12C), se determinó que para la muestra CTS/CCU 1:1 24 h, los poros presentan un diámetro promedio de 67.5 nm con una desviación estándar de alrededor de 46.2 nm, y como se puede ver en el histograma de la Figura 12E, la mayoría de los poros presentan diámetros entre los 50 y los 100 nm. Estos resultados son muy similares a los obtenidos del análisis de las imágenes SEM de los otros 4 materiales sintetizados con 24 h de evaporación del disolvente.

Los materiales procesados con 48 h de evaporación, presentan al igual que los anteriores (CTS/CCU 1:1 24 h), una coloración amarillo-ámbar. En este caso se puede observar que si se aumenta la cantidad de DES de una proporción CTS/DES 1:1 a 1:2 o 1:3, los materiales son más quebradizos, mientras que al usar una proporción de CTS/DES 2:1 o 3:1, solo se observa que los materiales que se obtienen son de menor dimensión pero aparentemente iguales a los de una proporción CTS/DES 1:1. De forma general, las imágenes SEM de los 5 materiales presentan gran similitud, por lo cual solamente se presentan las imágenes del material etiquetado como CTS/CCU 1:1 48 h.

En la Figura 13B se observa que el material presenta zonas tanto lisas como rugosas, y que a X10,000 y X30,000 aumentos (Figuras 13C y 13D, respectivamente), es posible observar un aumento en la cantidad de poros respecto del material obtenido con 24 h de evaporación, lo que evidencia que la total evaporación del buen solvente requiere tiempos superiores a 24 h. El análisis de la imagen SEM a X10,000, indica que el diámetro promedio de los poros es de 70.8 nm, con una desviación estándar de 25.8 nm, valores muy similares entre los 5 materiales sintetizados con 48 h de evaporación del disolvente. El histograma obtenido del análisis del tamaño de los poros (Figura 13E), muestra que la mayoría de los poros presentan diámetros entre los 25 y 125 nm, principalmente distribuidos entre los 50 y 100 nm.

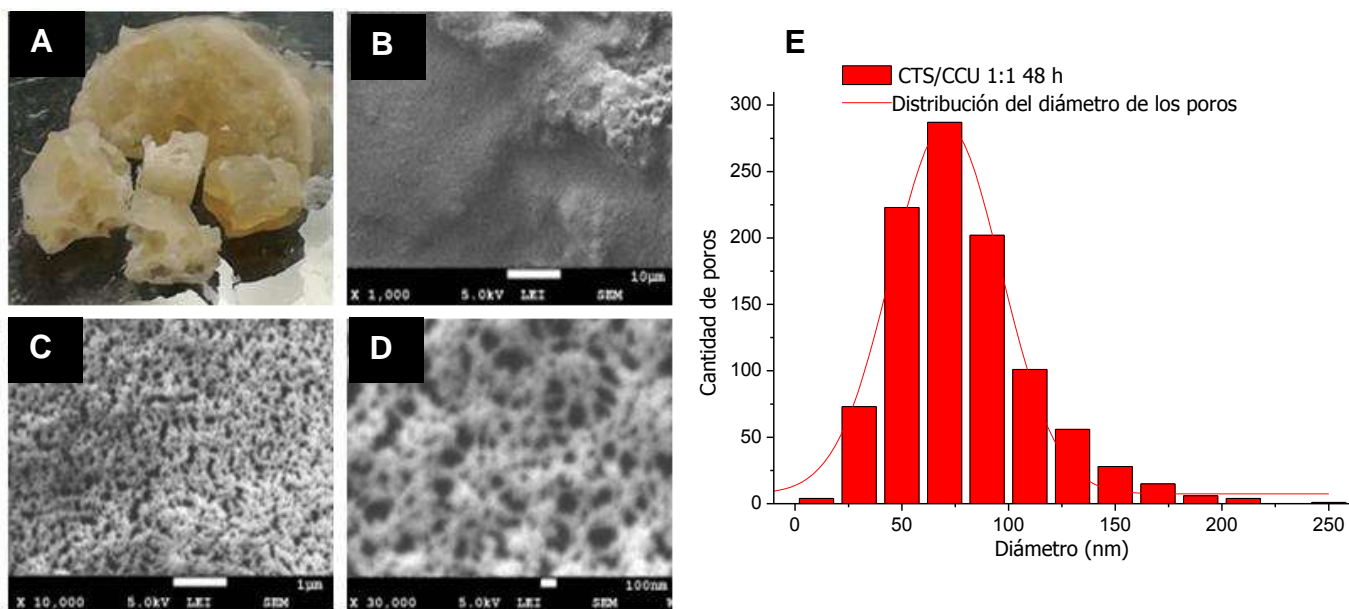


Figura 13. A) Fotografía del material CTS/CCU 1:1 48 h, e imágenes obtenidas por SEM a B) X1,000, C) X10,000 y D) X30,000. E) Histograma obtenido del análisis de la imagen SEM a X10,000, ilustrando la distribución de tamaños de poro.

Al aumentar aún más el tiempo de evaporación del buen solvente (hasta 72 h), los materiales obtenidos presentan diferencias significativas a los analizados anteriormente, tal como se observa en la Figura 14. La coloración del material que presenta mayor contenido de CTS (proporción CTS/DES 3:1), es de color amarillo, y blanquecina para los otros cuatro materiales (CTS/DES 1:1, 1:2, 1:3). Se observó que al disminuir la cantidad de disolución de CTS en la etapa 1, se obtienen materiales de mayor tamaño. Esto se atribuye al aumento del volumen del monolito debido a la presencia de mayor porosidad.

En la Figura 14 se observa que, con la disminución de la cantidad de CTS aumenta la presencia de poros de mayores dimensiones (respecto de las muestras donde se evapora solamente 24 o 48 h). Existe una gran cantidad de poros con diámetros similares a los observados anteriormente en muestras con menor tiempo de evaporación, esto se puede apreciar en las imágenes SEM obtenidas a de X30,000. En estos casos, la obtención de un tamaño promedio de poro no es viable, debido a la presencia de poros con diámetros mayores a 1 μm , así como algunos con diámetros entre 40 y 30 nm, lo que induciría errores estadísticos importantes. Aun así, el análisis del tamaño de los poros muestra que la mayoría

de los poros tienen diámetros menores a 100 nm, con la presencia de hasta 100 poros por cada 1000 con diámetros que entre 100 y 200 nm.

Del análisis de los resultados obtenidos de las pruebas del tiempo de secado, se concluye que con un tiempo de secado de mínimo 72 h, en el caso de la preparación de estructuras monolíticas, es posible obtener una buena porosidad, la cual se corroboró por SEM tal como podemos observar en la figura 14. Mientras que de la variación en la concentración del DES en las mezclas CTS/DES es posible inferir que el uso de concentraciones CTS/DES 1:2 y 1:3 provoca que el CTS se precipite en gran cantidad y se obtengan materiales frágiles los cuales durante los lavados van perdiendo gran cantidad de polímero, y en el caso del uso de mezclas con menor cantidad de DES como son las de CTS/DES 2:1 y 3:1 se obtiene un tamaño menor de poro así como materiales de dimensiones menores. Siendo así la combinación de CTS/DES en proporción 1:1 con un tiempo de evaporación de 72 h de la que se obtienen mejores materiales en cuestión de porosidad, facilidad de preparación y manipulación después de su preparación.

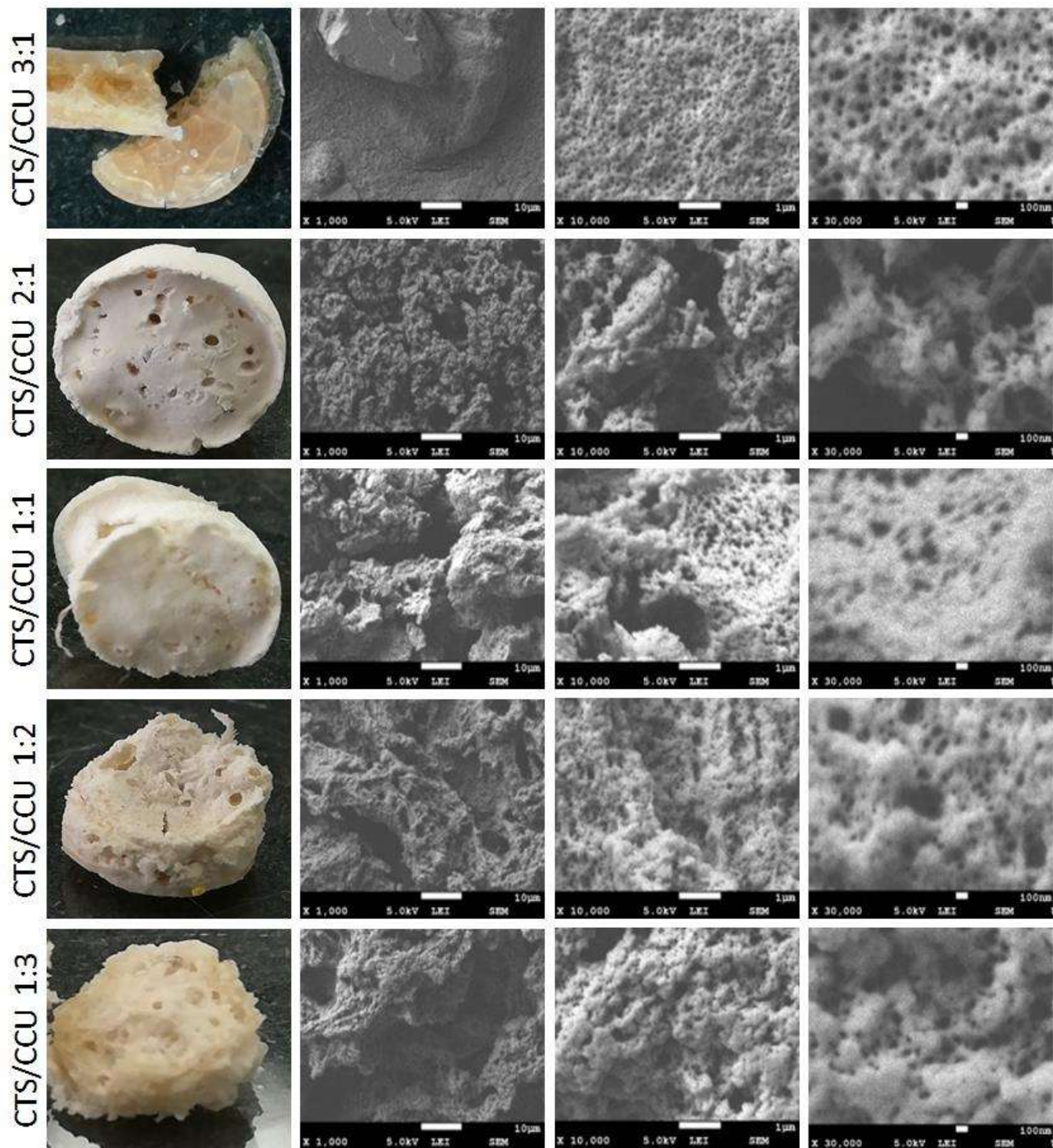


Figura 14. Se muestran en 5 series las fotografías de los materiales procesados con 72 h de evaporación del disolvente. La primera imagen de cada serie presenta las fotografías de cada uno de los materiales, mientras que las siguientes imágenes corresponden a imágenes obtenidas por SEM con aumentos de X1,000, X10,000 y X30,000 en ese orden de izquierda a derecha.

7.4. Pruebas de hinchamiento (%H)

Las características de hinchamiento de un polímero son de suma importancia en aplicaciones biomédicas debido a que el grado de hinchamiento influye en: (i) el coeficiente de difusión de soluto a través de estos materiales, (ii) las propiedades de la superficie y la movilidad superficial, y (iii) sus propiedades mecánicas. En consecuencia, para aplicaciones biomédicas como implantes y sistemas de administración de fármacos, es muy importante determinar la capacidad de absorción de agua de estos materiales a diferente pH (Pereira et al., 1998). Con el fin de analizar la capacidad de hinchamiento en diferentes medios de los materiales porosos generados, esta propiedad se exploró utilizando agua destilada, una disolución de NaOH con pH de 12, una disolución de HCl con pH de 1, y una disolución de NaCl 0.9% (solución fisiológica).

Al agrupar los máximos porcentajes de hinchamiento de cada una de las muestras analizadas en los diferentes medios, se evidencia que los materiales procesados con un mayor tiempo de evaporación (etapa 2 del proceso), presentan un mayor hinchamiento sin pérdida de material (Figura 15A). En agua destilada, el material puede absorber una gran cantidad de líquido sin deformarse estructuralmente, como ocurre con las muestras procesadas a 24 y 48 h en los diferentes medios. El porcentaje de hinchamiento a pH básico es muy similar en los materiales procesados empleando diferente tiempo de evaporación del solvente, mientras que en pH ácido, el porcentaje de hinchamiento es menor en las muestras en las que se empleó un tiempo más largo de evaporación, esto podría deberse a que los materiales que se prepararon con un menor tiempo evaporación presentan remanentes de ácido acético, lo que implica una mayor protonación de los grupos NH_2 del quitosano.

El efecto de la proporción CTS/CCU sobre el porcentaje del hinchamiento se muestra en la Figura 15B. Se observa que los materiales procesados con una mayor proporción de DES presentan un mayor porcentaje de hinchamiento en agua destilada, el hinchamiento disminuye cuando las muestras se encuentran en pH básico, pero se evidencia que la proporción 1:1 CTS/DES presenta un mayor hinchamiento, mientras que en pH ácido, las muestras con menor proporción de DES alcanzan los mayores porcentajes de hinchamiento, esto último atribuido a la presencia de ácido remanente atrapado en la estructura. Todos los materiales

son estables en los diferentes medios, excepto en medio ácido, donde terminan disolviéndose después de algunas horas. Es importante mencionar que hasta este punto ninguna de las muestras había sido previamente neutralizada, y si bien soportan el hinchamiento en agua y solución fisiológica, al secarse pierden la forma, algo que no se observa en las muestras sumergidas en medio básico, razón por la cual se decidió probar con muestras previamente neutralizadas, ya que si se desea cortarlas es más fácil hacerlo en húmedo y se busca conservar la estructura porosa después del secado.

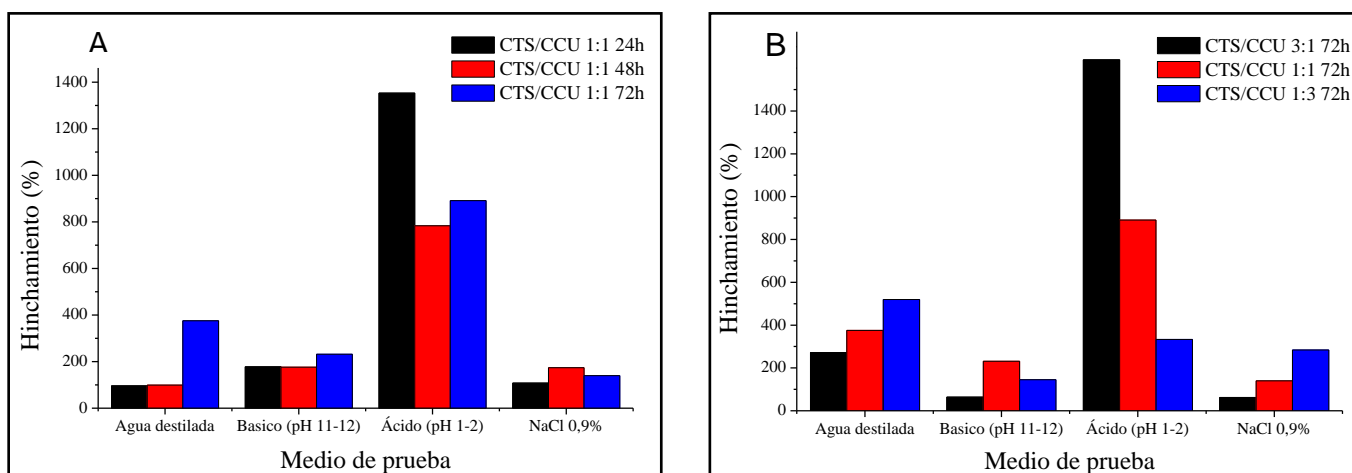


Figura 15. Porcentaje máximo de hinchamiento en diferentes medios. A) %H de los materiales procesados a diferente tiempo de evaporación utilizando la misma relación CTS/CCU (1:1). B) Porcentaje de hinchamiento máximo de los materiales al variar la relación CTS/CCU empleando 72 h de evaporación.

7.5. Hinchamiento de películas porosas

Se realizaron pruebas de hinchamiento de las películas porosas de CTS en agua destilada, las cuales fueron neutralizadas previamente en soluciones empleando diferentes concentraciones de NaOH; NaOH 1M, NaOH 0.5M, NaOH 0.1M y NaOH 0.05M. En las pruebas de hinchamiento con agua destilada las muestras neutralizadas a diferentes concentraciones de NaOH presentan un grado de hinchamiento máximo entre 500 y 750% (Figura 16). Al realizar la neutralización con disoluciones de NaOH 0.5M y NaOH 0.1M no se observa modificación en la estructura al secar nuevamente. Este resultado evidencia la importancia de la neutralización de los materiales porosos de quitosano para la obtención de estructuras estables en medios acuosos.

