

Hidrogeles a base de quitosano para el tratamiento de úlceras cutáneas: métodos de fabricación y estado del arte

Karen Dayana Estupiñán Carreño y Ricardo Julián Carreño Mora

Trabajo de Grado para Optar al Título de Ingeniero Metalúrgico

Directora

Viviana Raquel Güiza Argüello

PhD en Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Metalúrgica

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A mi madre, quien me enseñó el valor del esfuerzo, perseverancia y resiliencia.

A la profesora Viviana, quien ha sido un ángel en mi camino y me ha brindado una mano cuando
más lo he necesitado.

A mis amigos, colegas y compañeros: Gustavo Pinzón, Mauricio macareo, Fabián Guerrero, por
brindarme un tinto, una palabra, una sonrisa, un abrazo en los momentos indicados.

A mis hermanos de vida y camino Laura Hernández y Adrián Rueda, que han sido testigos en
primera fila de todas las lágrimas, risas, esfuerzo, dedicación y de todo lo que este logro significa
para mí.

Y en general a todas aquellas personas que fueron partícipes y aportaron un grano de arena para
hacer este sueño realidad.

Karen Dayana Estupiñán Carreño

Dedicatoria

A mis padres Luzmila Mora Díaz y Ricardo Carreño Rojas quienes, con su amor, fe, comprensión me han apoyado e impulsado constantemente para alcanzar mis metas y sueños. Por sus sacrificios y esfuerzos para hacer de mí un hombre íntegro, y al final completar este logro personal.

Ricardo Julián Carreño Mora

Agradecimientos

A todos los profesores y personal de la escuela de ingeniería metalúrgica y ciencia de materiales de la Universidad Industrial de Santander, quienes fueron partícipes de nuestra formación como profesionales y ciudadanos del mundo.

Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos	12
1.1 Objetivo general	12
1.2 Objetivos específicos	12
2. Desarrollo del tema	13
2.1 Marco Referencial	13
2.1.1 Heridas cutáneas	13
2.1.2 Proceso de curación de heridas	13
2.1.3 Materiales poliméricos para administración de fármacos	15
2.1.4 Quitosano	16
2.1.5 Técnicas para la síntesis de hidrogeles a base de quitosano	17
2.2 Métodos	18
2.3 Resultados	18
2.3.1 Métodos de fabricación de hidrogeles de quitosano para apósitos de heridas cutáneas	18
2.3.2 Materiales adicionados en hidrogeles de quitosano para apósitos de heridas cutáneas	20
2.3.3 Metodología para evaluar el desempeño del hidrogel	24
2.3.4 Caracterización de hidrogeles	25
2.3.5 Porcentaje de hinchamiento	25
2.3.6 Prueba de actividad citotóxica	26

2.3.7 Estudio de curación de heridas y Evaluación de la cicatrización de heridas in vivo.....	27
2.3.8 Tinción histológica e inmunohistoquímica.....	27
2.3.9 Prueba de actividad antibacteriana.....	28
2.3.10 Estudios de degradación in vitro.....	29
3. Conclusiones.....	35
Referencias Bibliográficas.....	37

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Proceso de cicatrización de heridas.	14
Figura 2. Estructura del quitosano y de la quitina.	17
Figura 3. Esquema general de pasos a seguir para la preparación de hidrogeles a base de quitosano	31
Figura 4. Procedimiento de fabricación de hidrogeles a base de quitosano con componente bioactivo añadido	33
Figura 5. Procedimiento de fabricación de hidrogeles a base de quitosano con nanopartículas metálicas añadidas	34

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Métodos de fabricación de hidrogeles a base de quitosano.	19
Tabla 2. Materiales adicionados en hidrogeles a base de quitosano.	20

Resumen

Título: Hidrogeles a base de quitosano para el tratamiento de úlceras cutáneas: métodos de fabricación y estado del arte*.

Autor: Ricardo Julián Carreño Mora, Karen Dayana Estupiñán Carreño, Viviana Raquel Güiza Argüello**

Palabras Clave: Hidrogel, úlceras, quitosano, quitina.

Descripción:

Debido al crecimiento desmedido de la población en los últimos años, los gobiernos a nivel mundial se han visto obligados a destinar gran parte de su presupuesto anual al sector salud, sin embargo, año tras año más recursos son requeridos para el tratamiento de pacientes de alto costo haciendo insostenible dicha situación con el paso de los años. En el presente estudio se muestra la revisión del estado del arte correspondiente a la fabricación de hidrogeles a base de quitosano para su aplicación en úlceras cutáneas, se identificaron los mecanismos de fabricación más empleados en la actualidad, además, se estudiaron las ventajas, desventajas y limitaciones de cada mecanismo de fabricación de hidrogeles. Así mismo, se presenta al quitosano (CH) como un polímero natural con gran potencial para el desarrollo de materiales conocidos como apósitos de hidrogel, en los cuales las propiedades exhibidas como biodegradabilidad, bajo costo de producción (obtención), alta disponibilidad, baja toxicidad ha permitido que el quitosano adopte una posición privilegiada respecto a otros materiales empleados para la fabricación de hidrogeles. Con base en lo anterior, se plantea una metodología para la síntesis de hidrogeles de quitosano reticulados físicamente usando las técnicas de agitación y liofilización, finalmente se plantea un procedimiento para llevar a cabo la evaluación de la metodología de fabricación de hidrogeles propuesta.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica. Director: PhD. En Ingeniería Química Viviana Raquel Güiza Argüello

Abstract

Title: Chitosan-based hydrogels for the treatment of skin ulcers: manufacturing methods and state of the art*.

Author: Karen Dayana Estupiñán Carreño, Ricardo Julián Carreño Mora, Viviana Raquel Güiza Argüello**

Key Words: Hydrogel, ulcers, chitosan, chitin.

Description:

Due to the excessive growth of the population in recent years, governments worldwide have been forced to allocate a large part of their annual budget to the health sector, however, year after year more resources are required for the treatment of high-risk patients. cost making this situation unsustainable over the years. In the present study, the review of the state of the art corresponding to the manufacture of chitosan-based hydrogels for its application in skin ulcers is shown, the manufacturing mechanisms most used today were identified, in addition, the advantages, disadvantages and Limitations of each hydrogel fabrication mechanism. Likewise, chitosan (CH) is presented as a natural polymer with great potential for the development of materials known as hydrogel dressings, in which the properties exhibit biodegradability, low production cost (obtaining), high availability, low toxicity has allowed chitosan to adopt a privileged position with respect to other materials used for the manufacture of hydrogels. Based on the above, a methodology is proposed for the synthesis of physically cross-linked chitosan hydrogels using the techniques of stirrd and lyophilization, finally a procedure is proposed to carry out the evaluation of the proposed hydrogel manufacturing methodology.

* Degree Work

** Faculty of Physicochemical Engineering. Department of Metallurgical Engineering. Director: PhD. In Chemical Engineering Viviana Raquel Güiza Argüello

Introducción

En los últimos años, debido al aumento acelerado de pacientes que padecen enfermedades de alto costo como la diabetes, en donde a nivel mundial aumentó de 108 millones en 1980 a 422 millones de adultos en 2014. En 2016 fue la causa directa de 1,6 millones de muertes (Organización Mundial de la Salud, 2016) y en Colombia, en el año 2014 que cerca del 8% de la población padecía de diabetes.

El proceso de curación de heridas cutáneas causadas por quemaduras o cortes se ve ampliamente afectado en pacientes que presentan cuadros clínicos complejos, como la diabetes, enfermedades huérfanas o hereditarias, entre otros, en donde se ralentiza el proceso natural de curación, lo cual afecta significativamente la calidad de vida del paciente. Por tal razón, se ha hecho indispensable enfocar esfuerzos hacia el desarrollo de biomateriales que faciliten el proceso de curación de heridas cutáneas.

