Encapsulamiento de células beta pancreáticas en una matriz a base de Alginato y Óxido de Grafeno con potencial aplicación en el tratamiento de diabetes

Angie Viviana Rodríguez Sanabria y María Camila Velásquez Rincón

Trabajo de Grado para Optar el Título de Ingeniera Metalúrgica

Directora:

Natalia Rocío Moreno Castellanos

Dra. en Ciencias Básicas Biomédicas

Codirector:

Oscar Andrés Vargas Ceballos

Dr. en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales

Bucaramanga

2022

Agradecimientos

Queremos dar un agradecimiento muy especial a nuestra directora de tesis Natalia Moreno, por su apoyo y entrega en este proyecto, de la misma forma agradecemos al profesor Oscar Andrés Vargas, quien fue nuestro codirector y a quien durante el transcurso de nuestra carrera vimos como un mentor, un guía, e incluso un consejero en días de dificultad académica, a los diferentes grupos de investigación y laboratorios centrales quienes nos abrieron sus puertas y brindaron su apoyo para realizar todo el proceso experimental durante este proyecto de grado, al Grupo de Investigación en Corrosión (GIC), al Grupo de Investigación en Polímeros, al Laboratorio de Metabolismo, al Laboratorio de Pirometalurgia, al Laboratorio de Microscopía – Guatiguará y al Laboratorio de Espectroscopía.

Seguidamente queremos brindarle un agradecimiento sumamente especial a Andrey Jiménez, a Katherin Bonilla y a Elías Cuartas, porque con su amabilidad y sabiduría nos instruyeron, e hicieron posible que realizáramos con éxito nuestra tesis, a ellos mil y mil gracias.

Angie Viviana Y María Camila

Durante este proyecto de grado y en general durante toda mi carrera universitaria vi siempre la mano de Dios obrando a mi favor, así que quiero brindarle mi mayor agradecimiento a mi Padre celestial por tantísima bondad y amor, a su hijo Jesucristo porque sin él nada hubiera sido posible y por supuesto a mi compañero incondicional el Espíritu Santo, sea siempre la honra y la gloria de todas mis metas para Dios.

Seguidamente quiero agradecer a mis padres Ludwing y Ruth, y a mi hermano Juan David, porque han sido mi motor, mi guía, mi inspiración y la razón para entregarles lo mejor de mí, agradezco igualmente a mi amor Felipe, porque siempre estuvo a mi lado durante todo este proceso y su compañía fue fundamental para alcanzar este logro, este proyecto y culminación de mi pregrado han sido logrados con éxito gracias al amor y esfuerzo de ellos, asimismo, agradezco a toda mi familia, a mis nonos, a mis tíos y a mis primos.

Continúo agradeciendo a esos amigos que me regaló Dios en esta maravillosa travesía, a Cami, quien fue mi primera amiga y mi compañera de proyecto, a Angie Quitian, a Laura Gamboa, a Danna Margarita, a Camilo Romero, a Michael Romero, a Darwin parra, a mis amigas de toda la vida Silvia y Daniela, a la comunidad CRU por el trabajo tan maravilloso que hacen con los universitarios al llevar la buena noticia de Jesús y del cual fui parte unos semestres y a Paula Correa quien me dirigió en ese servicio tan enriquecedor.

También agradezco a la iglesia MECAL y a aquellas personas que han estado para mi incondicionalmente, a mi pastor William, a mi Johanita a Rolandito, a Arnul, a Jenycita, a Brayan, a Esme, a Juanda, a Gerson, a Hugo, al Pas Jose, a Alfonso, a Julian Martínez y a todo el ministerio de jóvenes, porque su respaldo espiritual lo he evidenciado en el transcurrir de mi vida.

Finalmente, un agradecimiento a todos los profesores, técnicos y tutores, que hicieron parte de mi proceso formativo, a Patty y a todas las personas que de una u otra forma tuve la oportunidad de conocer y dejaron una enseñanza en mí que hoy guardo en mi corazón.

“En realidad, todo fue creado por Dios; todo existe por él y para él. Así que, ¡demos gracias a Dios por siempre!” Rom. 11:36

Angie Viviana Rodriguez Sanabria

Quiero agradecer primeramente a Dios, por guiarme e instruirme de la mejor manera durante el transcurso de mi carrera universitaria, regalándome la fortaleza necesaria para afrontar cada situación que se me presentaba en el camino.

Seguidamente agradezco a mis padres Alirio y Gladis, quienes son el motor de mi vida y que con su amor, apoyo y esfuerzo hicieron posible la culminación de mi ciclo académico, también agradezco a mi hermano Yeixon, por motivarme y ser mi consejero en días de dificultad.