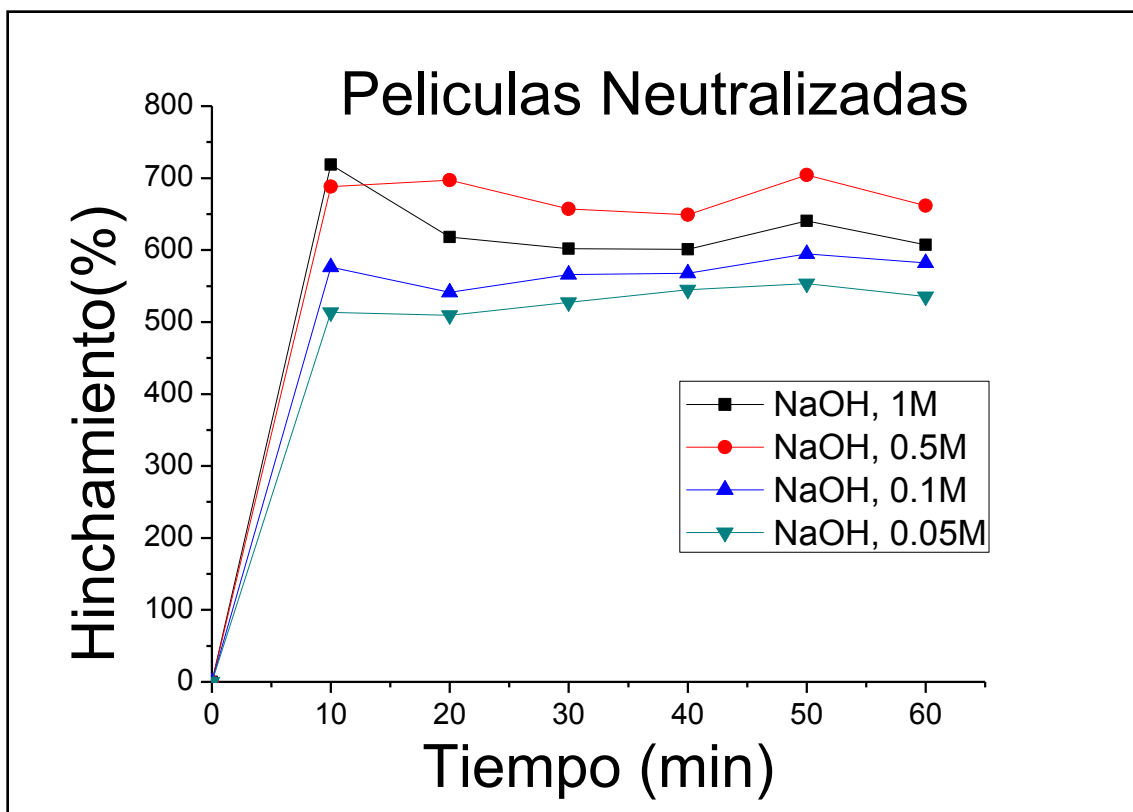


Figura 16 Cinética de Hinchamiento en agua destilada de las muestras de CTS:DES 1:1 previamente neutralizadas.

7.6. Porosidad (%P)

Con la técnica utilizada para determinar la porosidad (descrita en el apartado 2.9), es posible calcular la denominada porosidad aparente. Este término se refiere a los poros que se encuentran interconectados entre sí, lo cual resulta de gran importancia en áreas como la ingeniería de tejidos, ya que es un indicativo de la capacidad que tendrá el material para la difusión de nutrientes, así como de la posibilidad de permitir la angiogénesis (Dutta & Dutta, 2018). Aunado a la determinación del %P, es necesario determinar el tamaño promedio de los poros en cada una de las muestras, para definir si estas pueden ser útiles en ingeniería de tejidos.

Los valores obtenidos tanto de densidad (ρ) como del %P para los materiales porosos de CTS obtenidos empleando diferentes proporciones del DES se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores obtenidos de densidad (ρ) y porcentaje de porosidad (%P) para los materiales porosos de CTS.

Material CTS/CCU	ρ (g/cm³)	%P
CTS/CCU 3:1	1.3511	52.00
CTS/CCU 1:1	0.6405	72.77
CTS/CCU 1:3	1.0200	60.81
Películas CTS	0.3021	62.55

Los resultados del %P para las muestras CTS/CCU 3:1 y CTS/CCU 1:1 concuerdan tanto con lo observado en sus respectivas imágenes SEM (Figura 14), como con los resultados de las pruebas de %H de los materiales en agua y en solución salina (Figura 15B). Es decir, la muestra procesada con una mayor proporción de DES (CTS/CCU 3:1) presenta menor %P, lo que es concordante con el menor tamaño de los poros observado en la Figura 14, y con el menor %H que el de la muestra CTS/CCU 1:1 que presenta poros de mayores dimensiones, y por lo tanto un área superficial mayor que permite un grado de %H más elevado.

En la muestra CTS/CCU 1:3 se observa una disminución en la porosidad del material con respecto a las otras dos muestras en forma de monolitos. Esto no es concordante con los resultados obtenidos en las pruebas de hinchamiento, donde el %H es mayor que el de las otras muestras. Estas incongruencias pueden ser explicadas con las imágenes SEM de esta muestra (Figura 14), donde se puede observar que al igual que en la muestra CTS/CCU 1:1 hay varios poros de gran tamaño. La diferencia radica en que, en la muestra CTS/CCU 1:1 los poros de mayor tamaño se encuentran mejor distribuidos en toda la muestra, mientras que en el material CTS/CCU 1:3, aunque también hay poros de gran tamaño, su distribución no es homogénea ya que hay zonas con espacios vacíos y zonas donde el material se aglomera. Esto provoca que la porosidad total se reduzca, y en contraparte, estos grandes poros provocan que el líquido usado en las pruebas de hinchamiento fluya más fácilmente a todo el material, dando como resultado un hinchamiento mayor.

Finalmente, se puede observar que el resultado del %P para la película de CTS no es concordante con la densidad, ya que al analizar los datos de las otras muestras existe una

relación inversamente proporcional entre ambas propiedades, ya que al disminuir la densidad del material la porosidad aumenta, lo cual es totalmente congruente. Para poder explicar esto, es necesario analizar tanto las imágenes SEM, como los resultados del %H (Figuras 11 y 16, respectivamente). Los resultados sugieren que la porosidad debería ser mayor que la observada, ya que la muestra presenta poros con tamaños entre 130 nm y 36.4 μm , y se encuentran distribuidos homogéneamente; también presentan un alto grado de hinchamiento. Estas medidas indican que el líquido fluye fácilmente en la muestra. Es posible que el %P no sea concordante por el hecho de que la muestra es muy delgada y que además los poros son bastante grandes comparados con las otras muestras, estas dos características provocan que el líquido usado para determinar la porosidad (metanol) salga fácilmente de la muestra, y que los resultados de porosidad para este caso tengan una mayor posibilidad de error. Por lo que sería necesario buscar algún otro líquido para realizar la prueba.

7.7. Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

El análisis FTIR permite determinar si se promueve algún cambio significativo de las vibraciones características de los grupos funcionales del CTS, lo que puede indicar posibles interacciones químicas entre los componentes. Las muestras de CTS después de su procesamiento mediante la técnica EIPS fueron analizadas mediante FTIR para determinar si el procesamiento promueve alguna modificación de la estructura química del CTS, si existen interacciones químicas entre los componentes, o la presencia de disolvente remanente.

Los espectros FTIR del CTS y CCU puros, y del material poroso CTS/CCU (1:1) empleando diferentes tiempos de evaporación se muestran en la Figura 17, y las vibraciones FTIR características del CTS y CCU puros se describen en la Tabla 2.

Después del procesamiento mediante la técnica EIPS, al analizar las vibraciones FTIR características del CTS puro (Figura 17) se observa que algunas de las señales son ligeramente más anchas o inclusive se presentan vibraciones de baja intensidad, que al analizar el espectro de CTS puro no es posible observarlas. Debido a que se tenía la incógnita sobre la completa extracción total del CCU de las muestras, se utilizó un espectro FTIR del CCU para comparar las señales. En este caso, es posible observar el ensanchamiento de

algunas vibraciones o la aparición de algunas nuevas que sugieren la presencia de CCU remanente en la matriz polimérica.

Al analizar y comparar los espectros de los componentes puros y del material poroso procesado a diferentes tiempos de evaporación (Figura 17), se observa que el material poroso presenta vibraciones adicionales en 1730 cm^{-1} , 1612 cm^{-1} , 1438 cm^{-1} 1084 cm^{-1} , siendo la señal que más destaca la de 779 cm^{-1} respecto del espectro del CTS puro, y son más evidentes en el material evaporado a 24 h. Tal y como se muestra en la Tabla 2, dichas vibraciones son características del CCU, lo que evidencia la presencia de DES remanente en el material poroso. Esto puede relacionarse al hecho de que, un tiempo de evaporación menor (24 h) genera poros más pequeños, lo que puede dificultar la extracción del DES.

Algo similar se observa en la Figura 18, la cual muestra el comparativo de los espectros FTIR de materiales porosos empleando diferentes proporciones de CTS/CCU, donde las mismas señales son más fáciles de observar en la muestra con una mayor proporción de DES (CTS/CCU 1:3 72 h).

Tabla 2. Vibraciones FTIR características de los materiales de CTS puro y CTS/CCU.

Quitosano (CTS)		Cloruro de colina-Urea (CCU)	
Número de onda (cm^{-1})	Señal asignada	Número de onda (cm^{-1})	Señal asignada
3353	Estiramiento N-H	3320	Estiramiento N-H
3297	Estiramiento N-H	3195	Estiramiento N-H
2868	Estiramiento C-H	1730	Estiramiento C=O
1651	Estiramiento C=O	1612	Estiramiento C=O, C-N
1546	Estiramiento C-N	1438	Flexión N-H
1311	Flexión N-H	1084	Estiramiento C-N, C-O
1058	Estiramiento C-O, C-N	779	Balanceo N-H, C-H
890	Balanceo N-H, C-H		

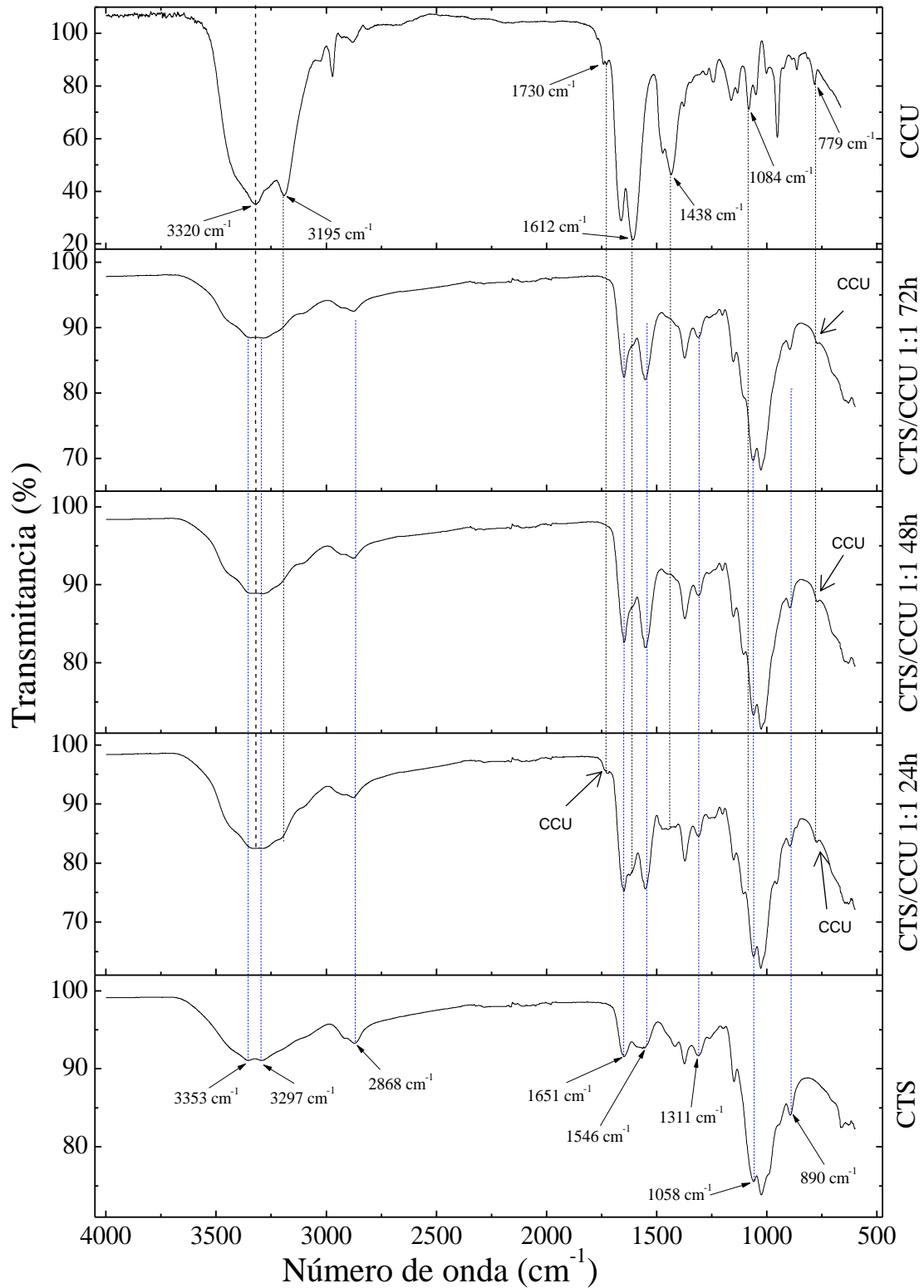


Figura 17. Espectros de FTIR del CTS y el CCU puros y de los materiales CTS/CCU 1:1 con diferentes tiempos de evaporación del disolvente.

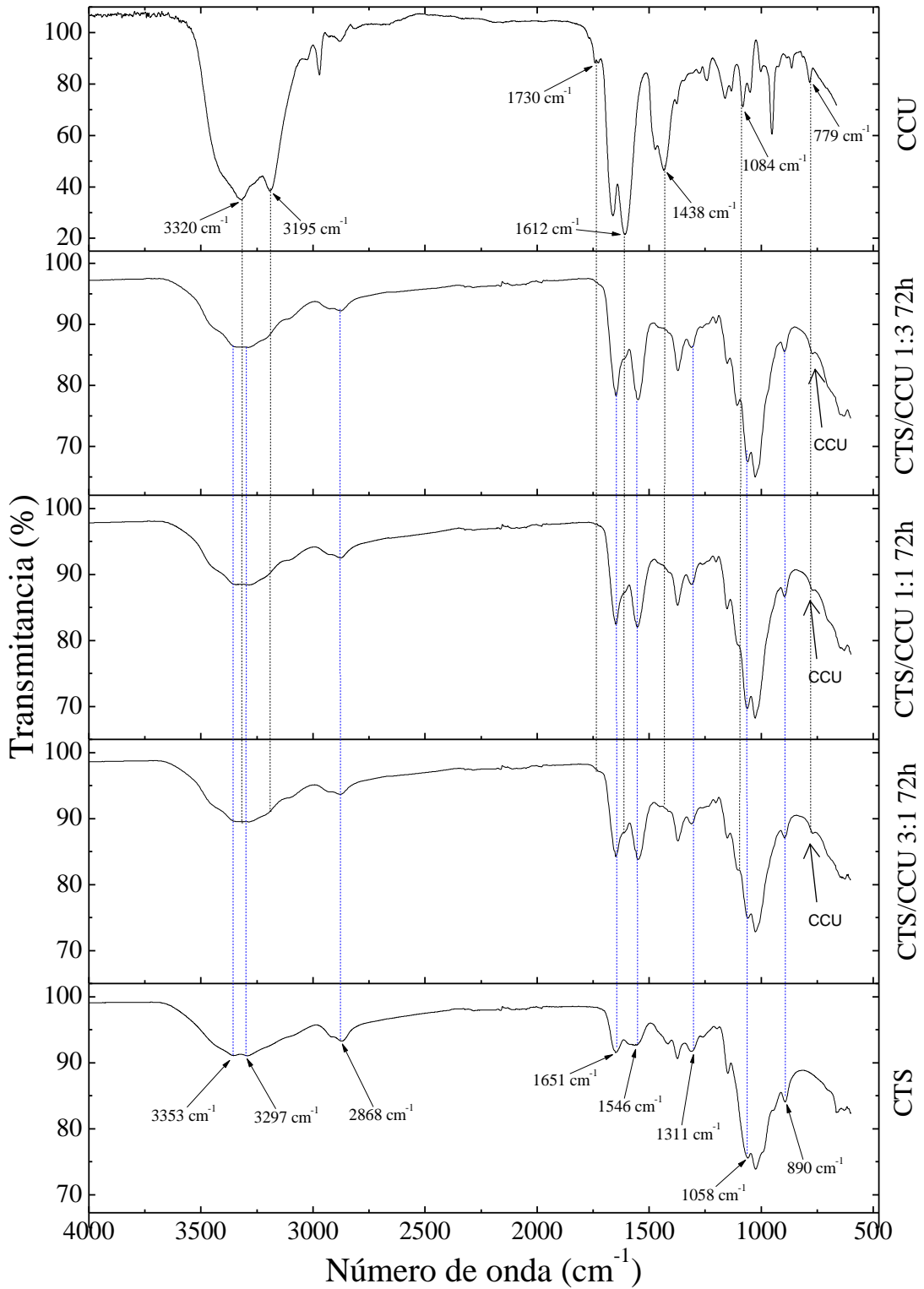


Figura 18. Espectros de FTIR CTS y el CCU puros, y de los materiales CTS/CCU 3:1, CTS/CCU 1:1 y CTS/CCU 1:3 con el mismo tiempo de evaporación del disolvente.