Además, actualmente, el costo de los tratamientos de úlceras crónicas implica un gasto que se visualiza insostenible con el tiempo. Anualmente, las naciones alrededor del mundo destinan una gran porción de sus recursos al área de la salud, en el caso específico de la diabetes, el costo anual en Colombia es de US \$245.000 millones, lo que incluye \$176 mil millones en costos médicos directos Y \$69 mil millones en pérdida de productividad (Jaimes Castillo; et al., 2019).

En este contexto, se hace indispensable la investigación y el desarrollo de biomateriales que permitan un tratamiento efectivo de heridas cutáneas, los cuales disminuyen el costo de dicho tratamiento y garanticen una recuperación total del paciente.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Proponer una metodología para la fabricación de hidrogeles a base de quitosano para el tratamiento de heridas cutáneas, a partir de una revisión del estado del arte.

1.2 Objetivos específicos

Realizar una revisión del estado del arte en el área del desarrollo de hidrogeles de quitosano para su uso como apósitos en el tratamiento de heridas cutáneas, identificando los principales retos científicos en este campo.

Proponer una metodología de fabricación de un biomaterial tipo hidrogel basado en el uso de quitosano para la obtención de apósitos, a partir de la revisión de la literatura realizada anteriormente.

Plantear una metodología para evaluar el desempeño del hidrogel propuesto, con base en la revisión literaria previamente realizada.

2. Desarrollo del tema

2.1 Marco Referencial

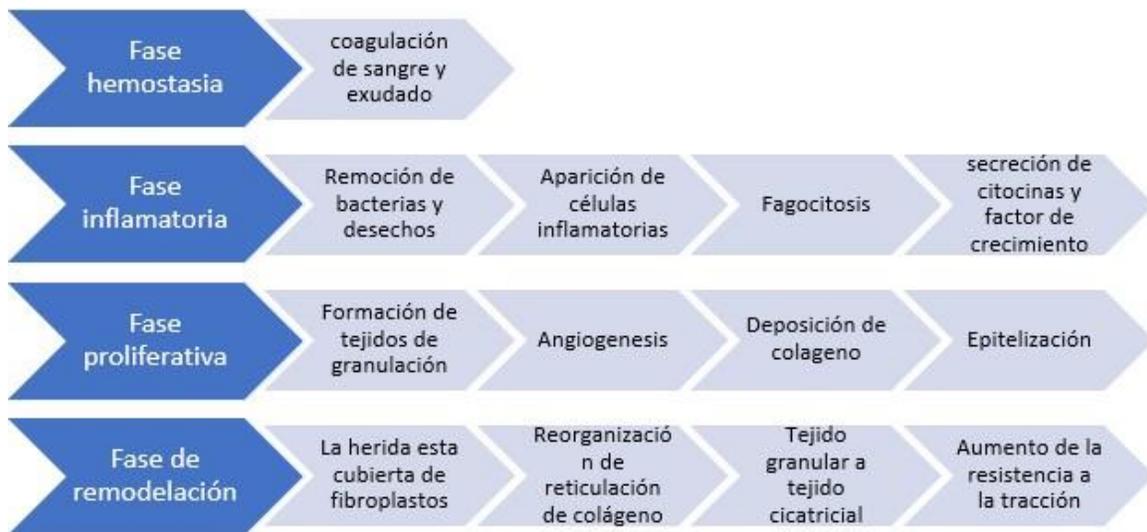
2.1.1 Heridas cutáneas

Las heridas cutáneas se definen como lesiones en la piel, las cuales se pueden clasificar en agudas y crónicas; teniendo en cuenta que el proceso de curación de una herida aguda puede sanar por completo dentro de un período de tiempo esperado (generalmente de 8 a 12 semanas), con cicatrices mínimas, las heridas crónicas suelen tardar más tiempo en cicatrizar (más de 12 semanas) con una alta posibilidad de reaparición. (Ahsan; et al., 2018).

En el caso de pacientes que presentan cuadros clínicos complejos como la diabetes, se pueden presentar periodos de curación prolongados debido a la naturaleza misma del cuadro clínico del paciente (Wang; et al., 2018).

2.1.2 Proceso de curación de heridas

La curación y cicatrización de heridas cutáneas es un proceso biológico complejo, este proceso se puede clasificar en cuatro etapas principales: fase hemostasia, fase inflamatoria, fase proliferativa y por último la fase de remodelación (Alven & Aderibigbe, 2020; Patel et al., 2019).

Figura 1.*Proceso de cicatrización de heridas.*

Este proceso de curación y cicatrización se puede ver afectado en sus diferentes etapas, debido a diferentes factores, como son factores externos y ambientales ligados al manejo y/o cuidado de la herida cutánea y también factores clínicos del paciente, como la desnutrición, la hipoxia, la inmunosupresión y las enfermedades crónicas (Singh et al., 2017).

La diabetes mellitus es una de estas enfermedades crónicas que va ligada a la inflamación a largo plazo acompañada de un estrés oxidativo elevado, flujo vascular deficiente, fallas en función inmunitaria son unos de los principales factores que perjudican la cicatrización de heridas. Según (Karri et al., 2016; Okonkwo & Dipietro, 2017) entre el 14 y el 24 % de los pacientes con úlceras asociadas a la diabetes sufren posteriormente una amputación de extremidades, y la tasa de mortalidad por amputación se acerca al 50-59 % cinco años después de la amputación.

Hidrogeles como apósitos de heridas

Los hidrogeles son materiales con propiedades adecuadas para el tratamiento médico de úlceras cutáneas causadas por quemaduras o lesiones, ya que proporcionan un entorno hidratante

para la herida a reparar, y también pueden reducir el dolor y el riesgo de infección bacteriana (Patrulea et al., 2015). Además, los hidrogeles son compatibles con varios medicamentos solubles en agua, lo que permite el uso de antibióticos para tratar infecciones. Sin embargo, las limitaciones de los hidrogeles incluyen citotoxicidad celular y biocompatibilidad en combinación con ciertos fármacos, así como la actividad biológica de los materiales (Khan et al., 2019).

Además, se debe tener suma precaución en la selección de la fuente de quitosano y el proceso de fabricación del hidrogel, ya que en estas etapas hay presencia de proteínas de origen animal y/o vegetal según sea el origen del quitosano y diferentes agentes químicos producto del proceso de obtención y fabricación de los hidrogeles, que al no ser eliminados en su totalidad pueden ser agentes contaminantes que ponen en riesgo la integridad del material y su potencial uso como biomaterial.

2.1.3 Materiales poliméricos para administración de fármacos

Hoy en día, diversas investigaciones han demostrado que las heridas cutáneas pueden curarse más rápida y eficazmente cuando la zona afectada recibe de manera constante y controlada una carga de fármacos o factores bioquímicos que favorece la recuperación del tejido lesionado (Bajraktarova-Valjakova et al., 2018; Tian et al., 2020). Los hidrogeles son materiales particularmente interesantes para este fin, ya que son estructuras poliméricas tridimensionales que pueden retener grandes cantidades de agua e imitar las propiedades viscoelásticas de una matriz extracelular y son ampliamente utilizados como portadores de fármacos o células para diversas aplicaciones biomédicas (Shariatinia & Jalali, 2018).

Esta combinación sinérgica entre apósitos a base de hidrogeles de quitosano y diferentes fármacos o sustancias como antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos entre otros, es una excelente estrategia para abordar los diferentes factores que afectan el proceso de curación y cicatrización, para así poder fomentar una mejor capacidad de cicatrización de heridas.