A mi compañera de tesis y amiga del alma Viviana, por su amistad, apoyo y entrega en este proyecto. A los amigos que me regaló Dios durante todo este tiempo, Laura, Eliana, Valentina, Angie, Keyner, Deiby y Gustavo, quienes con su compañía hicieron que mi camino por la universidad fuera más enriquecedor.

Finalmente agradezco a todos los profesores y técnicos que estuvieron presentes en este proceso formativo, brindándome las herramientas necesarias para convertirme en una profesional íntegra al servicio de la sociedad.

María Camila Velásquez Rincón

Contenido

Pág.

Introducción 14

1. Objetivos 16

1.1 Objetivo General 16

1.2 Objetivos Específicos 16

2. Marco Teórico 17

2.1 Aspectos generales sobre la diabetes 17

2.1.1 Funciones dentro del páncreas 17

2.1.2 Células Beta pancreáticas 17

2.1.3 Diabetes 17

2.2 Avances en la ingeniería biomédica 18

2.2.1 Encapsulación celular 18

2.3 Biomateriales para la fabricación de la cápsula 19

2.3.1 Alginato 19

2.3.2 Óxido de grafeno 20

3. Metodología Experimental 21

3.1 Fabricación del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno 21

3.1.1. Preparación de solución de Alginato 21

3.1.2 Síntesis de óxido de grafeno 22

3.1.3 Hidrogel de alginato y óxido de grafeno 23

3.1.4 Encapsulación de las células beta pancreáticas.....24

3.2 Caracterización fisicoquímica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno.....24

3.2.1 Análisis elemental 24

3.2.2 Análisis de contenido de cenizas.....25

3.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....25

3.2.4 Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) 25

3.2.5 Espectroscopía Raman.....26

3.2.6 Análisis termogravimétrico (TGA) 26

3.2.7 Hinchamiento.....27

3.2.8 Degradación 27

3.2.9 Análisis Reológico 28

3.3 Caracterización mecánica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno 29

3.3.1 Ensayo de análisis dinámico mecánico (DMA).....29

3.4 Caracterización biológica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno 29

3.4.1 Ensayo de viabilidad celular (MTT) 29

3.4.2 Ensayo de citotoxicidad (Live/Dead) 30

3.4.3 Ensayo de proliferación celular (PicoGreen).....31

3.4.4 Análisis estadístico 31

4. Resultados y Discusión.....32

4.1 Resultados de la caracterización fisicoquímica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno 32

4.1.1 Análisis elemental 32

4.1.2 Análisis de cenizas 32

4.1.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....33

4.1.6 Espectroscopía Raman.....36

4.1.7 Análisis termogravimétrico (TGA) 37

4.1.8 Hinchamiento 38

4.1.9 Degradación 39

4.1.10 Análisis Reológico.....40

4.2 Resultados de la caracterización mecánica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno 42

4.2.1 Ensayo DMA.....42

4.3 Resultados de la caracterización biológica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno 43

4.3.1 Ensayo de viabilidad celular (MTT) 43

4.3.2 Ensayo de citotoxicidad (Live/Dead) 44

4.3.3 Ensayo de proliferación celular (PicoGreen) 46

5. Conclusiones 47

Referencias Bibliográficas.....49

Apéndices 56

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1. Esquema del proceso de preparación de la solución de alginato 21

Figura 2. Esquema del proceso de síntesis del GO a partir de grafito. 22

Figura 3. Esquema del proceso de preparación de los hidrogeles AL 1,87%, ALGO10, ALGO 25 y ALGO 50.....23

Figura 4. Micrografías (SEM) de los Hidrogeles: (a) AL 1,87%, (b) ALGO 10, (c) ALGO 25 y (d) ALGO 50.....34

Figura 5. Espectros FTIR de GO, alginato de sodio puro, hidrogeles de AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50.....35

Figura 6. Espectros Raman de GO.....36

Figura 7. Termograma de los hidrogeles de alginato con diferentes concentraciones de GO. 37

Figura 8. Termograma del GO.....38

Figura 9. (a)Barrido de amplitud y (b) barrido de frecuencia para el análisis reológico de los hidrogeles AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50. 40

Figura 10. Curvas Esfuerzo vs Deformación obtenidas en el ensayo de compresión correspondiente a los hidrogeles AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50.....42

Figura 11. Porcentajes de viabilidad celular del Control, AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50. Los datos se presentan % Viabilidad Celular.....44

Figura 12. Micrografías (Objetivo 4X) del ensayo de citotoxicidad Live/Dead para las diferentes concentraciones: (a) AL 1.87%, (b) ALGO 10, (c) ALGO 25, (d) ALGO 50, (e) Control de células vivas, (f) Control de células muertas. 45

Figura 13. Porcentajes de proliferación celular del Control, AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50. Los datos se presentan % Proliferación celular Vs Control (100%) 46

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 1. Resultado del análisis elemental realizado al GO. 32

Tabla 2. Porcentajes de hinchamiento de los hidrogeles AL 1,87% y ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50. 38

Tabla 3. Porcentajes de degradación de los hidrogeles de AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50. 39

Lista de Apéndices

Pág.