7.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría analítica (TGA)

Los termogramas de CTS, CTS/CCU (1:3) y CTS/CCU (3:1) se muestran en la Figura 19A. Todas las muestras presentan tres eventos de pérdida de peso. La primera pérdida de peso está relacionada a la evaporación de humedad absorbida del ambiente (registrada desde temperatura ambiente hasta 120 °C), esto debido a que el CTS es un biopolímero altamente hidrofílico. Se observa que el contenido de humedad está relacionado con la proporción utilizada de CTS/CCU; 9.42%, 7.53% y 4.69% para CTS puro, CTS/CCU (1: 3) y CTS/CCU (3:1) respectivamente, lo que indica un mayor contenido de humedad en la muestra de CTS puro. De acuerdo a lo observado por FTIR, esto puede estar relacionado con la presencia de DES remanente en el material, el cual interactúa con los grupos hidrofílicos de CTS a través de enlaces por puentes de hidrógeno intermoleculares, deshabilitando la capacidad natural del CTS de absorber de humedad del ambiente. Esto es más evidente en la muestra con la mayor proporción de CCU (CTS/CCU (1:3)), lo que implica una mayor interacción entre los componentes.

La segunda pérdida de peso observada en CTS puro arriba de 250 °C, está relacionada con la degradación térmica (Corazzari et al., 2015). Esta dramática pérdida de peso en el rango de temperatura de 250-350 °C, implica la liberación de H₂O, NH₃, CO, CO₂ y CH₃COOH (Shivashankar, M., & Mandal, 2012). Como se puede ver en la Figura 19A, el CCU deteriora la estabilidad térmica del CTS puro; esto es ligeramente evidente en la muestra CTS/CCU (3:1) con una disminución en la temperatura de degradación en aproximadamente 9 °C. Sin embargo, la temperatura de degradación para la muestra CTS/CCU (1:3) disminuyó drásticamente en aproximadamente 46 °C en comparación al de CTS puro, esto puede estar relacionado con un mayor contenido residual de CCU debido a la sobresaturación. El deterioro de la estabilidad térmica de las películas CTS debido a la adición de DES fue informado previamente por Wong et al (Wong et al., 2018), los autores también informaron una mejora positiva en la conductividad de protones sin hinchamiento excesivo y estabilidad de la película para evitar la disociación de la película en agua usando DES compuesto de cloruro de colina / urea como plastificante.

Finalmente, un cambio en la pendiente de la curva del termograma por encima de 350 °C indica un tercer proceso relacionado a la liberación de CH₄ debido a una modificación adicional del material, lo que provoca la producción de metano y la posterior formación de una estructura similar al grafito por un mecanismo de deshidrogenación (Corazzari et al., 2015).

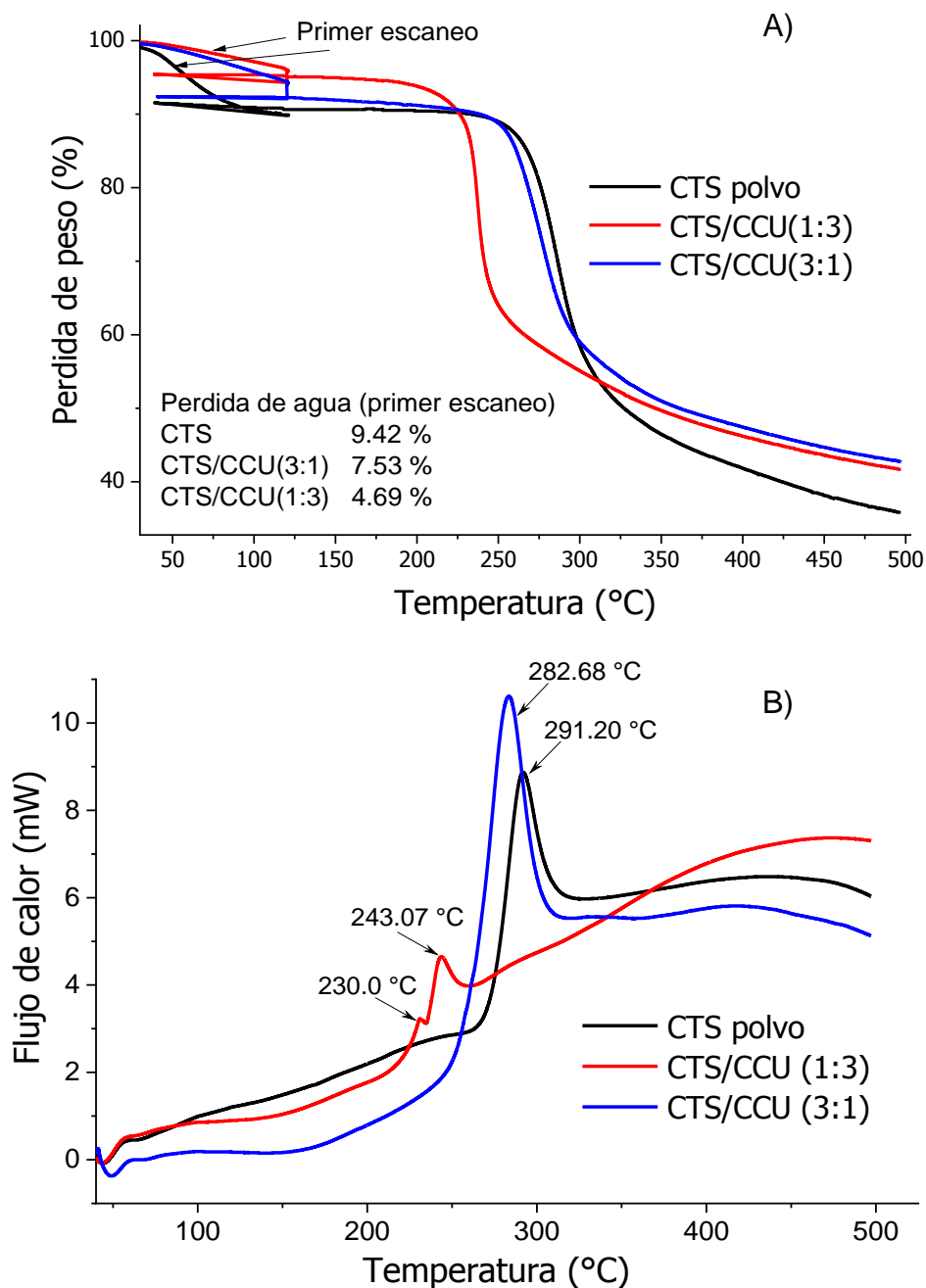


Figura 19. Termogramas TGA A) y DSC B) de CTS, CTS/CCU (1:3) y CTS (3:1).

El análisis DSC de CTS, CTS/CCU (1:3) y CTS/CCU (3:1) se muestra en la Figura 19B. Después de la eliminación de la humedad, el CTS no muestra ninguna transición térmica desde la temperatura ambiente hasta 270 °C. El intenso pico exotérmico a 291.20 °C se asigna a la degradación térmica del CTS debido a la deshidratación de monómeros de las unidades de azúcar, la división del enlace glucósido y la descomposición de las unidades acetil y desacetiladas (Corazzari et al., 2015; Deng et al., 2007; Hassan et al., 2018; Wong et al., 2018). Los termogramas DSC también confirman la disminución de la estabilidad térmica CTS debido a la presencia del CCU; las temperaturas de degradación térmica para CTS/CCU (3:1) y CTS/CCU (1:3) son más bajas que para el CTS puro en aproximadamente 9 °C y 48 °C respectivamente, lo que está en buena correlación con los resultados de TGA.

En el material CTS/CCU (1:3), se observa un cambio drástico en el comportamiento térmico. A la par de la mayor disminución de la temperatura de degradación térmica, la degradación requiere una entalpía considerablemente menor (26.67 J/g) que los materiales porosos CTS (147.0 J/g) y CTS/CCU (3:1) (140.80 J/g). Se observa un evento térmico adicional a 231,15 °C que podría atribuirse a la descomposición de CCU. El CCU puro tiene una temperatura de descomposición de 189.6 °C (Delgado-Mellado et al., 2018), sin embargo, la interacción del DES con el CTS podría influir en el aumento de la temperatura de descomposición con una compensación en la estabilidad térmica del CTS.

7.9. Inhibición de la formación de biopelículas de *Vibrio cholerae* en superficies de quitosano poroso

Vibrio cholerae es una bacteria y agente causante de la enfermedad intestinal cólera; los serogrupos O1 y O139 se han identificado como la causa de las epidemias de cólera. *V. cholerae* puede cambiar entre estilos de vida móviles y biopelículas. Las biopelículas pueden crecer ancladas a superficies abióticas o sustratos bióticos como la mucosa intestinal humana o el exoesqueleto quitinoso de los crustáceos. La bacteria puede formar agregados en suspensión, flóculos y películas formadas en la interface líquido-aire en diferentes entornos. *V. cholerae* puede formar agregados similares a biopelículas durante la infección que podrían desempeñar un papel crítico en la patogénesis y la transmisión de enfermedades.

Contrario a la quitina, el cual es un biopolímero que *V. cholerae* usa como sustrato para crecer y formar su biopelículas (Meibom et al., 2004), estudios anteriores han demostrado la propiedad anti-biopelículas del CTS, que es atribuida a los grupos funcionales amino (NH_2) de las unidades de *N*-acetilglucosamina presentes en las cadenas de CTS. Cuando los grupos amino se protonan, confieren una carga positiva al CTS, que interactúa electrostáticamente con componentes de la biopelícula cargados negativamente como exopolisacáridos, proteínas, ADN, carbohidratos, proteínas y lípidos, lo que resulta en un efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas (Bellich et al., 2016; Cheung et al., 2015; Perinelli et al., 2018; Silva & Benitez, 2016). Recientemente, se demostró que los materiales poliméricos que tienen grupos catiónicos pueden secuestrar el patógeno *V. cholerae* en grupos, por lo que tienen el potencial de inhibir su adhesión al huésped. Esto da como resultado una modulación compleja de factores de virulencia y expresión génica (Perez-Soto et al., 2017).

Las películas de CTS generadas por el método de separación de fases asistido por DES podrían tener diferentes propiedades de anclaje para promover o retrasar la adhesión y colonización bacterianas. *V. cholerae* fue empleado como organismo modelo para evaluar el crecimiento de biopelículas bacterianas en las superficies de CTS. Fue de nuestro interés evaluar en un conjunto preliminar de experimentos las propiedades antimicrobianas de las películas de CTS y si sus propiedades superficiales (porosidad) afectan el crecimiento de biopelículas. De tal forma que se analizó el crecimiento de biopelículas de *V. cholerae* en superficies de quitosano porosas y no porosas (estas últimas preparadas por el método de evaporación del solvente), lo cual se muestra en la Figura 20.

Se observa que después de 12 h de crecimiento, *V. cholerae* cubrió toda la superficie de la película transparente de CTS no porosa (etiquetada como CTS en la Figura 20), mientras que la población fue baja a 24 h de tiempo de incubación. Después de 48 h de incubación, solo se observaron unas pocas células fluorescentes activas de *V. cholerae* en la superficie del CTS (Fig. 4A-4C). Inesperadamente, en la superficie porosa del material CTS-CCU 1:1, la formación de biopelícula de *V. cholerae* se retrasó en comparación con la superficie de CTS no poroso y del control de la superficie de vidrio, después de 24 h de incubación, solo unas pocas células se unieron a la superficie de la película de CTS, mientras que a 48 h de incubación, no se observó la formación de biopelícula en la película porosa (Figura 20D-20F).

Estos resultados evidencian el importante efecto de la microestructura del CTS, ya que, cuando la película no contiene poros, a pesar de que la capacidad antimicrobiana natural del CTS, es evidente que la presencia de poros en la microestructura potencia de manera extraordinaria esta capacidad; tanto en la velocidad de inhibición del crecimiento de la biopelícula como en el resultado final de inhibición.

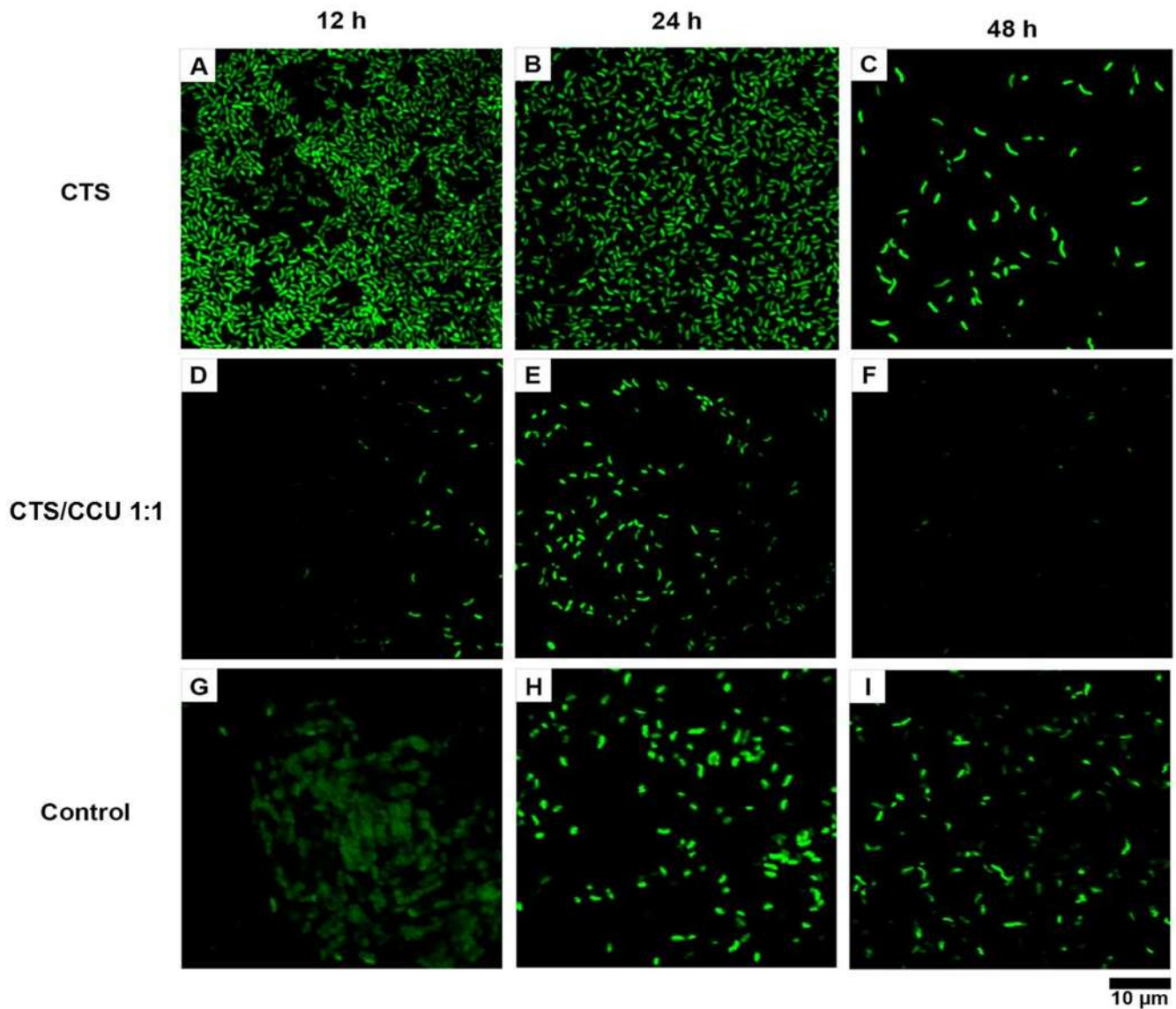


Figura 20. Formación de biopelículas de *V. cholerae* en las superficies de CTS, no poroso (CTS), CTS poroso (CTS / CCU 1:1) y en placa de vidrio como control. Imágenes representativas de microscopía confocal con escáner láser tomadas a las 12, 24 y 48 h de cultivo estático de *V. cholerae*.

7.10. Evaluación de la viabilidad celular

Se logró obtener materiales porosos de CTS con característica morfológica que resultan muy atractivas para su aplicación en cultivos celulares en 3D. Las películas porosas obtenidas fueron evaluadas respecto a la viabilidad celular de fibroblastos (Figura 21). Estas pruebas fueron realizadas por el grupo de trabajo de la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez del Instituto Nacional de Rehabilitación con la participación de la Biol. Julieta García López

Tal y como lo muestra la Figura 21, se observaron células viables de los diferentes tipos de fibroblastos desde las 24 h hasta 72 h, incrementando su número conforme avanza el tiempo. En el andamio poroso se observan células viables desde las 24 h, y no se observa señal positiva en rojo, que indique muerte celular. Al aumentar el tiempo, se observa el crecimiento celular identificada por zonas de tonalidad verde fosforescente, con una morfología del crecimiento aparentemente delimitada por los poros del andamio; lo que sugiere que las células sembradas crecen en los poros tomando su forma, observándose además más cúmulos de células en andamios sembrados con fibroblastos de abdomenoplastía y de cicatriz hipertrófica respecto del crecimiento de fibroblastos de prepucio (Figura 21).

Por su parte, en el andamio de CTS no poroso, se mantiene viabilidad celular y se observan prolongaciones de las células (Figura 22), lo que indica que se encuentran en su forma activa (es decir, están produciendo fibras de colágena) con unión intercelular aumentando desde las 24 h, siendo mayor en los fibroblastos de abdomenoplastía, además de observarse un aumento en el número de células viables. Sin embargo, se observa que se forma una monocapa sobre el andamio, la cual es débil, ya que se desprende de éste con la manipulación, por lo que las células no se mantienen unidas al andamio.