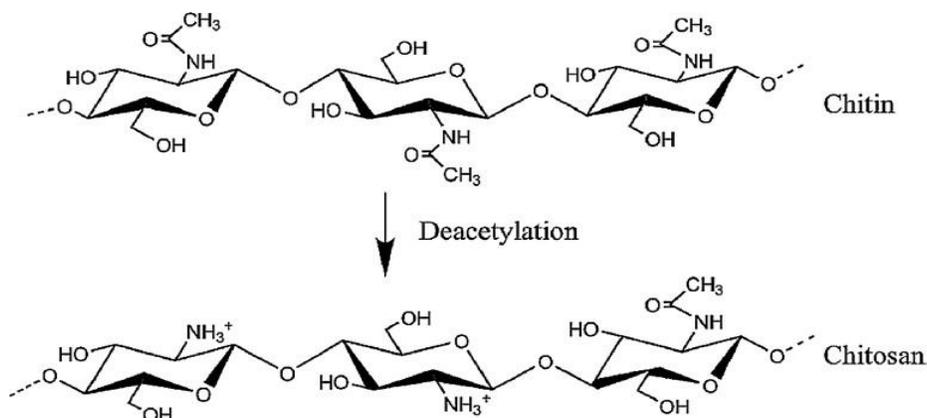
2.1.4 Quitosano

El quitosano (CH) es un excelente biopolímero para aplicaciones biomédicas, debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad (Alven & Aderibigbe, 2020). El quitosano es soluble en solución acuosa ácida gracias a su grado de acetilación, este hace referencia a la distribución de los grupos amino a lo largo de la cadena del polímero, dicha característica influye en una de las principales variables al momento de postular al quitosano como apósito para curación de heridas, ya que su naturaleza policatiónica en medios ácidos ($\text{pH} < 6,3$), influye propiedades funcionales, como la solubilidad, la proporción de hinchamiento, la bioactividad y la biodegradación (Matica et al., 2019; Shariatinia & Jalali, 2018).

Otro factor importante del quitosano es su peso molecular, ya al controlar esta característica se puede reducir la viscosidad y se puede mejorar la solubilidad en agua, además el grado de solubilidad lo hace moderadamente bioadhesivo gracias a interacciones electrostáticas (Yang et al., 2021).

Figura 2.

Estructura del quitosano y de la quitina.



Nota. Tomado de: (Hamedi et al., 2018)

2.1.5 Técnicas para la síntesis de hidrogeles a base de quitosano

A lo largo de los años, diversos estudios realizados han propuesto metodologías diferentes para la fabricación de hidrogeles cuyo principal componente es el quitosano. Sin embargo, es necesario combinarlo con otros polímeros o componentes bioactivos que permitan fortalecer sus propiedades en el tratamiento de heridas cutáneas.

Las técnicas de fabricación de hidrogeles de quitosano más comúnmente investigadas incluyen: emulsión, liofilización, agitación, foto-reticulación, acomplejamiento de polielectrolitos. Las ventajas y desventajas asociadas a cada uno de estos métodos están relacionadas con factores como el tiempo de fabricación, disponibilidad de materiales base y costo (Hamedi et al., 2018; Patrúlea et al., 2015).

2.2 Métodos

Se realizó la recopilación de información sobre el estado del arte en el periodo comprendido desde el año 2015 al 2022, en el área de métodos y materiales para la fabricación de hidrogeles a base de quitosano para el tratamiento de úlceras cutáneas, utilizando las bases de datos de la Universidad. La síntesis de información se organizó en tablas de acuerdo con aspectos como el tipo de material investigado, las condiciones experimentales utilizadas, resultados obtenidos, ventajas y limitaciones identificadas. Luego, a partir del análisis de la información recopilada, se identificaron las variables que afectan al proceso de fabricación y se propuso una metodología para la síntesis de apósitos de hidrogeles a base de quitosano. Así mismo, se definieron un conjunto de variables relevantes para evaluar el desempeño del material.

2.3 Resultados

2.3.1 Métodos de fabricación de hidrogeles de quitosano para apósitos de heridas cutáneas

Se han investigado diversos métodos actualmente usados para la fabricación de hidrogeles de quitosano para apósitos de heridas cutáneas, el método idóneo a usar está estrechamente ligado con la disponibilidad de equipos, tipos de reactivos y costos.

Tabla 1.

Métodos de fabricación de hidrogeles a base de quitosano.

Referencia	Grado de desacetilación del quitosano	Peso molecular del quitosano	Método de Fabricación
(Cardoso et al., 2019)	75-85%	~400 kDa	Emulsificación
(Cifuentes et al., 2020)	75-85%	~120 kDa	Agitación
(Du et al., 2019)	85,3%	100 kDa	Agitación
(He et al., 2020)	>75	~120 kDa	Foto-reticulación
(Karimi et al., 2018)	75–80%	400 kDa	Agitación
(Ravishankar et al., 2019)	90%	400 kDa	Liofilización
(Liang et al., 2020)	≥98%	100-300 kDa	Agitación
(Masood et al., 2019)	>75%	50-190 kDa	Agitación
(Qu et al., 2018)	No especifica	100–300 kDa	Dispersión sólida
(Shamloo et al., 2021)	75-85%	~400 kDa	Liofilización
(Shi et al., 2017)	95%	No se especifica	Liofilización
(Xue et al., 2019)	95%	200 kDa	Liofilización
(Y. Zhang et al., 2019)	No especifica	No se especifica	Liofilización
(Kaczmarek-Szczepanska et al., 2021)	78%	180 kDa	Reticulación química
(Özkahraman et al., 2021)	No especifica	No se especifica	agitación
(Guyot et al., 2021)	80%	160 kDa	liofilización
(Xu et al., 2021)	>60%	No se especifica	Disolución directa
(Sapru et al., 2021)	75–85 %	190–310 kDa	Agitación continua
(Suflet et al., 2021)	82,7%	233,6 kDa	Reticulación química
(Kaur et al., 2021)	75%	No se especifica	Agitación
(Huang et al., 2021)	75-85%	160 kDa	Agitación
(Eliyahu et al., 2021)	77,6%	207 kDa	Agitación
(Qianqian et al., 2021)	≥90%	100 kDa	Liofilización
(Pan et al., 2022)	No especifica	100 - 300 kDa	Agitación
(Mozalewska et al., 2017)	90,2%	80–200 kDa	Radiación ionizante
(D. Zhang et al., 2015)	~ 80%	No se especifica	Agitación
(Jiang et al., 2016)	97%	No se especifica	Agitación
(Khorasani et al., 2018)	≥80%	~400 kDa	Liofilización
(Nezhad-Mokhtari et al., 2020)	~85%	~370 kDa	Agitación
(Gull et al., 2020)	~90%	90 kDa	Agitación

2.3.2 Materiales adicionados en hidrogeles de quitosano para apósitos de heridas cutáneas

A continuación, se presentan las sustancias adicionales a los reactivos principales empleadas para la fabricación de los diferentes hidrogeles y sus propiedades.

Tabla 2.

Materiales adicionados en hidrogeles a base de quitosano.