Apéndice A. Células BRIN-BD11 56

Resumen

Título: Encapsulamiento de células beta pancreáticas en una matriz a base de alginato y óxido de grafeno con potencial aplicación en el tratamiento de diabetes [*]

Autor: Angie Viviana Rodriguez Sanabria, María Camila Velásquez Rincón[**].

Palabras Clave: Encapsulación celular, Hidrogel, Alginato, Insulina, Óxido de grafeno.

Descripción: En el presente trabajo se buscó sintetizar y caracterizar un hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno mediante gelificación iónica, para encapsular células beta pancreáticas BRIN BD11, con el fin de simular un ambiente apropiado para el crecimiento y proliferación celular, con potencial aplicación para el tratamiento de diabetes tipo 1.
Se estudió la influencia del GO a tres concentraciones diferentes (10, 25 y 50 µg/mL) dentro de la matriz de alginato (ALGO10, ALGO25 y ALGO50). En el proceso de caracterización se emplearon diferentes tecnologías para analizar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas de los hidrogeles. Los resultados de este estudio mostraron a través del SEM que al aumentar el contenido de GO en los hidrogeles, se presentó mayor rigidez y grosor en la superficie, con uniformidad de las hojuelas de GO, evidenciando la correcta incorporación del mismo a la matriz de alginato. Adicionalmente, se determinó que los hidrogeles ALGO25 y ALGO50 presentaron mayor entrecruzamiento, dando como resultado una estructura más compacta, menos hinchada y con menor tasa de degradación. Por otro lado, se observó a través del DMA que al adicionarle GO hubo un aumento significativo en el módulo de elasticidad para los hidrogeles ALGO25 y ALGO50 (0.0055 y 0.0056 MPa), esto es debido a que se formaron enlaces que reforzaron la matriz polimérica, presentando un comportamiento elástico similar al del páncreas. En cuanto a las propiedades biológicas se presentaron resultados favorables con el aumento del contenido de GO, ya que su viabilidad fue de 143,61 y 199,67% para los hidrogeles ALGO25 y ALGO50, respectivamente. Siendo el hidrogel ALGO25 el candidato potencial para la encapsulación celular ya que obtuvo mejores resultados en cuanto a citotoxicidad y proliferación de las células BRIN BD11. Este estudio permite tener un punto de partida para investigaciones futuras en el área de biomateriales.

[*] Trabajo de Grado

[**] Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales. Directora: Natalia Rocío Moreno Castellanos. Doctora en Biomedicina. Codirector: Oscar Andrés Vargas Ceballos. Doctor en Química.

Abstract

Title: Encapsulation of beta pancreatic cells in a matrix based on alginate and graphene oxide with potential application in the treatment of diabetes[*].

Author: Angie Viviana Rodriguez Sanabria, Maria Camila Velasquez Rincon[**].

Key Words: Cell encapsulation, Hydrogel, Alginate, Insulin, Graphene oxide.

Description: In the present work we sought to synthesize and characterize a hydrogel based on alginate and graphene oxide by ionic gelification, to encapsulate pancreatic beta cells BRIN BD11, in order to simulate an appropriate environment for cell growth and proliferation, with potential application for the treatment of type 1 diabetes.
The influence of GO was studied at three different concentrations (10, 25 and 50 µg/mL) within the alginate matrix (ALGO10, ALGO25 and ALGO50). Different technologies were used in the characterization process to analyze the physico-chemical, mechanical and biological properties of the hydrogels. The results of this study showed through the SEM that by increasing the GO content in the hydrogels, greater rigidity and thickness was presented on the surface, with uniformity of the GO leaflets, evidencing the correct incorporation of the same to the alginate matrix, In addition, it was determined that the hydrogels ALGO25 and ALGO50 showed a greater cross-linking, resulting in a more compact structure, less swollen and with a lower rate of degradation. On the other hand, it was observed through the DMA that when adding GO there was a significant increase in the modulus of elasticity for the hydrogels ALGO25 and ALGO50 (0.0055 and 0.0056 MPa), this is because bonds were formed that reinforced the polymer matrix, showing an elastic behavior similar to that of the pancreas. Regarding biological properties, favorable results were presented with the increase in GO content, since its viability was 143.61 and 199.67% for the hydrogels ALGO25 and ALGO50, respectively. The ALGO25 hydrogel was the potential candidate for cell encapsulation as it obtained better results in terms of cytotoxicity and proliferation of BRIN BD11 cells. This study provides a starting point for future research in the area of biomaterials.