VIABILIDAD DE FIBROBLASTOS EN ANDAMIOS DE QUITOSANO POROSO

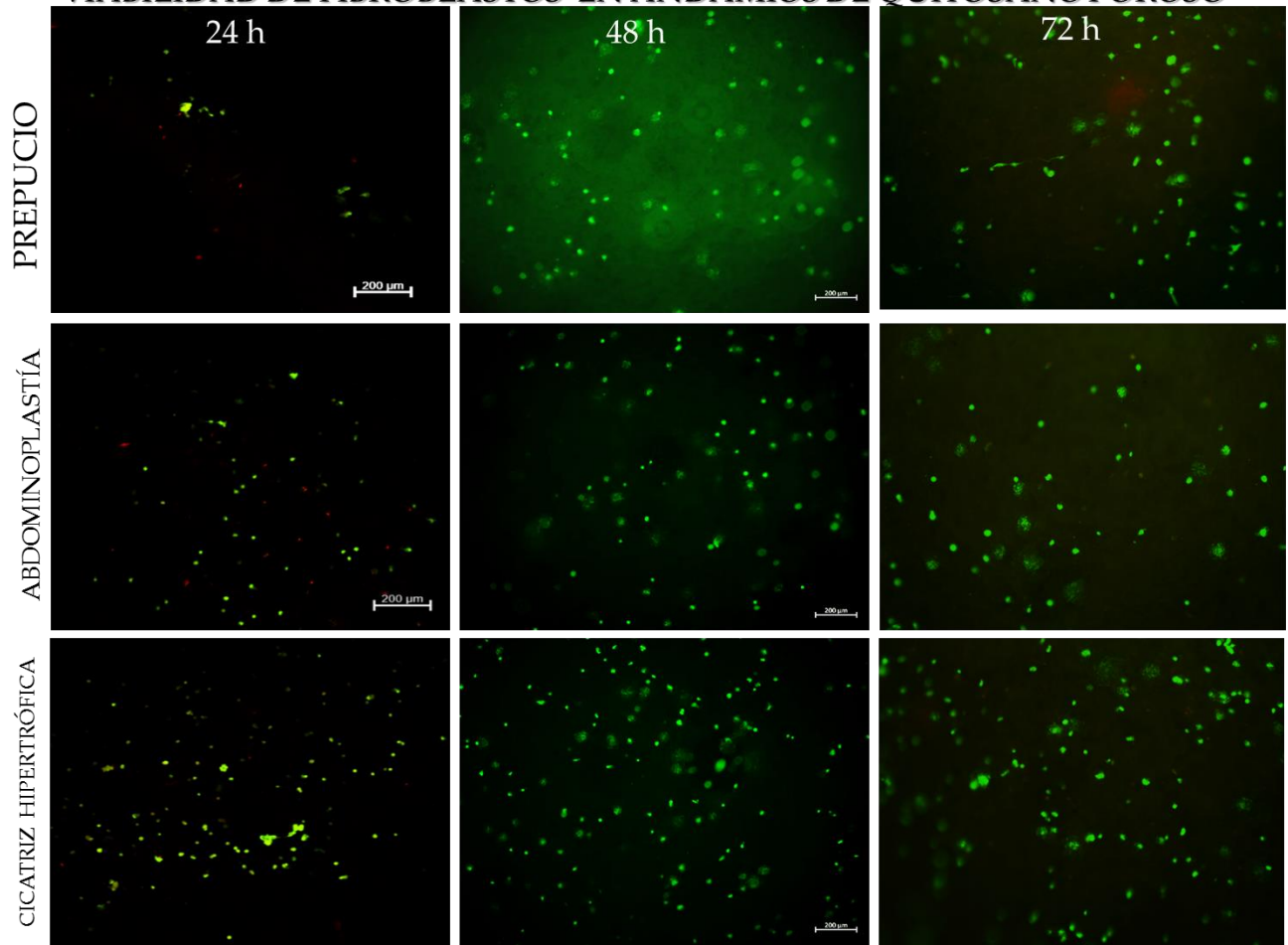


Figura 21. Imágenes obtenidas por microscopia con focal de la viabilidad de fibroblastos en andamios porosos de CTS.

VIABILIDAD DE FIBROBLASTOS EN ANDAMIOS DE QUITOSANO

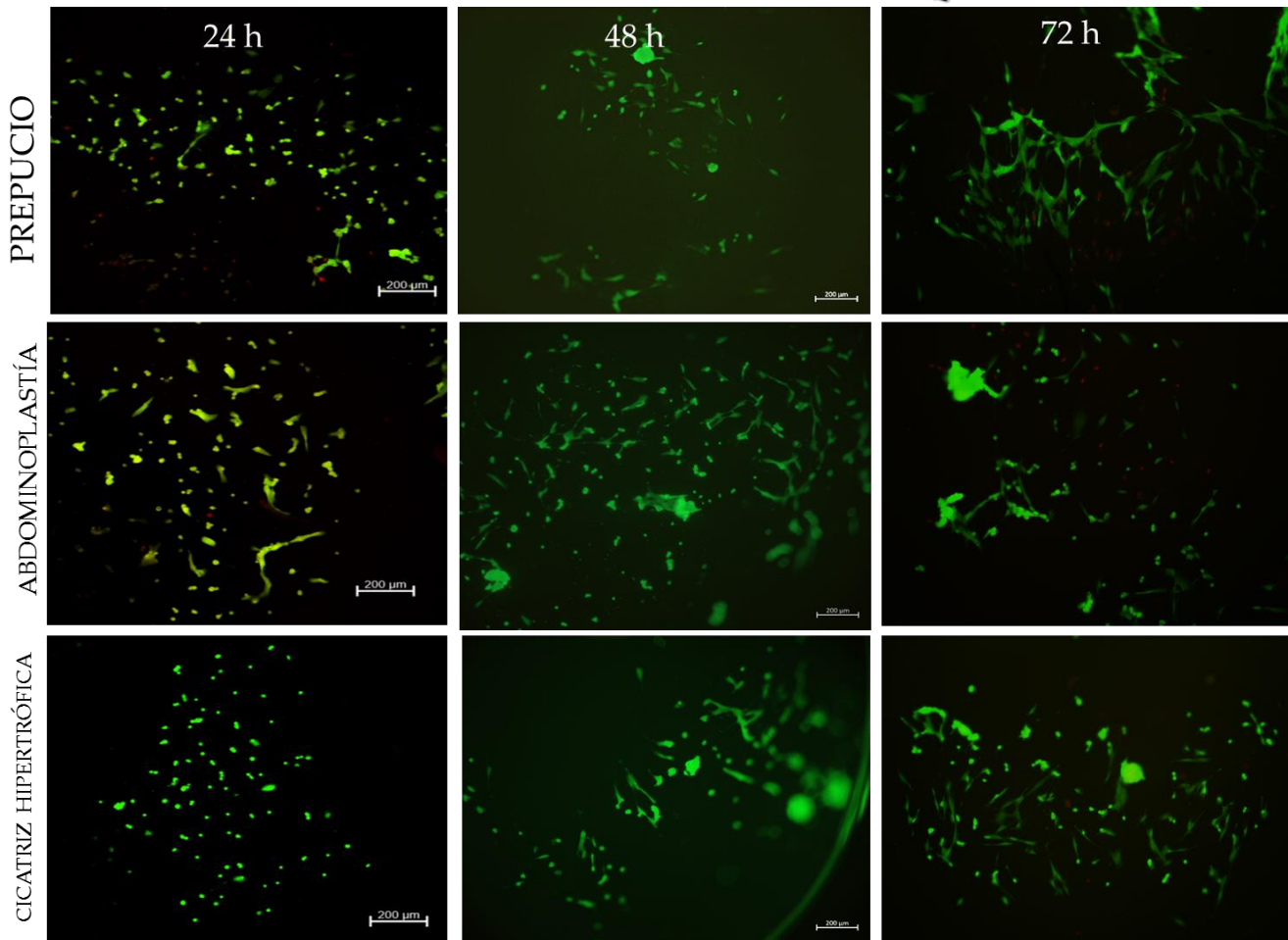


Figura 22. Imágenes obtenidas por microscopia con focal de la viabilidad de fibroblastos en andamios de CTS no poroso.

Un resultado relevante de estos ensayos se observa en las pruebas de cultivo en fibroblastos de cicatriz hipertrófica, ya que se presenta una diferencia importante entre la morfología de crecimiento de las células cultivadas en el andamio poroso respecto del liso; la morfología de las células en el andamio poroso permanecen de manera inactiva pues no se observan las prolongaciones características de la formación de colágena, lo que implica que en una lesión de una persona con éste tipo de cicatrización, sea posible llevar a cabo un proceso de reconstrucción normal con una cicatrización no excesiva, o inclusive una reconstrucción sin cicatriz. Mientras que en el andamio sin poros, los fibroblastos se observan con prolongaciones, lo cual indica que están en forma activa y por lo tanto produciendo fibras

de colágena, lo cual en una lesión pudiera llevar a una reconstrucción excesiva con cicatriz hipertrófica.

7.11. Biomateriales CTS/alcohol polivinílico (PVA)/colágeno (CG)/CCU

Se probó la viabilidad de la aplicación de metodología EIPS para la preparación de monolitos empleando diferentes mezclas de CTS con otros polímeros. Inicialmente, se probó con la combinación CTS/PVA. Como se observa en la Figura 23A, el material obtenido (CTSPVA8) es rígido y presenta un color amarillo-ámbar con una textura brillante. El análisis de las imágenes SEM muestran áreas tanto lisas como rugosas a X1000 (Figura 23B), el acercamiento a X10,000 y X30,000 (Figuras 23C y 23D, respectivamente), evidencia la presencia de poros con un diámetro promedio de 63.3 nm. El histograma obtenido del análisis del diámetro de los poros (Figura 23E), muestra diámetros entre los 25 y 125 nm, principalmente distribuidos entre los 50 y 75 nm.

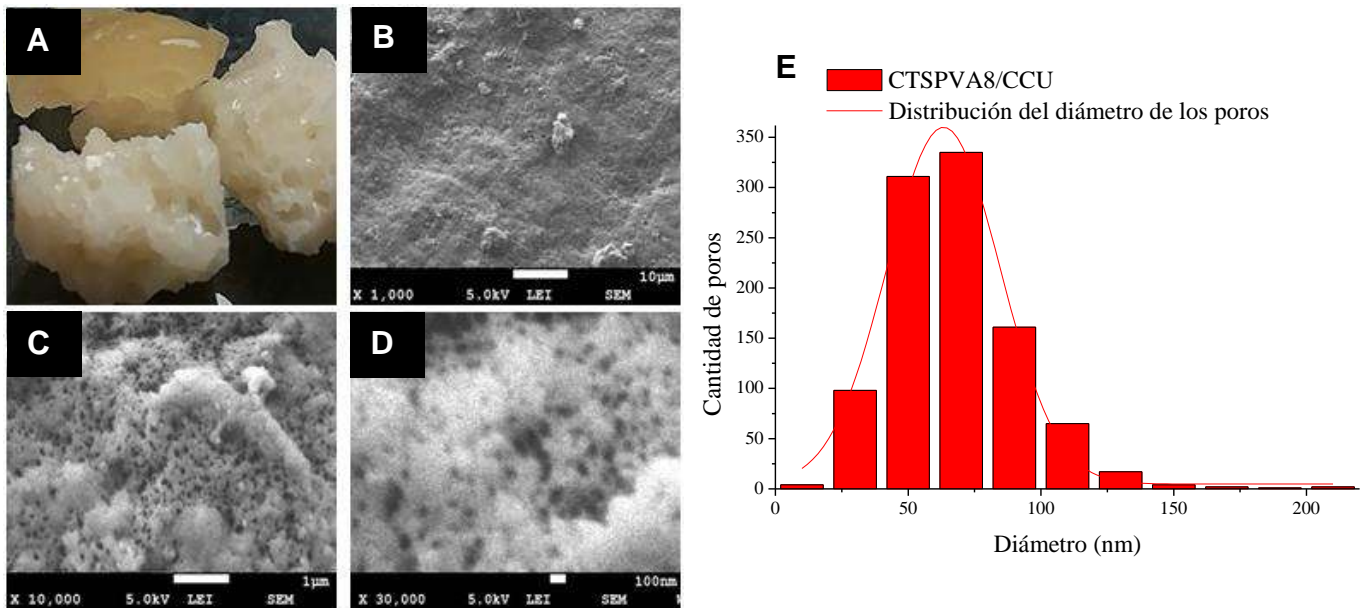


Figura 23. A) Fotografía del material CTSPVA8/CCU, e imágenes SEM a B) X1,000, C) X10,000 y D) X30,000. E) Histograma de la distribución de tamaño de poros.

Por su parte, el material obtenido a partir de la combinación CTSPVA2, presenta un color amarillo-ámbar, sin la textura brillante, comparado con el que contiene una mayor cantidad de

PVA (Figura 24A), y también es un material rígido. El análisis de las imágenes SEM a X1000 muestra áreas tanto lisas como rugosas (Figura 24B), el acercamiento a X10,000 y X30,000 (Figuras 24C y 24D, respectivamente), evidencia la presencia de poros distribuidos uniformemente, con un diámetro promedio de 65.7 nm. El histograma obtenido del análisis del tamaño de los poros (Figura 24E), muestra que la mayoría de ellos tienen diámetros entre 40 y 90 nm, principalmente distribuidos entre los 50 y 80 nm.

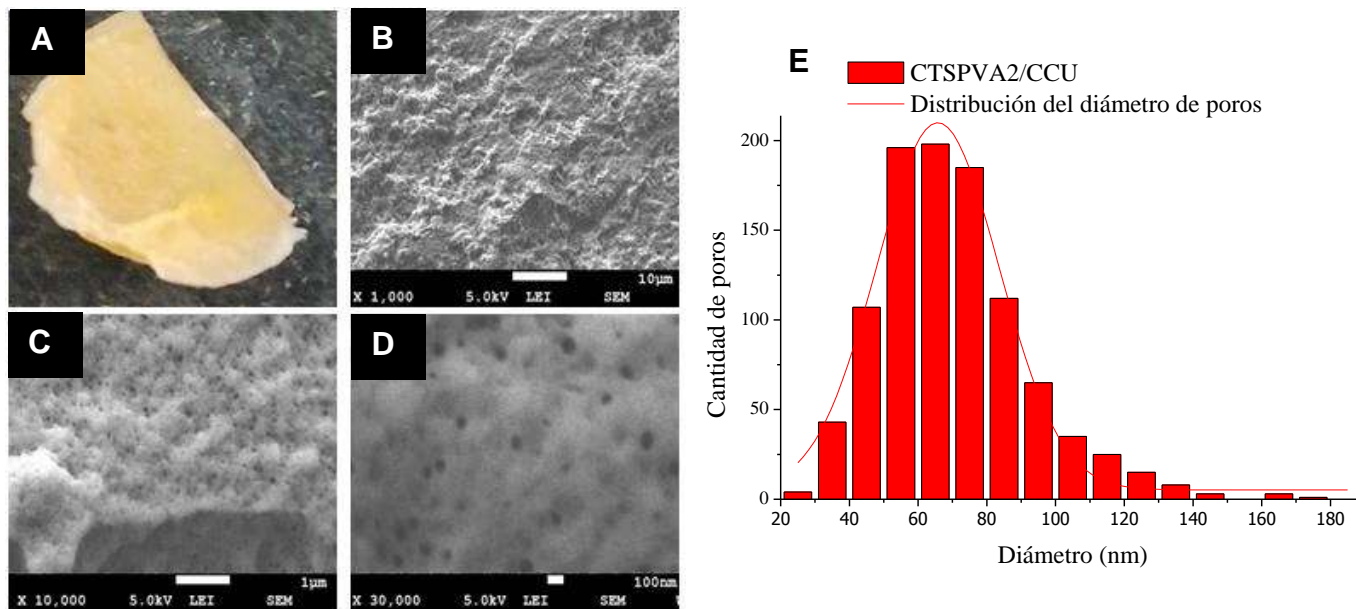


Figura 24. A) Fotografía del material CTSPVA2/CCU, e imágenes SEM a B) X1,000, C) X10,000 y D) X30,000. E) Histograma de distribución de tamaño de poros.

De acuerdo a estos resultados, la incorporación de PVA para la producción de materiales porosos por la metodología EIPS es inviable, ya que los poros que se obtienen son pequeños y en poca cantidad comparados con los obtenidos al usar CTS puro, además de que los materiales que se obtienen aparentemente presentan mayor dureza. Lo anterior puede atribuirse a que el DES empleado es un buen solvente para el PVA, por lo que al incorporar este polímero, el CCU no cumple la función de mal solvente o agente porógeno.

La Figura 25A muestra una fotografía del material obtenido de la combinación CTS-CG, con la incorporación de colágeno, el material es de color blanco con una textura rugosa, y ligeramente flexible. A X1,000 (Figura 25B) es posible observar la microestructura rugosa de

este material. El análisis de las imágenes SEM a X10,000 y X30,000 (Figuras 25C y Figura 25D, respectivamente), permite observar la presencia de una gran cantidad de poros, los cuales tienen diámetros entre 25 nm y 700 nm. El histograma muestra que la mayoría de los poros tienen diámetros entre los 50 nm y 200 nm, predominando los de diámetros entre 100 y 150 nm.