Referencia	Grado de desacetilación del quitosano	Peso molecular del quitosano	Otros polímeros usados	Componente bioactivo añadido	Otros	Propiedades
(Cardoso et al., 2019)	75-85%	~400 kDa	--	--	Fenitoína Aceite de semilla de uva	Aceleración de la cicatrización y reducción del área de la herida.
(Cifuentes et al., 2020)	75-85%	~120 kDa	--	Heparina	Carboximetil-celulosa	Facilita la contracción de las heridas, lo que a su vez disminuye el tiempo de curación, interactuando con factores de crecimiento clave y los protege de la proteólisis.
(Du et al., 2019)	85,3%	100 kDa	--	Dextrano	--	Hidrogel inyectable y autocurativo con excelentes propiedades hemostáticas, antibacterianas y de cicatrización acelerada de heridas.
(He et al., 2020)	>75%	~120 kDa	Metacrilato	--	Fibroína de seda Ácido tánico	Hidrogel con alta resistencia mecánica.
(Karimi et al., 2018)	75–80%	400 kDa	--	--	Metronidazol	Hidrogeles con fármaco añadido

Referencia	Grado de desacetilación del quitosano	Peso molecular del quitosano	Otros polímeros usados	Componente bioactivo añadido	Otros	Propiedades
						para combatir enfermedades causadas por infecciones por bacterias y protozoos anaeróbicos.
(Ravishankar et al., 2019)	90%	400 kDa	Lignina	--	--	Hidrogel reforzado con lignina con buenas propiedades mecánicas.
(Liang et al., 2020)	≥98%	100-300 kDa	Metacrilato	Gelatina	Óxido de grafeno	Hidrogel conductor con excelentes propiedades antibacterianas.
(Masood et al., 2019)	>75%	50-190 kDa	Polietilenglicol Colágeno	Nanopartículas de plata	--	Hidrogel conductor con nanopartículas metálicas con propiedades antibacterianas.
(Qu et al., 2018)	No específica grado de desacetilación	100–300 kDa	--	Curcumina	--	Hidrogel cargado de curcumina con propiedad antiinflamatoria, antiinfecciosa y antioxidante.
(Shamloo et al., 2021)	75-85%	~400 kDa	Acetato de polivinil o (PVA) Gelatina	Miel	--	Hidrogeles con miel presentan buena viabilidad celular.
(Shi et al., 2017)	95%	No se específica	Seda	Exosomas derivados de células madre mesénquimales gingivales (GMSC)	--	Hidrogel con buena capacidad de absorción de agua manteniendo la integridad del material.
(Xue et al., 2019)	95%	200 kDa	Poliacrilamida	Matrigel	--	Hidrogel con propiedades mecánicas muy cercanas a las de la piel.

Referencia	Grado de desacetilación del quitosano	Peso molecular del quitosano	Otros polímeros usados	Componente bioactivo añadido	Otros	Propiedades
(Y. Zhang et al., 2019)	No específica	No se específica	Lignina PVA	--	--	Hidrogel con lignina que aumenta propiedades mecánicas.
(Kaczmarek-Szczepanska et al., 2021)	78%	180 kDa	--	--	Ácido tánico	Hidrogeles con propiedades Antiinflamatorio, antimicrobianas, con efectos anti mutagénicos, antitumorales y antioxidantes.
(Özkahraman et al., 2021)	No específica grado de desacetilación	No se específica	Gelatina	Ácido hialurónico	Ampicilina	Hidrogel cargado con ampicilina, buenas propiedades antibióticas.
(Guyot et al., 2021)	80%	160 kDa	--	Catecol	Bicarbonato de sodio	Hidrogeles bioadhesivos e inyectables gracias a su termo sensibilidad.
(Xu et al., 2021)	>60%	No se específica	Quitina	--	--	Hidrogel amigable con el medio ambiente y con excelente viabilidad celular.
(Sapru et al., 2021)	75–85 %	190–310 kDa	Proteína de seda sericina	Ácido hialurónico	--	Hidrogeles reforzados con seda que mejora la respuesta mecánica.
(Suflet et al., 2021)	82,7%	233,6 kDa	--	Nanopartículas de plata	--	Hidrogeles con nanopartículas metálicas con acción antimicrobiana.
(Kaur et al., 2021)	75%	No se específica	Colágeno-I	--	Nanotubos de carbono carboxilados de pared simple	Hidrogeles reforzados con nanotubos de carbono con buenas

Referencia	Grado de desacetilación del quitosano	Peso molecular del quitosano	Otros polímeros usados	Componente bioactivo añadido	Otros	Propiedades
(Huang et al., 2021)	75-85%	160 kDa	--	--	Gluconato de calcio	propiedades mecánicas. Hidrogeles con capacidad de neutralizar iones fluoruro.
(Eliyahu et al., 2021)	77,6%	207 kDa	--	--	Pectina tiolada	Hidrogeles con propiedades de mucoadhesión.
(Qianqian et al., 2021)	≥90%	100 kDa	--	Péptidos de tilapia (TP)	hidroxiapatita (HA)	Hidrogel con péptidos de tilapia e hidroxiapatita con excelente viabilidad celular.
(Pan et al., 2022)	No específica	100 - 300 kDa	--	--	Ácido Tánico	Hidrogeles con alta capacidad de cicatrización, curación y eliminación de radicales libres.
(Mozaleska et al., 2017)	90,2%	80–200 kDa	--	--	--	Hidrogel antimicrobiano fabricado mediante la técnica de reticulación de polímeros hidrofílicos iniciada por radiación, es decir, la fabricación de gel y su esterilización en un solo proceso.
(D. Zhang et al., 2015)	~ 80%	No se especifica	PVA-COOH poli (alcohol vinílico) modificado con carboxilo	--	Gentamicina	Hidrogel con carga de fármaco antibiótico.

Referencia	Grado de desacetilación del quitosano	Peso molecular del quitosano	Otros polímeros usados	Componente bioactivo añadido	Otros	Propiedades
(Jiang et al., 2016)	97 %	No se especifica	Hipromelosa HPMCS	--	--	Hidrogel con capacidad de hinchamiento y humectación de la herida manteniendo el intercambio de oxígeno con el medio exterior.
(Khorasani et al., 2018)	≥80%	~400 kDa	PVA	Heparina	Nanopartículas de ZnO	Hidrogel con nanopartículas metálicas que favorecen el crecimiento y viabilidad celular.
(Nezhad-Mokhtari et al., 2020)	~85%	~370 kDa	Colágeno Celulosa nano cristalina	Nanopartículas de oro	--	Hidrogel con nanopartículas metálicas que favorecen el crecimiento y viabilidad celular.
(Gull et al., 2020)	~90%	90 kDa	--	--	Diclofenaco sódico	Hidrogel con acción antiinflamatoria y analgésica.

2.3.3 Metodología para evaluar el desempeño del hidrogel

Se realizó el análisis de la información recopilada y estudiada previamente en donde se resalta la importancia de la caracterización de los hidrogeles obtenidos para así conocer su desempeño y potencial para ser usados como apósitos en heridas cutáneas.

2.3.4 Caracterización de hidrogeles

Mediante el uso de técnicas como Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope) SEM puede observar microscópicamente la morfología de los hidrogeles y evaluar su microestructura, con esta técnica se puede caracterizar la distribución y tamaño de los poros, la porosidad en los hidrogeles es una propiedad física esencial y es deseable para la absorción de la eliminación de desechos y el suministro e intercambio de oxígeno y /o otras sustancias.

Usando espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) para investigar sus grupos químicos característicos y posibles agentes contaminantes presentes en el hidrogel.

El análisis termogravimétrico (TGA) se usa para la evaluación de la estabilidad térmica y el análisis de pérdida de peso (%) versus temperatura.

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles se pueden evaluar cuantitativamente midiendo la tensión frente a la deformación y luego calculando el módulo de Young a partir de la pendiente del segmento lineal de las curvas de tensión deformación.

2.3.5 Porcentaje de hinchamiento

Las relaciones de hinchamiento de los hidrogeles se determinan utilizando el método gravimétrico. Los hidrogeles húmedos se sumergen en una solución tamponada.

Se toman muestras para estudios después de diferentes intervalos de tiempo.

Las fases sólida y líquida se separan por filtración y luego se lavan con agua destilada y el exceso de agua se elimina usando un papel suave. Posteriormente se registra el peso, para el estudio de degradación del hidrogel, se procede a secar totalmente las muestras y se registra el peso.

Con dicho procedimiento se calcula el porcentaje de hinchamiento relativo y pérdida de peso de las muestras de hidrogel:

$$\% \text{hinchazón} = ((W_b - W_a) / W_a) * 100 \text{ (Nezhad- Mokhtari et al., 2020)}$$

W_a y W_b son el peso de los hidrogeles antes y después de la inmersión en la solución tamponada.

$$\% \text{pérdida de peso} = ((W_a - W_c) / W_a) * 100 \text{ (Mozale wska et al., 2017)}$$

W_a y W_c son el peso de los hidrogeles antes de la inmersión y después de la degradación en estado húmedo.

2.3.6 Prueba de actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los hidrogeles se analiza utilizando cultivos celulares. Las células se siembran en una placa y posteriormente los cultivos se tratan con hidrogeles. Las soluciones de muestra se retiran en diferentes intervalos de tiempo. El crecimiento de las células cultivadas se analiza utilizando el ensayo de Cuantificación del número de células viables y ensayos de proliferación y citotoxicidad, como resultado del ensayo de viabilidad de células se tiene una relación entre células vivas/muertas.

2.3.7 Estudio de curación de heridas y Evaluación de la cicatrización de heridas in vivo

Para el estudio y evaluación de la cicatrización de heridas se usan métodos in vivo, creando heridas en animales de prueba como ratones y conejos, en donde se tienen diferentes grupos, siendo el grupo de control el grupo que no se realiza la aplicación del hidrogel como apósito en la herida y los otros grupos se tratan con hidrogeles con diferentes concentraciones y/o condiciones que se quieren evaluar.

Se realiza seguimiento a los grupos, tomando registro fotográfico en diferentes lapsos de tiempo y realizando la respectiva medida de reducción y contracción de la herida.

Proporción del área de la herida (%) = $(S_0 - S/S_0) \times 100$ (Pan et al., 2022)

siendo S área de la herida en un tiempo t y S₀ el área inicial de la herida.

2.3.8 Tinción histológica e inmunohistoquímica

El nivel de colágeno en el tejido de granulación es uno de los principales marcadores de la cicatrización de heridas. El contenido de colágeno de los tejidos se ensaya mediante el método de Tinción tricrómica de Masson (es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I).

2.3.9 Prueba de actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los hidrogeles para bacterias Gram Positivas, Bacterias Gram Negativo se evalúan preparando los hidrogeles y colocándolos en contacto con una suspensión bacteriana.

Después de la inoculación, los hidrogeles se incuban a una temperatura y tiempo adecuados, luego se realiza el respectivo conteo de las colonias de bacterias presentes en el grupo de control y en el grupo con hidrogel. Los resultados se expresan como:

%muerte: $(\text{Recuento de colonias de control} / \text{Recuento de colonias de hidrogeles}) / \text{Recuento de colonias de control} * 100$. (Sapru et al., 2021)

La expresión de proteína total, hidroxiprolina

La hidroxiprolina es un aminoácido precursor necesario para la síntesis de procolágeno y colágeno. Como refleja indirectamente el contenido de colágeno y está relacionado con la capacidad de cicatrización de los tejidos, es un indicador importante para evaluar la cicatrización de heridas (Qianqian et al., 2021).

El nivel de proteína total en la piel se midió utilizando Fraccionamiento subcelular para la homogeneización del tejido. La homogeneización trata de la disgregación y/o separación de los tejidos en las células que los componen y luego realizar la lisis de las células.

Una vez que se tienen todos los componentes de los tejidos celulares libres, es necesario separarlos en sus respectivas fracciones. Para este fin se usa el método de fraccionamiento mediante centrifugación diferencial, en donde los diferentes componentes celulares de los tejidos analizados se separan y se encuentran suspendidos en una fase líquido, por gravedad algunos componentes tienden a sedimentarse hacia el fondo.

2.3.10 Estudios de degradación in vitro

El hinchamiento de un hidrogel es una propiedad importante ya que la relación de hinchamiento a través del tiempo aporta información relevante de la estabilidad de la armazón del hidrogel, lo que determina la interacción entre biomateriales y células. Si los hidrogeles tienen un alto grado de hinchamiento y estabilidad a largo plazo, se espera una buena interacción entre la célula y los hidrogeles.

Para esto se somete el hidrogel a inmersión en un medio líquido y se toman datos de % de hinchamiento vs tiempo, cuando esta curva se suaviza se hace constante, llega al estado de equilibrio del hidrogel.

Método propuesto de fabricación de hidrogel base quitosano para el tratamiento de úlceras cutáneas

Acorde con lo consultado en la documentación pertinente para la presente investigación, se identificó que los hidrogeles que son físicamente reticulados son de particular interés debido a la ausencia de reactivos y agentes reticulantes químicos, lo cual es una ventaja al momento de obtención de hidrogeles empleados para la fabricación de apósitos (Hamedi et al., 2018). Además de que con hidrogeles de reticulación química se debe tener especial cuidado pues muchos de estos componentes son tóxicos y pueden desprenderse durante o antes de su aplicación, por lo anterior mencionado se recomienda que el método propuesto presente reticulación de tipo físico.

Los ya mencionados hidrogeles físicos o reversibles, presentan una desventaja significativa, y es que, debido al tipo de redes o enredamientos moleculares que presentan como: enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, condensación de cargas, entre otras, su estructura tiende a ser débil si se compara con lo hidrogeles reticulados químicamente, por lo cual se debe

tener especial cuidado, y por ello se encontró que, para mitigar esta desventaja se pueden adicionar diferentes complementos a la mezcla para mejorar sus propiedades.

Las interacciones dentro de los hidrogeles reticulados físicamente o reversibles son muy numerosas y presentan alta complejidad debido a la dependencia de diversos estímulos externos como la fuerza iónica, el pH, la composición del disolvente empleado o la temperatura, por otra parte, estos hidrogeles presentan gran versatilidad en su comportamiento cuando se enfrentan a diferentes medios, esto es una ventaja que tiene los hidrogeles reticulados físicamente frente a los hidrogeles enlazados covalentemente (reticulación química).

Los hidrogeles, en especial los reticulados físicamente, muestran buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, y no requieren el uso de disolventes orgánicos, pero presentan una limitante respecto a la composición, ya que pequeños cambios en su estequiometría pueden llegar a debilitar o incluso llegar a eliminar la interacción estereoquímica.

Se puede llegar a fabricar un hidrogel físicamente reticulado empleando una agitación (vigorosa) ya que es un método muy sencillo comparado con otros métodos de fabricación de hidrogeles, ya que en muchas situaciones no se requieren de instrumentos difíciles de adquirir y los costos de producción son bajos en comparación de otros métodos debido a los reactivos usados.

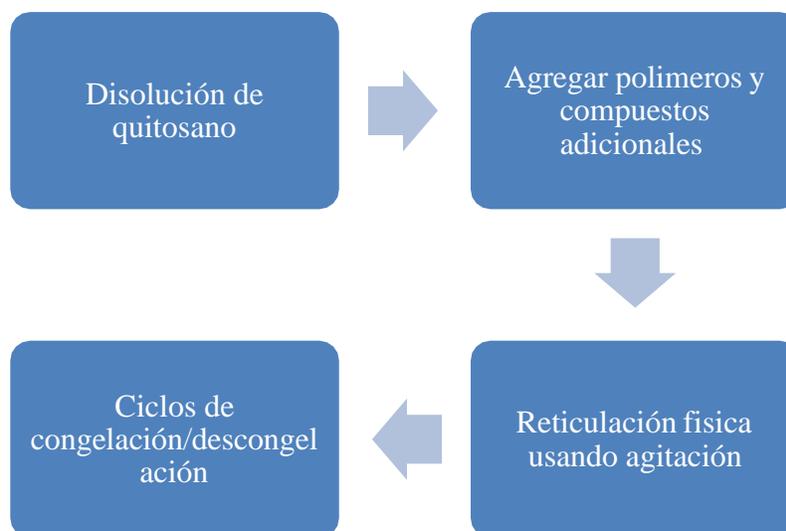
Posterior a la agitación se sugiere realizar el proceso de liofilización, el cual consiste en procesos de congelación y descongelación, emplear la liofilización tiene dos razones principales, el primero es purificar y eliminar excesos de agua y el segundo es fomentar la creación de poros en el hidrogel. Esto sucede ya que al realizar el proceso de congelación se hace una separación de las fases ricas en agua polímero y las fases poliméricas, en donde los líquidos pobres en polímero forman cristales de hielo que al someter al hidrogel a descongelación serán eliminados, dando como resultado un hidrogel con mayor pureza/cristalinidad y sin excesos de agua. Como segundo

fin o beneficio de realizar liofilización posterior al proceso de reticulación física por agitación, es que este favorece la formación de estructuras porosas en el hidrogel, ya que al realizar la etapa de descongelación quedan espacios vacíos los cuales se encontraban siendo ocupados por las fases líquidas pobres en polímero, las cuales son eliminadas en esta etapa del proceso de liofilización.