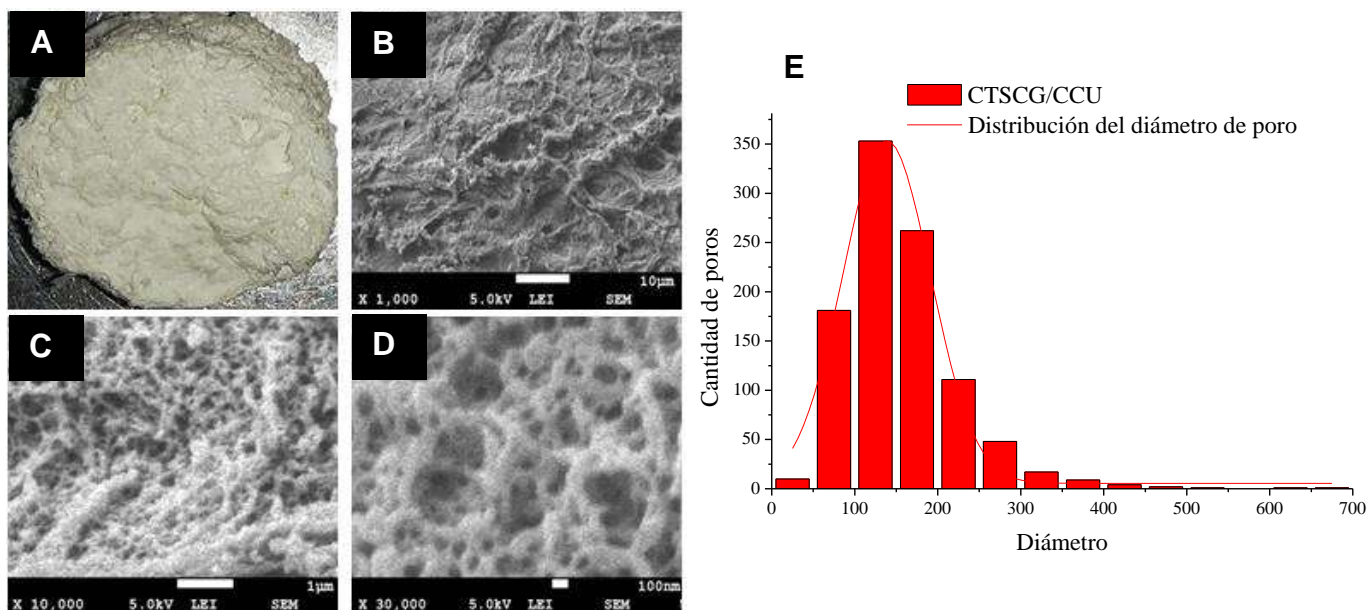


Figura 25. A) Fotografía del material CTSCG/CCU, e imágenes SEM a B) X1,000, C) X10,000 y D) X30,000. E) Histograma de distribución de tamaño de poros.

Estos resultados ponen de manifiesto la efectividad de la técnica para la producción de mezclas de CTS con otros polímeros insolubles en el DES cloruro de colina:urea (CCU), lo que permite abrir aún más el campo de aplicaciones de los materiales porosos producidos mediante ésta técnica.

7.12. Biomateriales CTSAgnP

Adicionalmente, se probó el efecto de cargar a las soluciones de CTS con diferentes especies activas que permiten potenciar sus propiedades. En este caso, se inició con la carga de AgnP a diferentes concentraciones, para la posterior ejecución de la metodología EIPS.

7.12.1. CTS-AgnP 0.1 %p/p

Como se observa en la Figura 26A, se logró obtener una película de CTS-AgnP 0.1 %p/p con una apariencia macroscópica similar a la observada en las películas porosas de CTS puro. El análisis SEM que se muestra en la Figura 26 destaca la diferencia estructural superficial en las dos caras de la película: en la Figura 26B se observa la cara de la película que queda expuesta al ambiente durante la evaporación de los solventes (durante el desarrollo de la segunda etapa del proceso de la metodología), esta cara es rugosa y presenta algunos poros. Por su parte, en la Figura 26B se observa la cara de la película que durante el proceso de preparación está en el fondo, es decir en contacto con la caja Petri, en este caso, se observa una superficie con una porosidad uniforme en toda la muestra.

La diferencia estructural superficial entre las dos caras de la muestra, puede ser provocada por la diferencia en el comportamiento de las moléculas en la solución durante el proceso de evaporación del solvente y el proceso de difusión. La cara menos porosa es la que queda expuesta al medio, y como en cualquier líquido, se forma una interface en la cual las moléculas tienen interacciones más fuertes que las presentes en seno del líquido, además, al estar en contacto directo con el exterior, en esta cara se precipita el polímero con mayor facilidad ya que está expuesta directamente al calor del horno de convección. En tal caso, la superficie se observa rugosa por el constante movimiento provocado por la evaporación de los solventes, y los poros observados en la Figura 26A son zonas que también facilitan la evaporación del solvente así como del exceso de no-disolvente (CCU).

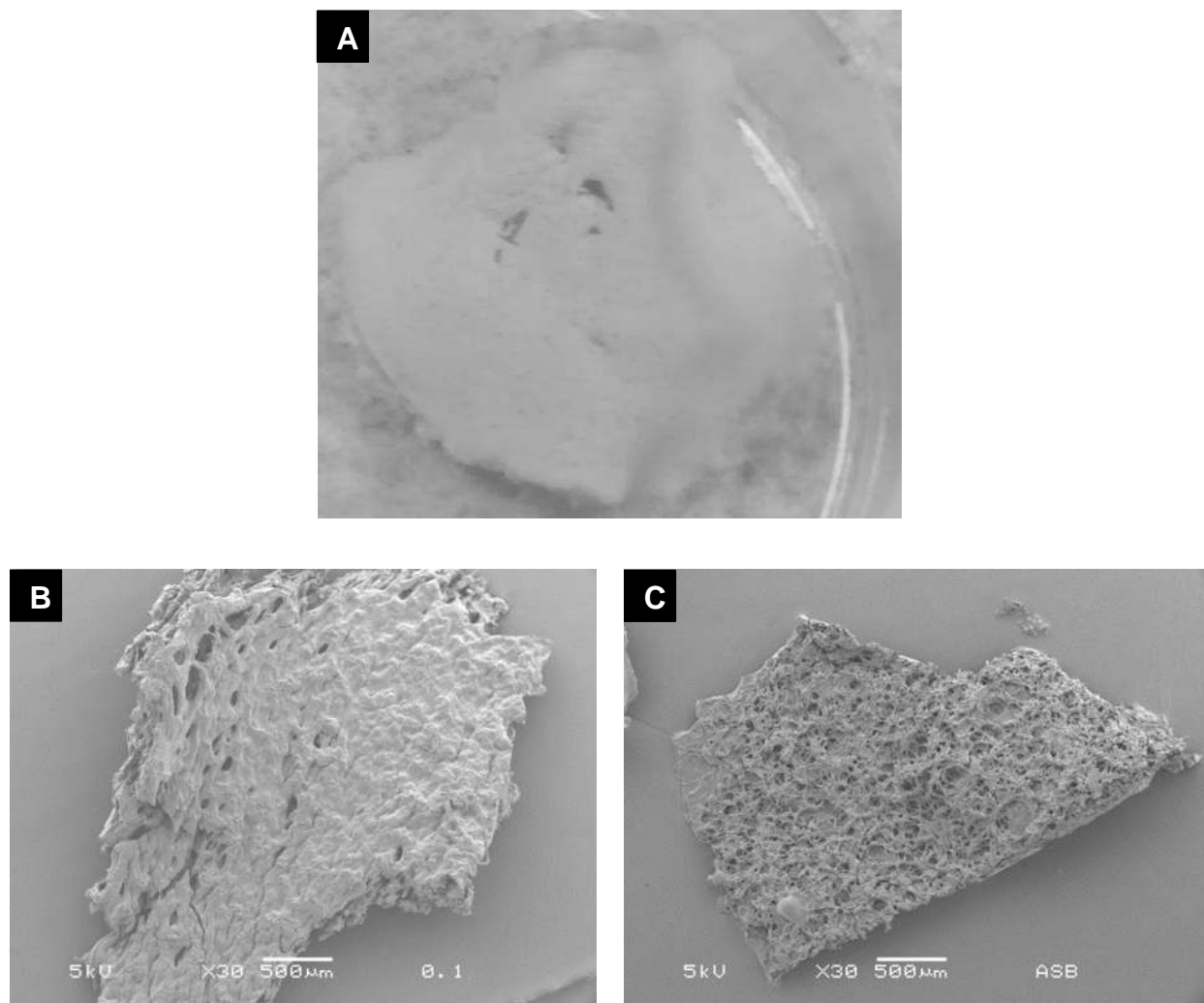


Figura 26. Fotografía de la película obtenida con la solución de CTS-AgnP 0.1 %p/p A). E imágenes SEM de la película CTS-nPsAg 0.1 %p/p. B) Cara con menor porosidad, la cual durante la preparación se encuentra expuesta al medio. C) Cara con mayor porosidad, esta cara es la que queda en contacto con la caja de Petri durante la metodología.

El análisis de la cara porosa de la película a un mayor aumento (Figura 27A), permite observar una red de poros con una matriz polimérica fibrosa, la cual es similar a la que se había observado con muestras de CTS puro, y el acercamiento a X1000 (Figura 27B) permite distinguir como se encuentran conectados los poros, lo cual para la aplicación deseada es de gran importancia.

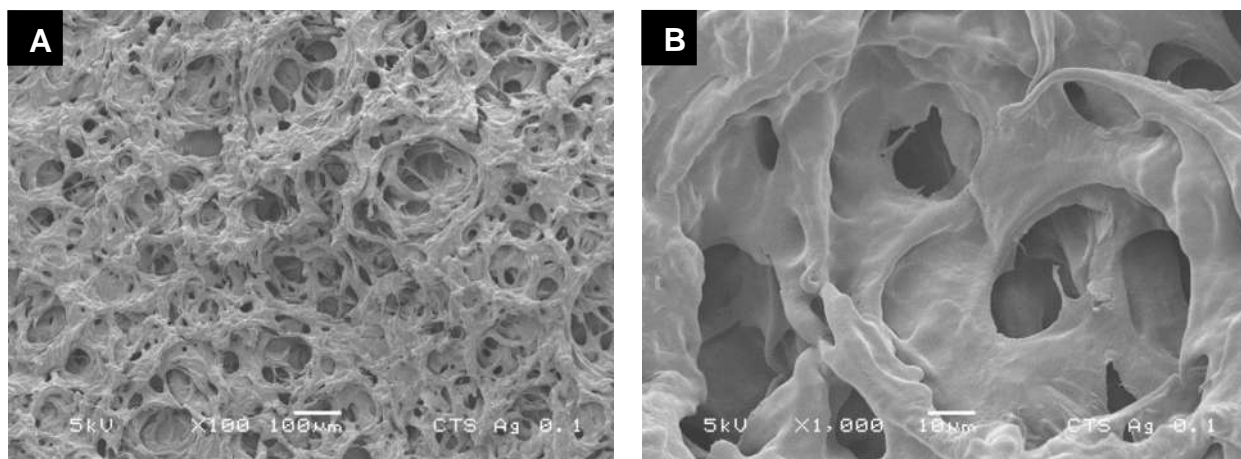


Figura 27. Imágenes SEM de la película CTS-nPsAg 0.1 %p/p. A) A X100, B) a X1000.

Con el análisis del tamaño de los poros que se muestra en el histograma de la Figura 28, se establece que por cada 1000 poros medidos, más de 750 tienen una apertura menor a 50 μm , siendo la moda promedio 25 μm , con un mínimo de 3.157 μm y el máximo medido de 568.224 μm . Este es un tamaño adecuado para que el material funcione como un andamio celular, donde las células tengan el espacio necesario para crecer y dividirse en un entorno tridimensional similar al de la matriz extracelular.

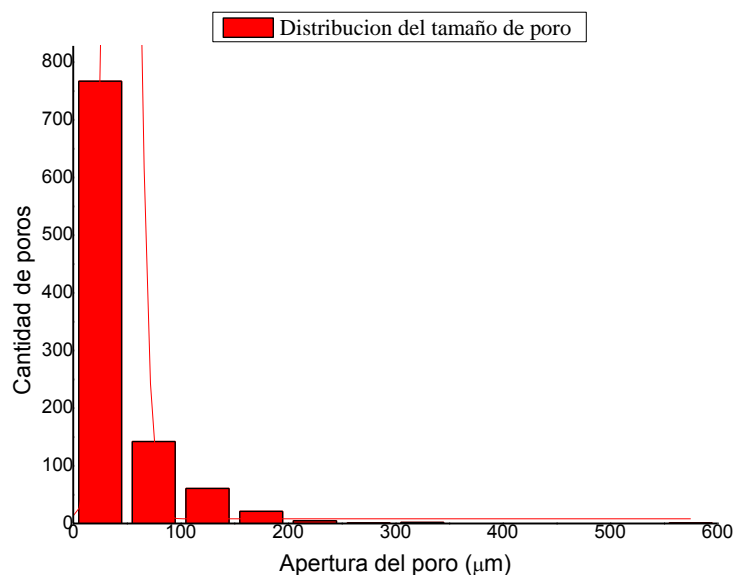


Figura 28. Diagrama de distribución del tamaño de poro de la película CTS-AgnP 0.1 %p/p.

En las imágenes SEM presentadas anteriormente, no es posible observar la presencia de las AgnP en la superficie del polímero. No obstante, el mapeo elemental de plata (Figura 29) permite evidenciar que este elemento se encuentra uniformemente distribuido en la muestra, por lo que se puede concluir que las nanopartículas se encuentran embebidas en la matriz polimérica. Esto es importante, ya que el objetivo de incorporar AgnP es que funcionen como agente antimicrobiano, y al estar inmersas en la matriz polimérica, las nanopartículas podrán ser liberadas de forma gradual al medio, funcionando como un sistema de liberación continua, lo cual terminaría al degradarse por completo el andamio, esto podría ayudar además a evitar que pudiese surgir un efecto tóxico por las AgnP, ya que al ser liberadas lentamente pueden ser eliminadas con mayor facilidad del sistema.

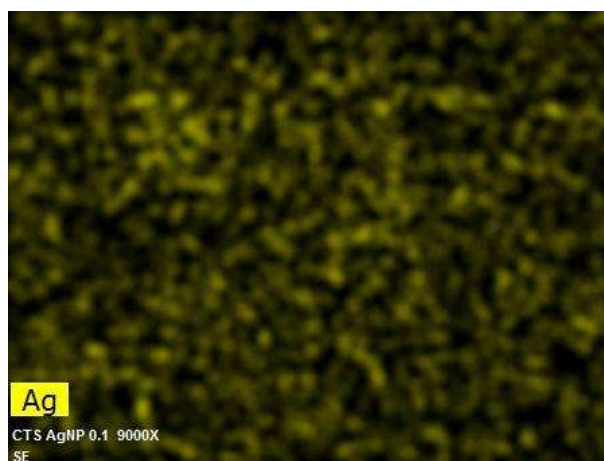


Figura 29. Mapeo elemental de Ag durante el análisis SEM en una muestra de la película de CTS-AgnPs 0.1 %p/p.

7.12.2. CTS-AgnPs 0.05 %p/p

Al igual que con la solución de CTS-AgnP 0.1 %p/p, fue posible obtener una película de CTS-AgnP 0.05 %p/p con características morfológicas similares a las películas porosas de CTS puro obtenidas con la metodología EIPS (Figura 30A).

La microestructura de la película obtenida confirma que se obtiene una estructura porosa y uniforme (Figura 30B), y empleando un mayor aumento (Figura 30C) se observa una matriz

polimérica fibrosa con gran porosidad. A un aumento aun mayor (Figura 31D), se evidencia la presencia de porosidad interconectada, tal y como ocurre en las muestras de CTS puro.

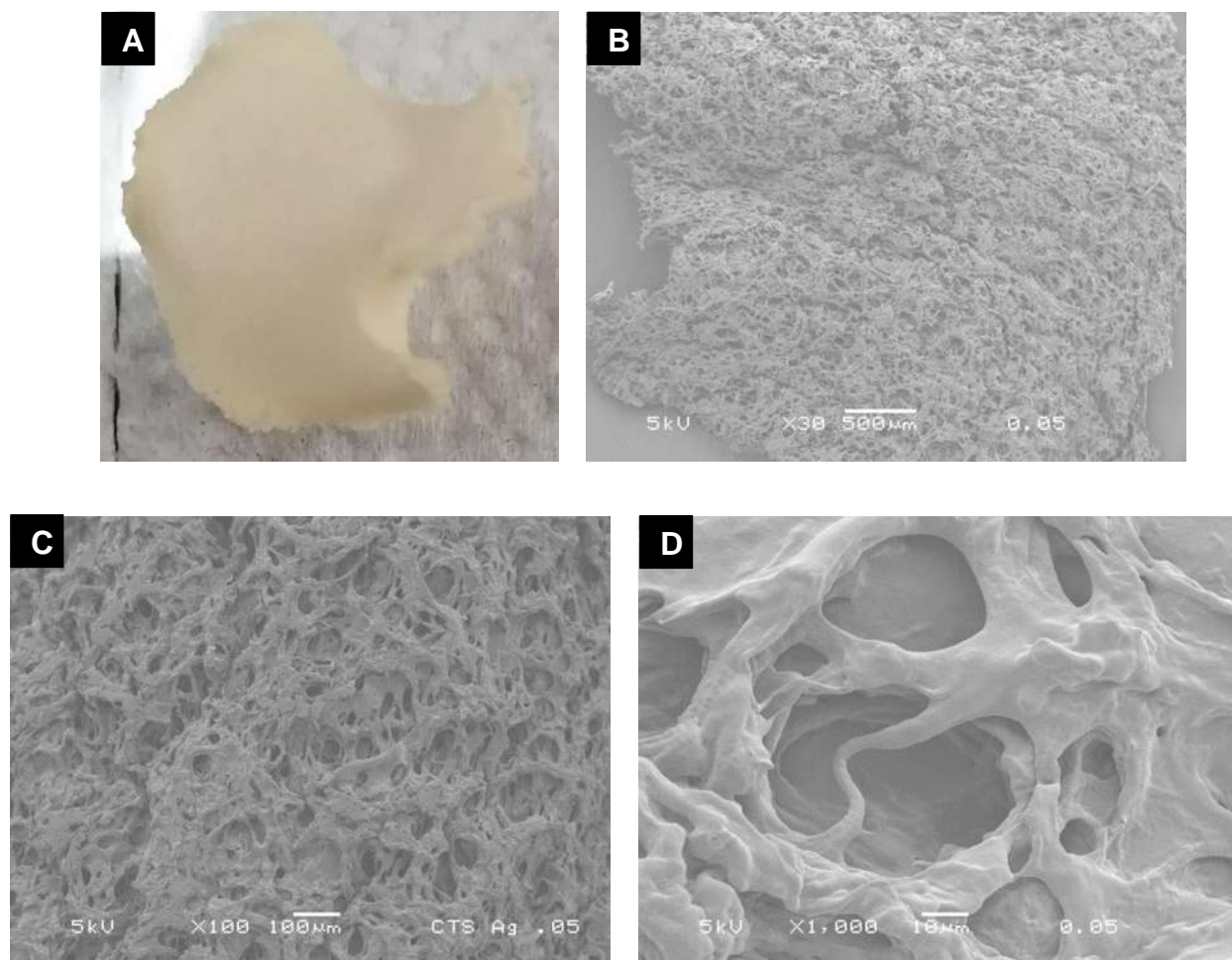


Figura 30. A) Fotografía de la película obtenida con la solución de CTS-nPsAg 0.05 %p/p. Imágenes SEM de la película CTS-nPsAg 0.05 %p/p a B) X30, C) X100 y D) X1000.