Adicional a los reactivos principales en el proceso de fabricación de hidrogeles a base de quitosano, se sugiere agregar y/o adicionar otros componentes como los son otros polímeros, fármacos y/o compuestos bioactivos, los cuales complementan sinérgicamente la acción de los hidrogeles a base de quitosano, teniendo como resultado el favorecimiento del proceso de cicatrización y curación de heridas cutáneas. Un factor importante al momento de la elección de estos componentes es la facilidad de adquisición, costo, complejidad en el proceso de fabricación y factores o propiedades propias del material.

Figura 3.

Esquema general de pasos a seguir para la preparación de hidrogeles a base de quitosano



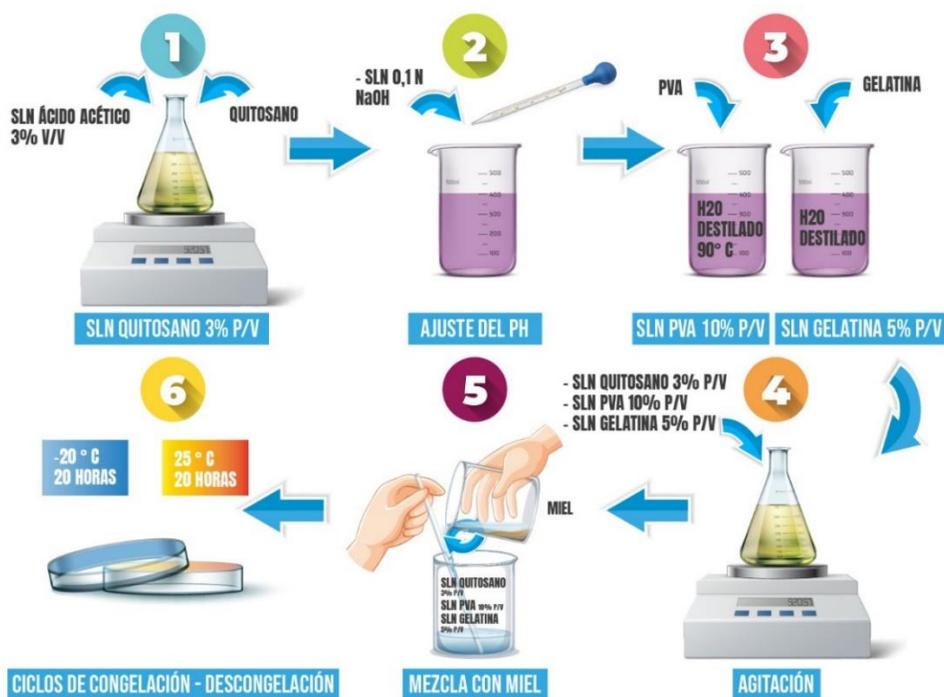
Finalmente, se sugiere usar el procedimiento de fabricación usado por (Shamloo et al., 2021) y (Khorasani et al., 2018), como se muestran a continuación respectivamente:

Procedimiento 1: Fabricación y evaluación de hidrogel de quitosano-gelatina-PVA que incorpora miel para aplicaciones de cicatrización de heridas: un estudio in vitro in vivo:

- **Disolver quitosano en medio ácido:** El quitosano se disolvió en una solución de ácido acético al 3% v/v a una concentración del 3% p/v con agitación magnética durante 24 h a 37 °C.
- **Ajustar ph:** Se ajustó el pH de la solución añadiendo gota a gota una solución 0,1 N de NaOH a la solución de polímero.
- **Agregar reticulante, polímero y/o compuestos adiciones:** el polímero de PVA se disolvió en el agua destilada a 90 °C para obtener una solución al 10% p/v. Se preparó una solución de gelatina al 5% p/v añadiendo gelatina en el agua destilada.
- **Reticulación física por la técnica de agitación:** Todas las soluciones de quitosano, PVA y solución de gelatina preparadas se mezclaron usando agitación magnética durante 2 h para formar una mezcla homogénea.
- **Agregar compuesto bioactivo:** Se añadió miel a varias concentraciones a la solución de polímero y se mezcló para 2 horas extra.
- **Ciclos de congelación y descongelación:** las muestras se colocaron en -20 °C durante 20 horas, luego se mantuvieron a 25 °C durante 4 horas. Este ciclo de congelación- descongelación se realizó tres veces.

Figura 4.

Procedimiento de fabricación de hidrogeles a base de quitosano con componente bioactivo añadido



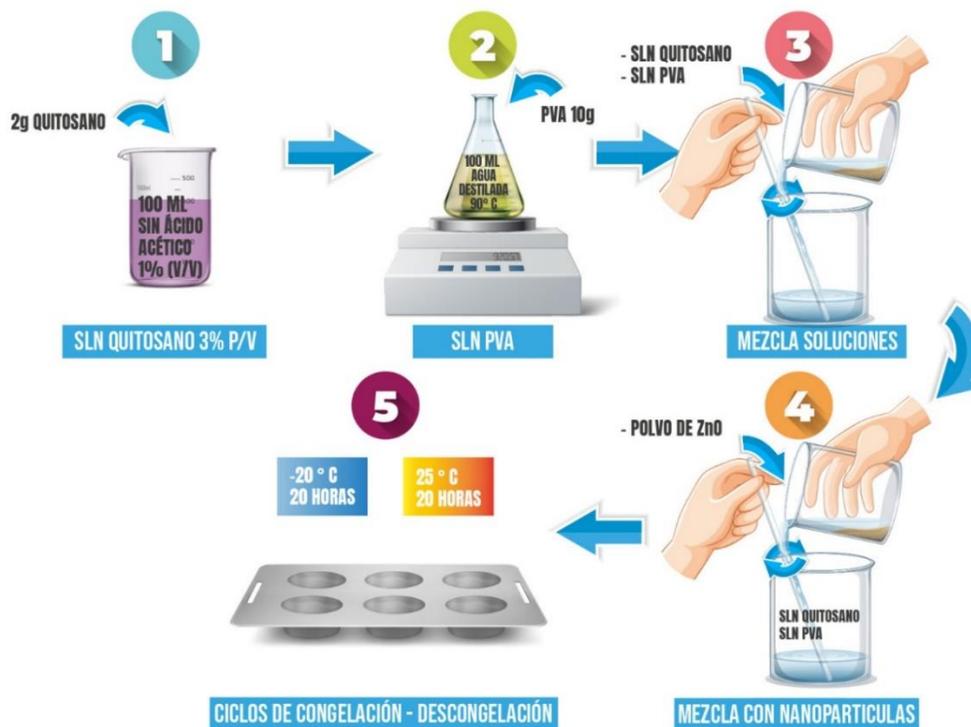
Procedimiento 2: Incorporación de nanopartículas de ZnO en hidrogeles de poli(alcohol vínicico/quitosano) heparinizados para la aplicación de apósitos para heridas:

- **Disolver quitosano en medio ácido:** la solución de quitosano se preparó disolviendo 2 g de quitosano en 100 ml de una solución acuosa de ácido acético al 1% (v/v) a temperatura ambiente.
- **Agregar reticulante, polímero y/o compuestos adiciones:** la solución de PVA se preparó disolviendo 10 g de PVA en 100 ml de agua destilada a 90 °C durante 1 hora.
- **Reticulación física por la técnica de agitación:** Se combinaron soluciones de PVA y quitosano con agitación mecánica continua hasta formar una mezcla homogénea.

- **Agregar nanopartículas metálicas:** Se añadió polvo de nZnO a soluciones poliméricas con proporciones de peso en relación con el peso del polímero y la mezcla se agitó durante 1 hora.
- **Ciclos de congelación y descongelación:** la solución de polímero se vertió en los moldes de teflón y se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 22 h. Luego, los geles congelados se colocaron a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 2 h y luego a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se realizaron ciclos de congelación-descongelación de 2 y 4 ciclos y luego las muestras congeladas se liofilizaron durante 24 h para obtener hidrogeles porosos de PVA/quitosano/nZnO

Figura 5.

Procedimiento de fabricación de hidrogeles a base de quitosano con nanopartículas metálicas añadidas



3. Conclusiones

El estudio de la información obtenida de investigaciones realizadas en el campo de los biomateriales, en específico de la fabricación y desarrollo de hidrogeles a base de quitosano (CH), facilitó determinar los mecanismos físico-químicos presentes en la fabricación de los mismos, así como las metodologías empleadas al fabricar hidrogeles de quitosano para su potencial uso en el proceso de cicatrización y curación de úlceras cutáneas.

Por otra parte, se determinaron un grupo de variables que son fundamentales en el momento de desarrollar una metodología para la fabricación de hidrogeles, entre estas variables se pueden destacar, el pH, grado de desacetilación, concentración y pureza del quitosano, además de algunos polímeros naturales o sintéticos, compuestos adicionados, que en mayor o menor grado pueden mejorar las propiedades del hidrogel.

Además, el presente trabajo de grado se enfocó en el uso del biopolímero quitosano proveniente de la desacetilación de la quitina (material presente en los caparazones de crustáceos entre otros) como material base para la obtención de hidrogeles, aprovechando sus características únicas, entre las que se destacan la facilidad de transformar quitina en quitosano, debido a la alta disponibilidad y bajo costo de este material en el mercado, por otra parte la alta biocompatibilidad, simplicidad en el proceso de fabricación, lo anterior sumado a la facilidad de mezclarse con otros componentes orgánicos o inorgánicos, se propuso una metodología cuya finalidad fue la síntesis de hidrogeles mediante agitación y liofilización (reticulación física), garantizando buenas propiedades mecánicas y químicas que favorecen el proceso de cicatrización y curación de úlceras cutáneas.

La revisión del estado del arte realizada en el área del desarrollo de nuevos materiales para su uso como apósitos permitió identificar los retos que la academia debe afrontar a futuro, observando las oportunidades de mejoras en cada uno de los métodos que han sido desarrollados a lo largo del tiempo y la factibilidad de desarrollar nuevos hidrogeles empleando los métodos de agitación y liofilización utilizando quitosano, esto facilita abarcar las carencias actuales en el mercado y el sector salud, el desarrollo de esta metodología supone una alternativa sostenible y económica para tratar pacientes con úlceras en un tiempo menor de lo usual y a un costo inferior al actual.

Referencias Bibliográficas

- Ahsan, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Gopal, S., Asthana, A., & Bhatnagar, I. (2018). International Journal of Biological Macromolecules Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *110*, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>
- Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2020). Chitosan and cellulose-based hydrogels for wound management. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms21249656>
- Bajraktarova-Valjakova, E., Korunoska-Stevkovska, V., Georgieva, S., Ivanovski, K., Bajraktarova-Misevska, C., Mijoska, A., & Grozdanov, A. (2018). Hydrofluoric acid: Burns and systemic toxicity, protective measures, immediate and hospital medical treatment. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, *6*(11), 2257–2269. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.429>
- Cardoso, A. M., de Oliveira, E. G., Coradini, K., Bruinsmann, F. A., Aguirre, T., Lorenzoni, R., Barcelos, R. C. S., Roversi, K., Rossato, D. R., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Burger, M. E., & Beck, R. C. R. (2019). Chitosan hydrogels containing nanoencapsulated phenytoin for cutaneous use: Skin permeation/penetration and efficacy in wound healing. *Materials Science and Engineering C*, *96*(March 2018), 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.013>
- Cifuentes, A., Gómez-Gil, V., Ortega, M. A., Asúnsolo, Á., Coca, S., Román, J. S., Álvarez-Mon, M., Buján, J., & García-Honduvilla, N. (2020). Chitosan hydrogels functionalized with

- either unfractionated heparin or bemiparin improve diabetic wound healing. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 129(July), 110498. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110498>
- Du, X., Liu, Y., Wang, X., Yan, H., Wang, L., Qu, L., Kong, D., Qiao, M., & Wang, L. (2019). Injectable hydrogel composed of hydrophobically modified chitosan/oxidized-dextran for wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 104(March), 109930. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109930>
- Eliyahu, S., Galitsky, A., Ritov, E., & Bianco-Peled, H. (2021). Hybrid acrylated chitosan and thiolated pectin cross-linked hydrogels with tunable properties. *Polymers*, 13(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/polym13020266>
- Gull, N., Khan, S. M., Butt, O. M., Islam, A., Shah, A., Jabeen, S., Khan, S. U., Khan, A., Khan, R. U., & Butt, M. T. Z. (2020). Inflammation targeted chitosan-based hydrogel for controlled release of diclofenac sodium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.133>
- Guyot, C., Cerruti, M., & Lerouge, S. (2021). Injectable, strong and bioadhesive catechol-chitosan hydrogels physically crosslinked using sodium bicarbonate. *Materials Science and Engineering C*, 118(September 2020), 111529. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111529>
- Hamedi, H., Moradi, S., Hudson, S. M., & Tonelli, A. E. (2018). Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 199, 445–460. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.114>
- He, X., Liu, X., Yang, J., Du, H., Chai, N., Sha, Z., Geng, M., Zhou, X., & He, C. (2020). Tannic acid-reinforced methacrylated chitosan / methacrylated silk fibroin hydrogels with

- multifunctionality for accelerating wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 247(November). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116689>
- Huang, S. W., Yeh, F. C., Ji, Y. R., Su, Y. F., Su, Y. shih, Chiang, M. H., Tzeng, S. C., Fu, C. Y., Cheng, A., Wang, Y. C., & Lee, Y. T. (2021). Chitosan-based hydrogels to treat hydrofluoric acid burns and prevent infection. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(4), 1532– 1544. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01007-3>
- Jaimes Castillo, M. Y., Quiroz Bornachera, M. E., & Seguanes Díaz, C. (2019). Impacto del alto costo relacionado con la diabetes Mellitus en el sistema de salud en Colombia. *REDIIS / Revista De Investigación E Innovación En Salud*, 2, 82–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.23850/rediis.v2i0.2079>
- Jiang, Q., zhou, W., Wang, J., Tang, R., Zhang, D., & Wang, X. (2016). Hypromellose succinate-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.077>
- Kaczmarek-Szczepanska, B., Mazur, O., Michalska-Sionkowska, M., Łukowicz, K., & Osyczka, A. M. (2021). The Preparation and Characterization of Chitosan-Based Hydrogels Cross-Linked by Glyoxal. *Materials*, 14(9), 2449. <https://doi.org/10.1021/ja01548a040>
- Karimi, A. R., Rostaminejad, B., Rahimi, L., Khodadadi, A., Khanmohammadi, H., & Shahriari, A. (2018). Chitosan hydrogels cross-linked with tris(2-(2-formylphenoxy)ethyl)amine: Swelling and drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1863– 1870. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.037>
- Karri, V. V. S. R., Kuppusamy, G., Talluri, S. V., Mannemala, S. S., Kollipara, R., Wadhwani, A. D., Mulukutla, S., Raju, K. R. S., & Malayandi, R. (2016). Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing.