El análisis del tamaño de los poros que se muestra en el histograma de la Figura 31, permite establecer, que por cada 1000 poros medidos, más de 500 tienen una apertura menor a 50 μm , siendo la moda promedio 10 μm , con un mínimo de 4.123 μm y el máximo medido de 286.84 μm . Por lo cual, es un material candidato para su uso como un andamio al igual que la película con 0.1 %p/p de AgnP.

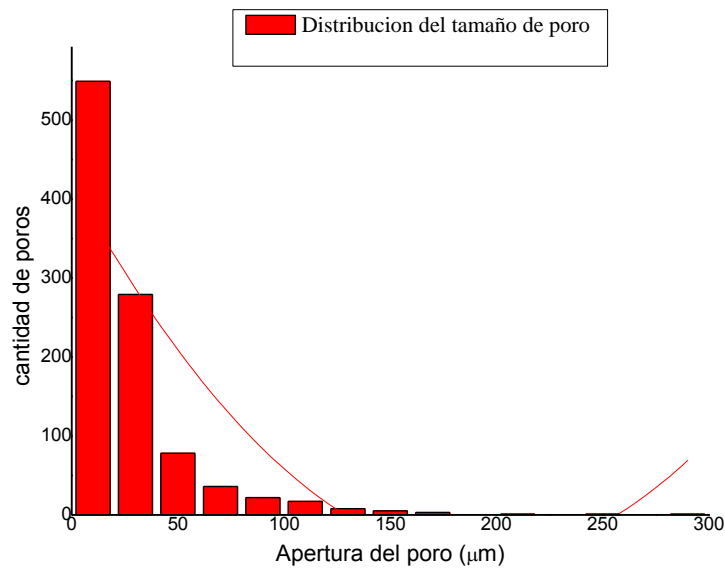


Figura 31 Histograma de distribución del tamaño de poro de la película CTS-AgnP 0.05 %p/p.

Para el análisis de estos andamios celulares para el crecimiento de fibroblastos, se requiere de la producción de estas películas porosas en mayor cantidad (hasta el momento la producción de películas se ha llevado a cabo en lotes de 3 películas), por lo que es necesario aplicar esta metodología a la producción de lotes de 20 a 25 películas, de lo cual, al momento solo se ha logrado obtener un lote de 15 películas con un 0.05 %p/p de AgnP.

7.13. Biomateriales CTS-Cu

7.13.1. Biomateriales CTSCuSO₄, monolitos y películas

La disolución de CTS se cargó con una sal de cobre para posteriormente aplicar la técnica EIPS para la preparación de un monolito poroso. Como se observa en la Figura 32A, se obtuvo un monolito de color azul-verde, y en su análisis por SEM (sin metalizar) es posible observar la estructura altamente porosa del material, con poros con un diámetro promedio de 3.8 µm, con un mínimo de 0.3 µm y un máximo de 17 µm (Figura 32D). El análisis elemental revela la presencia del cobre distribuido uniformemente a lo largo y ancho del material (Figura 32C).

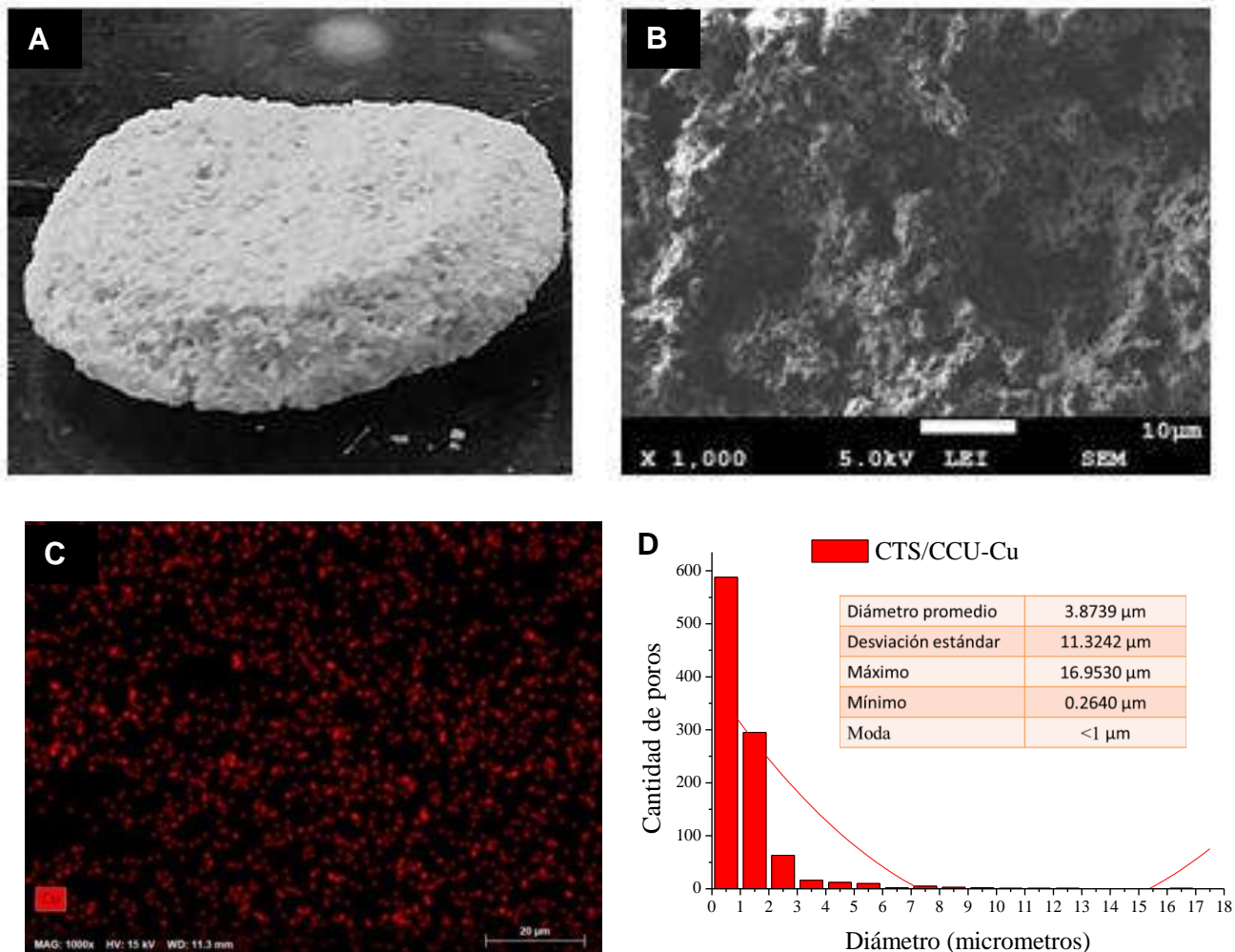


Figura 32. A) Fotografía del material CTS/CuSO₄, B) imagen SEM a X1000, C) mapeo elemental de Cu e D) histograma de distribución de tamaño de diámetro.

El proceso también se realizó para la obtención de películas porosas (CTSCuSO₄) empleando diferentes concentraciones de la sal de cobre. Obteniendo resultados favorables con la mezcla CTSCuSO₄ con un 2.5% p/p de la sal. Se observó que la presencia de la sal en la disolución disminuye su viscosidad, por lo que se realizaron algunas modificaciones específicas en el proceso con respecto al método utilizado anteriormente en la obtención de películas porosas de CTS puro.

Se empleó la mezcla de la solución CTSCuSO₄ con el DES en proporción volumétrica 1:1 como se había realizado anteriormente, sin embargo, la adición del DES se realizó más lentamente que al usar el CTS puro con temperatura controlada entre 0 y 2 °C, esto para

aumentar la viscosidad de la solución CTSCuSO_4 . En la Figura 33 se puede observar una muestra de los materiales obtenidos, en la cual se aprecia una diferencia en ambas caras del material; en la Figura 33A se aprecia que la superficie presenta zonas brillosas que se asocian a un área menos porosa, lo cual es común en la cara que no está en contacto con la caja de Petri, mientras que la otra cara del material se observa más opaca e irregular lo cual es indicativo de la presencia de porosidad.

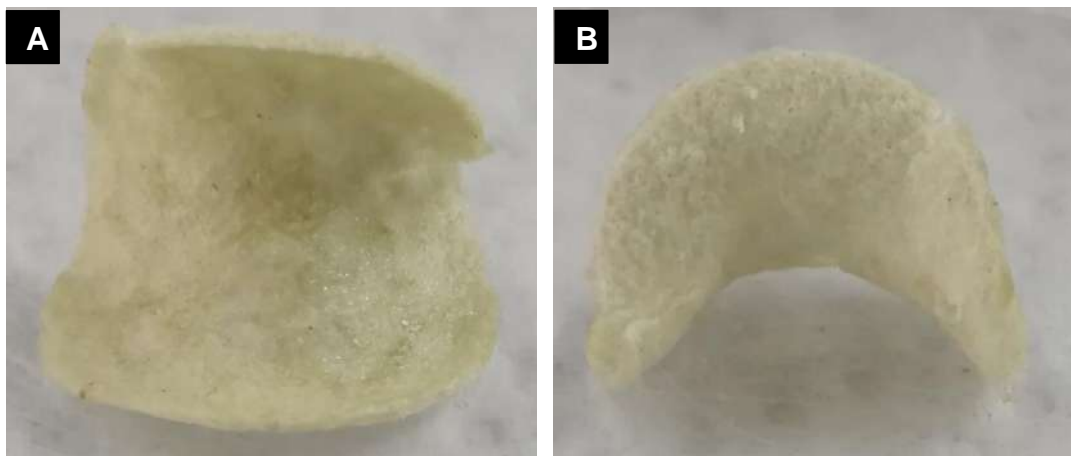


Figura 33. Fotografías de una película obtenida de la combinación CTSCuSO_4 . A) Cara lisa del material, y B) Cara porosa de la película.

7.13.2. Biomateriales $\text{CTSMCsCu}_2\text{O}$, películas

También se exploró la posibilidad obtener biomateriales de CTS en forma de películas porosas cargados con microcristales de óxido de cobre ($\text{CTSMCsCu}_2\text{O}$), obtenidos mediante la metodología previamente reportada por el grupo de trabajo (Reyes-Mercado et al., 2021), para lo cual se realizaron diferentes pruebas con las concentraciones ya mencionadas en la metodología (ver apartado 6.2.5). La obtención favorable de una película de $\text{CTSMCsCu}_2\text{O}$ se logró empleando una concentración de 5% de MCsCu_2O . Lamentablemente, como se puede observar en la Figura 35, la película resulta muy frágil, por lo que no es posible obtenerla en una sola pieza. La ventaja es que presenta la formación de una gran cantidad de poros, tal como es posible observar en la Figura 34.

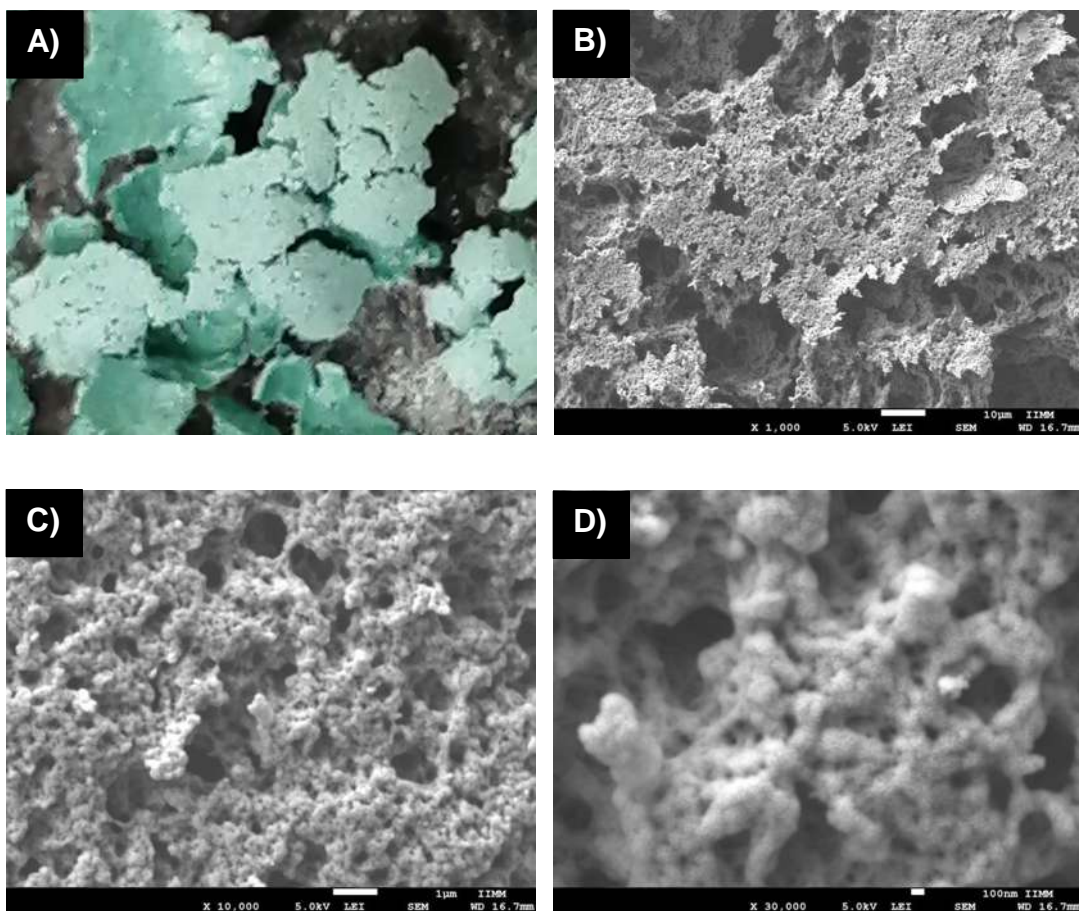


Figura 34. A) Fotografía de una película obtenida de la combinación CTS-MCsCu₂O en un 5%, B) imagen SEM a X1000, C) X10000 y D) X30000 de la película obtenida.

A partir de este resultado, se decidió disminuir la concentración de MCsCu₂O a 2.5 % p/p, así como el uso de un sistema abierto con control de temperatura entre 0 y 2 °C, con una adición lenta del DES a la disolución CTS MCsCu₂O. Como resultado se obtuvieron películas completas como las observadas en la Figura 35. Al igual que en muestras anteriores, se pueden observar diferencias en las dos caras de las películas obtenidas, presentando una cara más lisa, la cual corresponde a la cara expuesta al ambiente durante la evaporación, y una cara más porosa que corresponde a la cara que se encuentra en contacto con la caja de Petri durante la metodología.

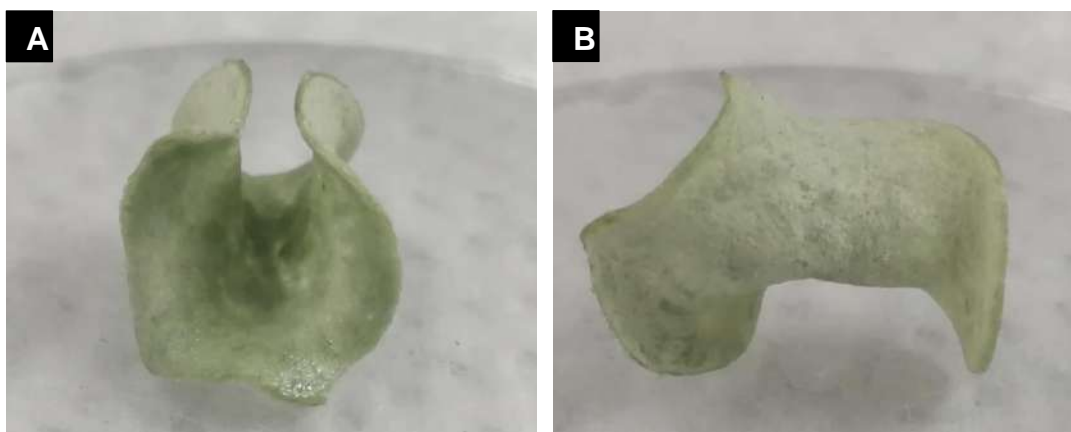


Figura 35. Fotografías de una película obtenida de la combinación CTSMCsCu₂O con un 2.5% p/o. A) Cara lisa y B) cara porosa de la película.