- International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1519–1529.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.038>
- Kaur, K., Paiva, S. S., Caffrey, D., Cavanagh, B. L., & Murphy, C. M. (2021). Injectable chitosan/collagen hydrogels nano-engineered with functionalized single wall carbon nanotubes for minimally invasive applications in bone. *Materials Science and Engineering C*, 128(July), 112340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112340>
- Khan, A., Xu, M., Wang, T., You, C., Wang, X., Ren, H., Zhou, H., Khan, A., Han, C., & Li, P. (2019). Catechol cross-linked antimicrobial peptide hydrogels prevent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in burn wounds. *Bioscience Reports*, 39(6), 1–15. <https://doi.org/10.1042/BSR20190504>
- Khorasani, M. T., Joorabloo, A., Moghaddam, A., Shamsi, H., & MansooriMoghadam, Z. (2018). Incorporation of ZnO nanoparticles into heparinised polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for wound dressing application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114(2017), 1203–1215. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.010>
- Liang, Y., Chen, B., Li, M., He, J., Yin, Z., & Guo, B. (2020). Injectable Antimicrobial Conductive Hydrogels for Wound Disinfection and Infectious Wound Healing. *Biomacromolecules*, 21(5), 1841–1852. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01732>
- Masood, N., Ahmed, R., Tariq, M., Ahmed, Z., Masoud, M. S., Ali, I., Asghar, R., Andleeb, A., & Hasan, A. (2019). Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, 559(January), 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.019>
- Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., & Ostafe, V. (2019). Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action.

- International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 1–33.
<https://doi.org/10.3390/ijms20235889>
- Mozalewska, W., Czechowska-Biskup, R., Olejnik, A. K., Wach, R. A., Ulański, P., & Rosiak, J. M. (2017). Chitosan-containing hydrogel wound dressings prepared by radiation technique. *Radiation Physics and Chemistry*, 134, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.01.003>
- Nezhad-Mokhtari, P., Akrami-Hasan-Kohal, M., & Ghorbani, M. (2020). An injectable chitosan-based hydrogel scaffold containing gold nanoparticles for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 198–205.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.112>
- Okonkwo, U. A., & Dipietro, L. A. (2017). Diabetes and wound angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms18071419>
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Informe mundial sobre diabetes. *World Health Organization*, 4.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204877/WHO_NMH_NVI_16.3_spa.pdf;jsessionid=F6F834092FB938B2DE9F6B2B743E0247?sequence=1
- Özkahraman, B., Tamahkar, E., İdil, N., Kılıç Suloglu, A., & Perçin, I. (2021). Evaluation of hyaluronic acid nanoparticle embedded chitosan–gelatin hydrogels for antibiotic release. *Drug Development Research*, 82(2), 241–250. <https://doi.org/10.1002/ddr.21747>
- Pan, W., Qi, X., Xiang, Y., You, S., Cai, E., Gao, T., Tong, X., Hu, R., Shen, J., & Deng, H. (2022). Facile formation of injectable quaternized chitosan/tannic acid hydrogels with antibacterial and ROS scavenging capabilities for diabetic wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 195 (November 2021), 190–197.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.007>

- Patel, S., Srivastava, S., Singh, M. R., & Singh, D. (2019). Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *112*(October 2018), 108615. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108615>
- Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G., & Jordan, O. (2015). Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *97*, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>
- Qianqian, O., Songzhi, K., Yongmei, H., Xianghong, J., Sidong, L., Puwang, L., & Hui, L. (2021). Preparation of nano-hydroxyapatite/chitosan/tilapia skin peptides hydrogels and its burn wound treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, *181*, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.085>
- Qu, J., Zhao, X., Liang, Y., Zhang, T., Ma, P. X., & Guo, B. (2018). Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. *Biomaterials*, *183*(July), 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.044>
- Ravishankar, K., Venkatesan, M., Desingh, R. P., Mahalingam, A., Sadhasivam, B., Subramaniam, R., & Dhamodharan, R. (2019). Biocompatible hydrogels of chitosan-alkali lignin for potential wound healing applications. *Materials Science and Engineering C*, *102*(January), 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.038>
- Sapru, S., Das, S., Mandal, M., Ghosh, A. K., & Kundu, S. C. (2021). Sericin-chitosan-glycosaminoglycans hydrogels incorporated with growth factors for in vitro and in vivo skin repair. *Carbohydrate Polymers*, *258* (December 2020), 117717. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117717>

- Shamloo, A., Aghababaie, Z., Afjoul, H., Jami, M., Razaghzadeh, M., Vossoughi, M., & Ramazani, A. (2021). Fabrication and evaluation of chitosan / gelatin / PVA hydrogel incorporating honey for wound healing applications: An in vitro , in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, 592 (July 2020), 120068. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120068>
- Shariatinia, Z., & Jalali, A. M. (2018). Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 194–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.034>
- Shi, Q., Qian, Z., Liu, D., Sun, J., Wang, X., Liu, H., Xu, J., & Guo, X. (2017). GMSC-derived exosomes combined with a chitosan/silk hydrogel sponge accelerates wound healing in a diabetic rat skin defect model. *Frontiers in Physiology*, 8(NOV), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00904>
- Singh, S., Young, A., & McNaught, C. E. (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (United Kingdom)*, 35(9), 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.004>
- Suflet, D. M., Popescu, I., Pelin, I. M., Ichim, D. L., Daraba, O. M., Constantin, M., & Fundueanu, G. (2021). Dual cross-linked chitosan/pva hydrogels containing silver nanoparticles with antimicrobial properties. *Pharmaceutics*, 13(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091461>
- Tian, B., Hua, S., Tian, Y., & Liu, J. (2020). Chemical and physical chitosan hydrogels as prospective carriers for drug delivery: A review. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(44), 10050–10064. <https://doi.org/10.1039/d0tb01869d>
- Wang, P., Huang, B., Horng, H., & Yeh, C. (2018). ScienceDirect Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>

- Xu, H., Zhang, L., Zhang, H., Luo, J., & Gao, X. (2021). Green Fabrication of Chitin/Chitosan Composite Hydrogels and Their Potential Applications. *Macromolecular Bioscience*, 21(3), 1–8. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000389>
- Xue, H., Hu, L., Xiong, Y., Zhu, X., Wei, C., & Cao, F. (2019). Quaternized chitosan-Matrigel-polyacrylamide hydrogels as wound dressing for wound repair and regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 226(July), 115302. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115302>
- Yang, Y., Campbell Ritchie, A., & Everitt, N. M. (2021). Recombinant human collagen/chitosan-based soft hydrogels as biomaterials for soft tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 121(July 2020), 111846. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111846>
- Zhang, D., Zhou, W., Wei, B., Wang, X., Tang, R., Nie, J., & Wang, J. (2015). Carboxyl-modified poly(vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 125, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.034>
- Zhang, Y., Jiang, M., Zhang, Y., Cao, Q., Wang, X., Han, Y., Sun, G., Li, Y., & Zhou, J. (2019). Novel lignin–chitosan–PVA composite hydrogel for wound dressing. *Materials Science and Engineering C*, 104 (October 2018), 110002. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110002>