7.14. Análisis de la capacidad catalítica

Se realizó la evaluación catalítica del material CTS-CuSO₄ en forma de monolito de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 2.15. A partir de estos ensayos, se logró la obtención del producto con un rendimiento del 82%, el cual resulta bajo en comparación con el 91% de rendimiento obtenido al realizar la reacción usando hojuelas de CTS recubiertas de CuSO₄. El menor rendimiento al utilizar el monolito de CTS-CuSO₄, puede ser atribuido a que en la metodología no se incluye ningún tipo de disolvente, provocando que, por la forma del material, no todo el sustrato este en contacto con el catalizador, mientras que con las hojuelas se tiene una mejor distribución del catalizador en el matraz de reacción y por lo tanto una mejor interacción entre el sustrato y el catalizador. Esto implica que de seguir usando el monolito de CTS-CuSO₄ se tendría que replantear la metodología para mejorar la interacción entre el sustrato y el catalizador. Realizando un comparativo entre los catalizadores usados, las hojuelas de CTS con CuSO₄ resultan más fáciles de obtener y de manejar, además de que ofrecen mejores rendimientos, la desventaja se presenta al recuperar el catalizador debido a que parte se pierde al momento de filtrar ya que parte de las hojuelas pueden quedar atrapadas en el filtro. En el caso del monolito de CTS-CuSO₄ su preparación conlleva más pasos y su manejo se dificulta debido a que hay que cortarlo para obtener la cantidad necesaria a utilizar en la reacción, y el rendimiento final es menor. Aun así, presenta una

ventaja importante, y es que el catalizador puede retirarse fácilmente utilizando unas pinzas, lo que minimiza la pérdida del catalizador.

7.15. Biomateriales CTS-Fe

Se analizó la capacidad de las películas porosas de CTS puro para interactuar con especies de hierro (FeCl_2 , FeCl_3) y la preparación de óxidos de hierro con propiedades magnéticas a partir de las sales de hierro ancladas a la película de CTS. Esta metodología, denominada co-precipitación, ha sido explorada anteriormente (Vallejo-Macías et al., 2020). Usando monolitos de poliácridamida como soportes en la preparación de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En este caso, la experimentación comenzó realizando la misma metodología reportada por el grupo de Vallejo y Col. y fue modificada para obtener los mejores resultados posibles con las películas porosas de CTS tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 condiciones iniciales y finales en la preparación de biomateriales CTS-Fe.

Condiciones iniciales (similares a las reportadas por Vallejo y col.)	Condiciones finales
Se sumergieron las películas de CTS en una solución de FeCl_2 y FeCl_3 ($\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}=2:1$) por 12 h	Se agregan 3 gotas de la solución de FeCl_2 y FeCl_3 a cada una de las películas de CTS puro ($\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}=2:1$)
Se realizaron tres ciclos de lavado con agua destilada	Secado a 60 °C de las películas de CTS + cloruros de hierro.
Las películas de CTS + cloruros de hierro se sumergieron en una solución 6M de NaOH a 100 °C durante 2 h	Las películas de CTS + cloruros de hierro se sumergieron en una solución 6M de NaOH a 100 °C por 5 min
Se realizaron los ciclos de lavado necesarios con agua destilada hasta tener un pH de 7	Se realizaron los ciclos de la vado necesarios con agua destilada hasta tener un pH de 7

En la Figura 36 es posible observar la diferencia en el resultado de la metodología usada en un principio (Figura 36A) y el resultado tras realizar las modificaciones que se indican en la tabla 3 (Figura 36B). La Figura 36A muestra que la película no presenta la coloración oscura esperada, esto debido a que durante los lavados se pierde una gran cantidad de las sales de hierro, provocando que al final la concentración sea mínima y no suficiente para reaccionar y convertirse en el óxido de hierro. En la Figura 36B, se puede ver claramente que la reacción

procede de manera adecuada, obteniendo la coloración oscura esperada para los óxidos de hierro formados durante la reacción con el NaOH. Finalmente, en la Figura 36C es posible observar que como resultado de la reacción se obtiene una especie magnética de hierro, lo cual es evidente al acercarlo a un imán.

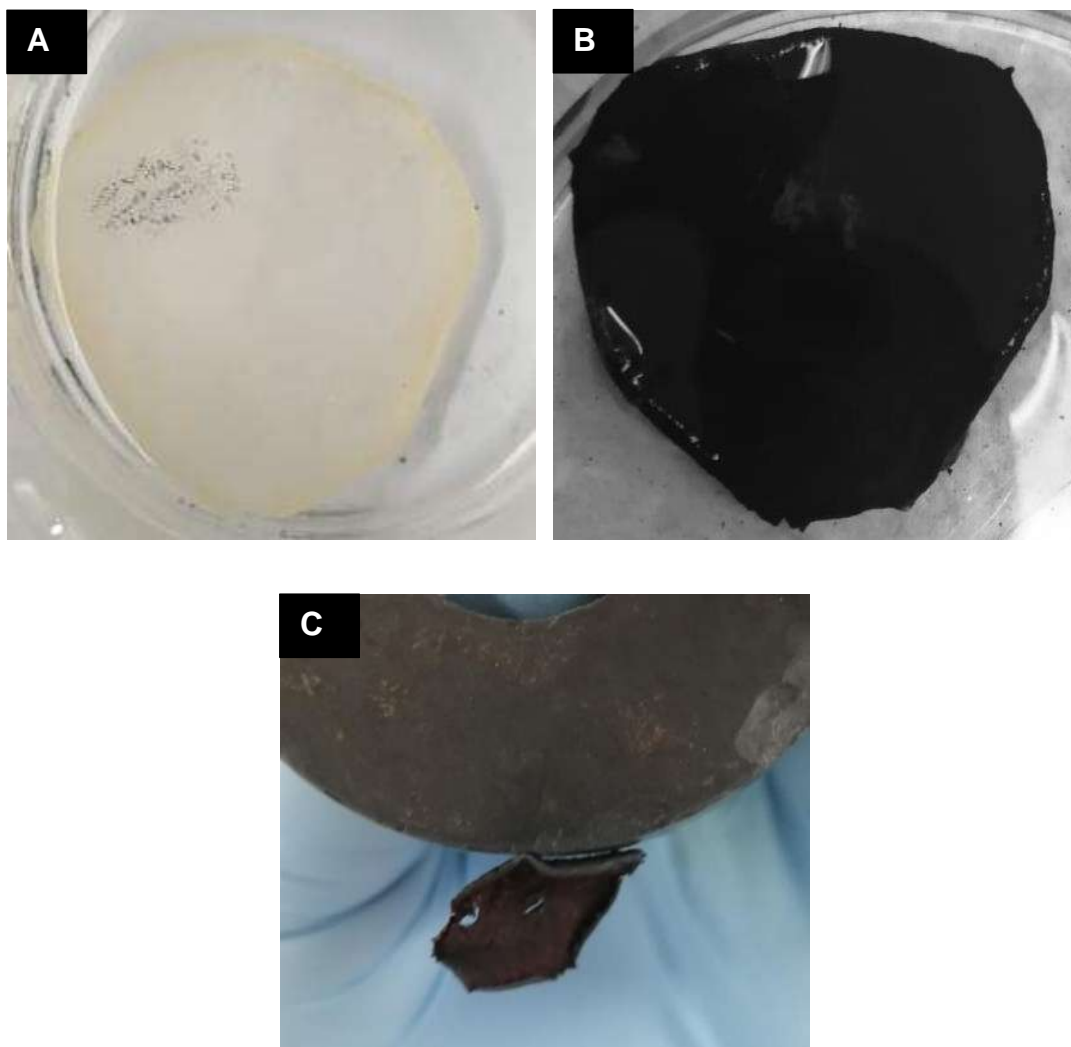


Figura 36. A) Fotografía del resultado final al realizar las condiciones iniciales de coprecipitación de la Tabla 3, B) Película obtenida al aplicar las modificaciones en la metodología de co-precipitación indicada en la Tabla 3, y C) Fotografía de la película CTS-Fe unida magnéticamente a un imán.

El análisis SEM de una de las películas obtenidas, muestra que se tienen dos caras diferentes en el material, una con apariencia rugosa y muy poca porosidad (Figura 37A), y una cara más porosa (Figura 37B). En un acercamiento a X5000 es posible observar poros de

gran tamaño y algunas estructuras de tamaños mayores a una micra que posiblemente son cristales de los óxidos de hierro obtenidos (Figura 37C). Debido a que en esta muestra no se realizó un metalizado previo a su observación por SEM, no es posible analizar estas estructuras cristalinas a mayor aumento ya que se pierde nitidez al realizar los acercamientos. Finalmente, en el análisis elemental de la muestra (Figura 37D) se puede observar que el hierro se encuentra homogéneamente distribuido y no solo en las zonas donde se pueden apreciar las estructuras cristalinas, esto puede ser debido a que el compuesto metálico este embebido en la matriz polimérica y no solamente en su superficie. Esto último representa una ventaja sobre otros materiales que solamente presentan un recubrimiento superficial de la especie metálica, ya que aun cuando la capa superficial del material con los cristales de hierro se vean desgastados, aún se tendrá una buena cantidad del metal dentro del material, el cual conservaría sus propiedades magnéticas.

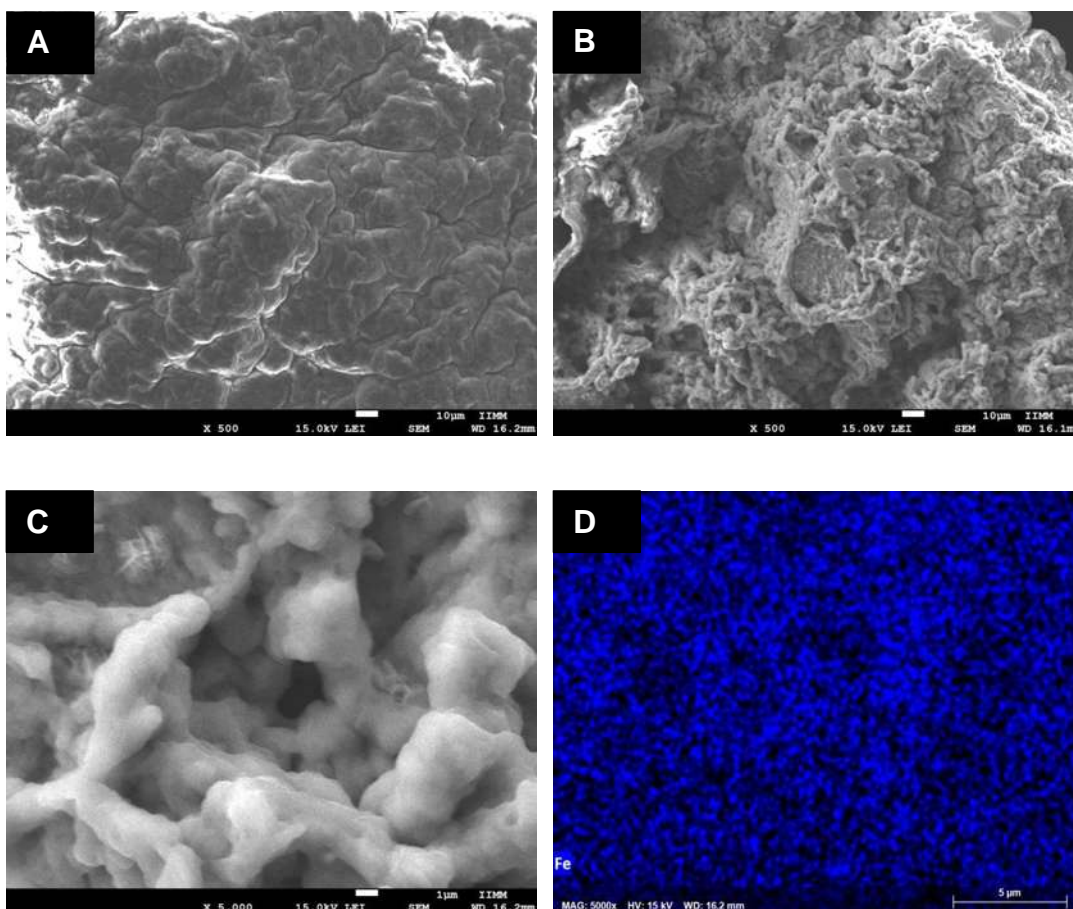


Figura 37. A) Imagen SEM a X500 de la cara más lisa de una película CTS-Fe, Imagen de la cara porosa de una película de CTS-Fe a B) X500, y C) X5000. D) Mapeo elemental de hierro de una película de CTS-Fe.

Las películas de CTS-Fe obtenidas son materiales con gran potencial para ser usadas en la absorción de colorantes, además de su posible uso en catálisis.

Conclusiones

Se ha logrado establecer una nueva metodología para la obtención de materiales porosos de quitosano, la cual resulta ser de gran relevancia por el uso de un DES como medio adyuvante para la generación de porosidad, con la gran ventaja de que puede ser reutilizado en el proceso. Esto brinda un sistema simple de implementar, amigable con el medio ambiente y más económico que los métodos comúnmente utilizados. Otro punto importante de esta nueva metodología es su versatilidad, ya que puede ser utilizada para la generación de muestras porosas bi-componentes de biopolímeros en forma de monolitos y películas delgadas.

La metodología permite además de procesar CTS puro, el uso de otros biopolímeros como el colágeno, además de la posibilidad de incorporar sales de cobre, y nanopartículas de plata y de óxido de hierro durante la preparación de los materiales.

Los materiales que se han logrado sintetizar pueden ser destinados a diferentes aplicaciones, como ingeniería de tejidos, para el caso de CTS puro o en mezcla con otros biopolímeros o incluso con nanopartículas de plata. En este caso las películas preparadas fueron probadas en el cultivo de fibroblastos con resultados alentadores para continuar con la investigación.

Resulta de gran importancia los resultados obtenidos con *V. cholerae*, con los cuales se pudo observar que la estructura porosa de CTS puro resulta más efectiva que una estructura lisa en la inhibición del crecimiento de colonias de esta bacteria.

Otra de las aplicaciones es su uso como soporte catalítico, como es el caso al incorporar especies de cobre, donde se logró probar de manera exitosa un material de CTS cargado con sulfato de cobre en la preparación de bis indolil metanos, obteniendo buenos rendimientos, y con la practicidad de poder recuperar fácilmente el catalizador al terminar la reacción.

Además de las aplicaciones anteriores podría ser posible su uso en la absorción de colorantes, ya sea usando el CTS puro o incorporando hierro a los materiales previamente formados, resultando particularmente importante la metodología utilizada en la preparación de

los materiales con óxidos de hierro, la cual no había sido realizada previamente con materiales de CTS.

8. Referencias

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures Electronic supplementary information (ESI) available: spectroscopic data. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b2/b210714g/>. *Chemical Communications*, 1, 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>
- Ahmed, S., Annu, Ali, A., Sheikh, J., & Ali, A. (2018). A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116(2017), 849–862. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.176>
- Ali, A., & Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 273–286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
- Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. S. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1072–1083. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>
- Balagangadharan, K., Dhivya, S., & Selvamurugan, N. (2016). Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.046>
- Bangde, P. S., Jain, R., & Dandekar, P. (2016). Alternative Approach to Synthesize Methylated Chitosan Using Deep Eutectic Solvents, Biocatalyst and “Green” Methylating Agents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(6), 3552–3557. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00653>
- Bellich, B., D’Agostino, I., Semeraro, S., Gamini, A., & Cesàro, A. (2016). “The Good, the Bad and the Ugly” of Chitosans. In *Marine Drugs* (Vol. 14, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/md14050099>
- Biswal, T. (2021). Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Materials Today: Proceedings*, 41(xxxx), 397–402.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.628>

- Cavallaro, G., Micciulla, S., Chiappisi, L., & Lazzara, G. (2021). Chitosan-based smart hybrid materials: a physico-chemical perspective. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(3), 594–611. <https://doi.org/10.1039/D0TB01865A>
- Chen, N., Zhang, Y. Y. Y. Y., Zhao, W., Chen, J., & Zhang, Y. Y. Y. Y. (2018). Preparation of monolithic fibers with deep eutectic solvent for solid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in lake water. *Se pu = Chinese journal of chromatography*, 36(1), 5–11. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1123.2017.10003>
- Cheung, R. C., Ng, T. B., Wong, J. H., Chan, W. Y., Chi, R., Cheung, F., Ng, T. B., Wong, J. H., Chan, W. Y., Cheung, R. C., Ng, T. B., Wong, J. H., & Chan, W. Y. (2015). Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/md13085156>
- Chun, H. J., Kim, G.-W., & Kim, C.-H. (2008). Fabrication of porous chitosan scaffold in order to improve biocompatibility. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69(5), 1573–1576. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpics.2007.10.104>
- Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M. G., Franzoso, F., Tabasso, S., & Magnacca, G. (2015). Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.006>
- Delgado-Mellado, N., Larriba, M., Navarro, P., Rigual, V., Ayuso, M., García, J., & Rodríguez, F. (2018). Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis. *Journal of Molecular Liquids*, 260, 37–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.076>
- Delgado-Rangel, L. H., Huerta-Saquero, A., Eufrazio-García, N., Meza-Villezcás, A., Mota-Morales, J. D., & González-Campos, J. B. (2020). Deep eutectic solvent-assisted phase separation in chitosan solutions for the production of 3D monoliths and films with tailored porosities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4084–4094. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.254>

- Deng, L., Qi, H., Yao, C., Feng, M., & Dong, A. (2007). Investigation on the properties of methoxy poly(ethylene glycol)/chitosan graft co-polymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(12), 1575–1589. <https://doi.org/10.1163/156856207794761943>
- Desbrières, J., Guibal, E., Adour, P., Desbrières, J., & Guibal, E. (2018). Chitosan for wastewater treatment. *Polymer International*, 67(1), 7–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pi.5464>
- Di Martino, A., Sittinger, M., Risbud, M. V., Di, A., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5983–5990. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.016>
- Dutta, R. C., & Dutta, A. K. (2018). 3D Cell Culture. In *3D Cell Culture*. Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/b22417>
- El Kadib, A., & El Kadib, A. (2015). Chitosan as a Sustainable Organocatalyst: A Concise Overview. *ChemSusChem*, 8(2), 217–244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cssc.201402718>
- Ferreira, V. R. A., Azenha, M. A., Pinto, A. C., Santos, P. R. M., Pereira, C. M., & Silva, A. F. (2019). Development of mesoporous polysaccharide / sol-gel composites with two different templating agents: Surfactants and choline chloride-based deep eutectic solvents. 13(3), 261–275.
- George, A., Sanjay, M. R., Srisuk, R., Parameswaranpillai, J., & Siengchin, S. (2020). A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 329–338. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120>
- González-López, M. E., Pérez-Fonseca, A. A., Arellano, M., Gómez, C., & Robledo-Ortíz, J. R. (2020). Fixed-bed adsorption of Cr(VI) onto chitosan supported on highly porous composites. *Environmental Technology & Innovation*, 19, 100824. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100824>
- Guibal, E. (2005). Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. *Progress in Polymer Science*, 30(1), 71–109.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.12.001>

- Hassan, M. A., Omer, A. M., Abbas, E., Baset, W. M. A., & Tamer, T. M. (2018). Preparation, physicochemical characterization and antimicrobial activities of novel two phenolic chitosan Schiff base derivatives. *Scientific Reports*, 8(1), 11416. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29650-w>
- Heydaripour, J., Gazi, M., Oladipo, A. A., & Gulcan, H. O. (2019). Porous magnetic resin-g-chitosan beads for adsorptive removal of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.168>
- Hong, Y., Gao, C., Shi, Y., & Shen, J. (2005). Preparation of porous polylactide microspheres by emulsion-solvent evaporation based on solution induced phase separation. *Polymers for Advanced Technologies*, 16(8), 622–627. <https://doi.org/10.1002/pat.629>
- Hou, Y. Te, & Hsu, C. C. (2020). Development of a 3D porous chitosan/gelatin liver scaffold for a bioartificial liver device. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(6), 741–748. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.12.012>
- Ikeda, T., Ikeda, K., Yamamoto, K., Ishizaki, H., Yoshizawa, Y., Yanagiguchi, K., Yamada, S., & Hayashi, Y. (2014). *Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold*. 2014(Dd).
- Islam, M. M. M., Shahrzaman, M., Biswas, S., Nurus Sakib, M., Rashid, T. U., Sakib, N., & Ur, T. (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*, 5(1), 164–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
- Jang, J., & Jia, P. (2020). A Review of the Application of Biopolymers on Geotechnical Engineering and the Strengthening Mechanisms between Typical Biopolymers and Soils. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2020, 1465709. <https://doi.org/10.1155/2020/1465709>
- Ke, C., Deng, F.-S., Chuang, C.-Y., & Lin, C. (2021). Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. *Polymers*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/polym13060904>
- Kim, S. E., Cho, Y. W., Kang, E. J., Kwon, I. C., Lee, E. B., Kim, J. H., Chung, H., & Jeong, S.

- Y. (2001). *Three-Dimensional Porous Collagen / Chitosan Complex Sponge for Tissue Engineering*. 2(2), 64–70.
- Kou, S. (Gabriel), Peters, L. M., & Mucalo, M. R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 85–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1–27.
- Le, M.-C. N., Xu, K., Wang, Z., Beverung, S., Steward, R. L., & Florczyk, S. J. (2021). Evaluation of the effect of 3D porous Chitosan-alginate scaffold stiffness on breast cancer proliferation and migration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(10), 1990–2000. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.37191>
- Lee, M., Chen, B.-Y., & Den, W. (2015). Chitosan as a Natural Polymer for Heterogeneous Catalysts Support: A Short Review on Its Applications. *Applied Sciences*, 5(4), 1272–1283. <https://doi.org/10.3390/app5041272>
- Li, J., & Zhuang, S. (2020). Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *European Polymer Journal*, 138, 109984. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109984>
- Li, Xiaoxia, Choi, J., Ahn, W.-S., & Row, K. H. (2018). Preparation and Application of Porous Materials based on Deep Eutectic Solvents. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(1), 73–85. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1383881>
- Li, Xiaoyang, Cui, K., Guo, Z., Yang, T., Cao, Y., Xiang, Y., Chen, H., & Xi, M. (2020). Heterogeneous Fenton-like degradation of tetracyclines using porous magnetic chitosan microspheres as an efficient catalyst compared with two preparation methods. *Chemical Engineering Journal*, 379, 122324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122324>
- Liu, Yaxin, Fang, N., Liu, B., Song, L., Wen, B., & Yang, D. (2018). Aligned porous chitosan/graphene oxide scaffold for bone tissue engineering. *Materials Letters*, 233, 78–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.08.108>
- Liu, Ying, Huang, S., Zhao, X., & Zhang, Y. (2018). Fabrication of three-dimensional porous β -

- cyclodextrin/chitosan functionalized graphene oxide hydrogel for methylene blue removal from aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 539, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.11.066>
- Ma, W., Dai, Y., & Row, K. H. (2018). Molecular imprinted polymers based on magnetic chitosan with different deep eutectic solvent monomers for the selective separation of catechins in black tea. *ELECTROPHORESIS*, 39(15), 2039–2046. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.201800034>
- Macquarrie, D. J., & Hardy, J. J. E. (2005). Applications of Functionalized Chitosan in Catalysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(23), 8499–8520. <https://doi.org/10.1021/ie050007v>
- Mane, S. (2016). Effect of porogens (type and amount) on polymer porosity: a review. *Can. Chem. Trans*, 4(2), 210–225.
- Meibom, K. L., Li, X. B., Nielsen, A. T., Wu, C.-Y., Roseman, S., & Schoolnik, G. K. (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2524 LP – 2529. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
- Mi, F., Shyu, S., Wu, Y., Lee, S., Shyong, J., & Huang, R. (2001). *Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing*. 22.
- Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., Gomez, G., & Gomez d’Ayala, G. (2020). Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 233(January), 115839. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>
- Mohamed, M. H., & Wilson, L. D. (2012). Porous Copolymer Resins: Tuning Pore Structure and Surface Area with Non Reactive Porogens. *Nanomaterials*, 2(2), 163–186. <https://doi.org/10.3390/nano2020163>
- Mokhtari, A., Sabzi, M., & Azimi, H. (2021). 3D porous bioadsorbents based on chitosan/alginate/cellulose nanofibers as efficient and recyclable adsorbents of anionic dye. *Carbohydrate Polymers*, 265(April), 118075.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118075>

- Moradi, A., Pramanik, S., Ataollahi, F., Kamarul, T., & Pinguan-Murphy, B. (2014). Archimedes revisited: computer assisted micro-volumetric modification of the liquid displacement method for porosity measurement of highly porous light materials. *Analytical Methods*, 6(12), 4396–4401. <https://doi.org/10.1039/C4AY00666F>
- Mukesh, C., Mondal, D., Sharma, M., & Prasad, K. (2014). Choline chloride – thiourea , a deep eutectic solvent for the production of chitin nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 103, 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.082>
- Negm, N. A., Hefni, H. H. H., Abd-Elaal, A. A. A., Badr, E. A., & Abou Kana, M. T. H. (2020). Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 681–702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.196>
- Nilsen-Nygaard, J., Strand, S. P., Vårum, K. M., Draget, K. I., & Nordgård, C. T. (2015). Chitosan: Gels and Interfacial Properties. In *Polymers* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/polym7030552>
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- Pal, P., Pal, A., Nakashima, K., & Yadav, B. K. (2021). Applications of chitosan in environmental remediation: A review. *Chemosphere*, 266, 128934. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128934>
- Pereira, C. S., Cunha, A. M., Reis, R. L., Vázquez, B., & San Román, J. (1998). New starch-based thermoplastic hydrogels for use as bone cements or drug-delivery carriers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9(12), 825–833. <https://doi.org/10.1023/A:1008944127971>
- Pérez-Nava, A., Mota-Morales, J. D., García-Carvajal, Z. Y., Herrera-Rodríguez, S. E., Arvillaga-Boni, G., Azanza-Ricardo, C. L., Vazquez-Lepe, M. O., & Gonzalez-Campos, J. B. (2018). Eco-friendly Production of Metallic Nanoparticles in Polymeric Solutions and Their Processing into Biocompatible Composites. *Fibers and Polymers*, 19(1), 156–169.

<https://doi.org/10.1007/s12221-018-7670-1>

- Perez-Soto, N., Moule, L., Crisan, D. N., Insua, I., Taylor-Smith, L. M., Voelz, K., Fernandez-Trillo, F., & Krachler, A. M. (2017). Engineering microbial physiology with synthetic polymers: cationic polymers induce biofilm formation in *Vibrio cholerae* and downregulate the expression of virulence genes. *Chemical Science*, 8(8), 5291–5298. <https://doi.org/10.1039/C7SC00615B>
- Perinelli, D. R., Fagioli, L., Campana, R., Lam, J. K. W., Baffone, W., Palmieri, G. F., Casettari, L., & Bonacucina, G. (2018). Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 117, 8–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.046>
- Raafat, D., & Sahl, H.-G. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 186–201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>
- Rafiee, F. (2019). Recent Advances in the Application of Chitosan and Chitosan Derivatives as Bio Supported Catalyst in the Cross Coupling Reactions. *Current Organic Chemistry*, 23(4), 390–408. <https://doi.org/10.2174/1385272823666190318164223>
- Ramírez-Wong, D. G., Ramírez-Cardona, M., Sánchez-Leija, R. J., Rugerio, A., Mauricio-Sánchez, R. A., Hernández-Landaverde, M. A., Carranza, A., Pojman, J. A., Garay-Tapia, A. M., Prokhorov, E., Mota-Morales, J. D., & Luna-Bárceñas, G. (2016). Sustainable-solvent-induced polymorphism in chitin films. *Green Chemistry*, 18(15), 4303–4311. <https://doi.org/10.1039/c6gc00628k>
- Rebelo, R., Fernandes, M., & Figueiro, R. (2017). Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Engineering*, 200, 236–243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.034>
- Reyes-Mercado, E., Rivas-Loaiza, J. A., García-Merinos, J. P., López, Y., & González-Campos, J. B. (2021). Chitosan-supported copper salt and copper metal nanoparticles/copper (I) oxide microcrystals: Efficient and recyclable heterogeneous catalysts for the synthesis of bis(indolyl)methanes. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 159(July), 108201. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108201>

- Reyes Mercado, E. (2019). *Catalizadores de cobre soportados en estructuras de quitosano para la obtención de bis (3-indolil) metanos*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Russo, F., Galiano, F., Iulianelli, A., Basile, A., & Figoli, A. (2021). Biopolymers for sustainable membranes in CO₂ separation: a review. *Fuel Processing Technology*, 213(October), 106643. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2020.106643>
- Sahebjamee, N., Soltanieh, M., Mousavi, S. M., & Heydarinasab, A. (2020). Preparation and characterization of porous chitosan-based membrane with enhanced copper ion adsorption performance. *Reactive and Functional Polymers*, 154, 104681. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104681>
- Samuel, A. Z., Umapathy, S., & Ramakrishnan, S. (2011). Functionalized and Postfunctionalizable Porous Polymeric Films through Evaporation-Induced Phase Separation Using Mixed Solvents. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(9), 3293–3299. <https://doi.org/10.1021/am200735t>
- Seol, Y., Lee, J., Park, Y., Lee, Y., Lee, S., Han, S., & Chung, C. (2004). *Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation*. 1037–1041.
- Shariatnia, Z. (2019). Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and Interface Science*, 263, 131–194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.008>
- Sharma, M., Mukesh, C., Mondal, D., & Prasad, K. (2013). *Dissolution of α -chitin in deep eutectic solvents*. 1–7.
- She, Z., Zhang, B., Jin, C., Feng, Q., & Xu, Y. (2008). Preparation and in vitro degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold. *Polymer Degradation and Stability*, 93(7), 1316–1322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2008.04.001>
- Shi, C., Lv, C., Wu, L., & Hou, X. (2017). Porous chitosan/hydroxyapatite composite membrane for dyes static and dynamic removal from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 338, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.022>
- Shivashankar, M., & Mandal, B. K. (2012). A review on interpenetrating polymer network. *Int.*

Int. J. Phram. Phram. Sci, 4(5), 1–7.

- Si, Z., Hou, Z., Vikhe, Y. S., Thappeta, K. R. V., Marimuthu, K., De, P. P., Ng, O. T., Li, P., Zhu, Y., Pethe, K., & Chan-Park, M. B. (2021). Antimicrobial Effect of a Novel Chitosan Derivative and Its Synergistic Effect with Antibiotics. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(2), 3237–3245. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c20881>
- Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2016). *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
- Sokolova, M. P., Smirnov, M. A., Samarov, A. A., Bobrova, N. V., Vorobiov, V. K., Popova, E. N., Filippova, E., Geydt, P., Lahderanta, E., & Toikka, A. M. (2018). Plasticizing of chitosan films with deep eutectic mixture of malonic acid and choline chloride. *Carbohydrate Polymers*, 197(March), 548–557. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.037>
- Vallejo-Macías, M. T., Recio-Colmenares, C. L., Pelayo-Vázquez, J. B., Gómez-Salazar, S., Carvajal-ramos, F., Soltero-Martínez, J. F., Vázquez-Lepe, M., Mota-Morales, J. D., Pérez-García, M. G., Vallejo-mac, T., Recio-Colmenares, C. L., Pelayo-va, J. B., Carvajal-ramos, F., Fe, J., Va, M., Vallejo-Macías, M. T., Recio-Colmenares, C. L., Pelayo-Vázquez, J. B., Gómez-Salazar, S., ... Pérez-García, M. G. (2020). Macroporous Polyacrylamide γ -Fe₂O₃ Nanoparticle Composites as Methylene Blue Dye Adsorbents. *ACS Applied Nano Materials*, 3(6), 5794–5806. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c00951>
- Venkatesan, J., Lee, J.-Y., Kang, D. S., Anil, S., Kim, S.-K., Shim, M. S., & Kim, D. G. (2017). Antimicrobial and anticancer activities of porous chitosan-alginate biosynthesized silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 515–525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.120>
- Wang, J., Zhou, L., Sun, Q., Cai, H., & Tan, W.-S. (2020). Porous chitosan derivative scaffolds affect proliferation and osteogenesis of mesenchymal stem cell via reducing intracellular ROS. *Carbohydrate Polymers*, 237, 116108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116108>
- Wang, K., Ma, H., Pu, S., Yan, C., Wang, M., Yu, J., Wang, X., Chu, W., & Zinchenko, A.

- (2019). Hybrid porous magnetic bentonite-chitosan beads for selective removal of radioactive cesium in water. *Journal of Hazardous Materials*, 362, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.067>
- Wang, W., Meng, Q., Li, Q., Liu, J., Zhou, M., Jin, Z., & Zhao, K. (2020). Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020487>
- Wong, C. Y., Wong, W. Y., Walvekar, R., Loh, K. S., Khalid, M., & Lim, K. L. (2018). Effect of deep eutectic solvent in proton conduction and thermal behaviour of chitosan-based membrane. *Journal of Molecular Liquids*, 269, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.102>
- Xing Ma, Yang Wang, Hun Guo, & Jintang Wang. (2011). Nano-hydroxyapatite/chitosan sponge-like biocomposite for repairing of rat calvarial critical-sized bone defect. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(4), 335–346. <https://doi.org/10.1177/0883911511407402>
- Xu, K., Ganapathy, K., Andl, T., Wang, Z., Copland, J. A., Chakrabarti, R., & Florczyk, S. J. (2019). 3D porous chitosan-alginate scaffold stiffness promotes differential responses in prostate cancer cell lines. *Biomaterials*, 217, 119311. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119311>
- Xu, Y., Han, J., Chai, Y., Yuan, S., Lin, H., & Zhang, X. (2018). Development of porous chitosan/tripolyphosphate scaffolds with tunable uncross-linking primary amine content for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 85, 182–190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.032>
- You, Y., Park, W. O. N. H. O. N. H. O., Min, B., Ko, B. M., Min, B., Ko, B. M., & Min, B. (2004). Effects of PVA sponge containing chitooligosaccharide in the early stage of wound healing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(3), 297–301. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000015491.91918.64>
- Zeltinger, J., Sherwood, J. K., Graham, D. A., Müller, R., Griffith, L. G., Ph, D., Sherwood, J. K., Ph, D., Graham, D. A., Müller, R., Ph, D., Griffith, L. G., & Ph, D. (2001). Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition.

Tissue Engineering, 7(5), 557–572. <https://doi.org/10.1089/107632701753213183>

- Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>
- Zhao, J., Luo, G., Wu, J., Xia, H., Plisko, T. V., Penkova, A. V., Burts, K. S., Bildyukevich, A. V., Dmitrenko, M. E., Melnikova, G. B., Atta, R. R., Mazur, A. S., Zolotarev, A. A., & Missyul, A. B. (2013). Preparation of Microporous Silicone Rubber Membrane with Tunable Pore Size via Solvent Evaporation-Induced Phase Separation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(6), 2040–2046. <https://doi.org/10.1021/am302929c>
- Zheng, L.-Y., & Zhu, J. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527–530. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.07.009>
- Zhu, Y., Wang, W., Yu, H., & Wang, A. (2019). Preparation of porous adsorbent via Pickering emulsion template for water treatment: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.09.001>
- Zia, Q., Tabassum, M., Lu, Z., Khawar, M. T., Song, J., Gong, H., Meng, J., Li, Z., & Li, J. (2020). Porous poly(L-lactic acid)/chitosan nanofibres for copper ion adsorption. *Carbohydrate Polymers*, 227, 115343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115343>
- Zia, Q., Tabassum, M., Umar, M., Nawaz, H., Gong, H., & Li, J. (2021). Cross-linked chitosan coated biodegradable porous electrospun membranes for the removal of synthetic dyes. *Reactive and Functional Polymers*, 166, 104995. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104995>