[*] Degree Work

[**] Faculty of Physicochemical Engineering. School of Metallurgical Engineering and Materials Science. Director: Natalia Rocío Moreno Castellanos. Doctor of Biomedical. Co-director: Oscar Andrés Vargas Ceballos. Doctor of Chemical.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que abarca múltiples padecimientos crónico-degenerativos, la cual se caracteriza por incrementar los niveles de glucosa en la sangre y se clasifica en diabetes tipo I y tipo II. En 1980 la organización mundial de la salud (OMS) calculó que alrededor de 108 millones de adultos padecían diabetes, un valor que ha ido aumentando vertiginosamente con el paso de los años, ya que para el 2014 fueron reportados 422 millones de adultos con esta enfermedad y se estima que para el 2030 alrededor de 578 millones de personas la padezcan, lo cual constituye un serio problema de salud pública mundial (World Health Organization, 2016).

En la actualidad, se han desarrollado diversas investigaciones enfocadas en el encapsulamiento de células beta, con el fin de reemplazar las células afectadas en pacientes con DM tipo 1 (Arifin et al., 2019). Este tratamiento de microencapsulación se ha implementado en roedores y primates diabéticos logrando restaurar con éxito la normoglucemia e incluso reducir los requisitos de insulina sin necesidad de emplear fármacos inmunosupresores. No obstante, se identificó la necesidad de un mayor desarrollo en los materiales usados en la fabricación de cápsulas, debido a las limitaciones presentadas en hidrogeles comúnmente utilizados, como lo es el caso del alginato (Orive et al., 2018).

Los hidrogeles fabricados a base de alginato presentan propiedades mecánicas bajas con respecto a los requerimientos para su aplicación, por lo que es necesario reforzarlos con otros materiales (Serrano Aroca et al.,2018), puesto que las microcápsulas deben ser lo suficientemente resistentes al medio en el cual son injertadas y a las fuerzas de cizallamiento generadas en el trasplante (Arifin et al 2019). Por lo anteriormente expuesto, este trabajo de investigación propone

sintetizar un hidrogel a base de alginato con adición de óxido de grafeno (GO) debido a que podría mejorar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas del biomaterial, ya que el GO es un material biocompatible, no tóxico y con excelentes propiedades físicas (Zhao et al 2014), que ha dado lugar a numerosas aplicaciones en el campo de los biomateriales, ingeniería de tejidos y en biomedicina (Wang et al.,2014).

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Desarrollar un hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno para encapsular células productoras de insulina.

1.2 Objetivos Específicos

Sintetizar un hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno para la encapsulación de células productoras de insulina.

Caracterizar las propiedades fisicoquímicas, microestructurales y mecánicas del biomaterial desarrollado.

Evaluar la viabilidad y proliferación celular en los hidrogeles fabricados.

2. Marco Teórico

2.1 Aspectos generales sobre la diabetes

2.1.1 Funciones dentro del páncreas

El páncreas es un órgano de forma alargada, situado en la cavidad abdominal, posterior en el abdomen y cercano al hígado. Este órgano tiene dos funciones principales, la primera de ellas es la función exocrina, cuando los alimentos ingresan al estómago, las glándulas exocrinas liberan enzimas dentro de un sistema de conductos que llegan al conducto pancreático principal, las cuales ayudan en el proceso de digestión de las grasas, los carbohidratos y las proteínas provenientes de los alimentos. Por otro lado, la segunda función del páncreas es la función endocrina conocida por la generación de hormonas como el glucagón, la insulina, la somatostatina y el polipéptido pancreático, siendo las dos primeras, las principales para mantener el nivel adecuado de glucosa en la sangre y la homeostasis fisiológica (Pancreatic Cancer Action Network, 2017).

2.1.2 Células Beta pancreáticas

Dentro del páncreas endocrino existen agregados celulares llamados islotes de Langerhans, que contienen cuatro tipos principales de células, las cuales son: Células productoras de insulina (células β), células productoras de glucagón (células α), células productoras de somatostatina (células δ) y células productoras del polipéptido pancreático (PP), cada una con diferentes características ultraestructurales, contenido hormonal y función definida (Elizondo & Mendoza, 2018).

2.1.3 Diabetes

En el páncreas suelen ocurrir alteraciones que provocan dos trastornos: diabetes mellitus (DM) y carcinoma endocrino pancreático, siendo la DM la de mayor presencia en gran parte de

los casos. Esta enfermedad se clasifica en dos tipos mayoritarios: diabetes tipo 1 (DM1), que es el resultado de la destrucción autoinmune de las células beta productoras de insulina en el páncreas y diabetes tipo 2 (DM2), la cual consiste en la resistencia periférica a la acción de la insulina y de respuesta secretora inadecuada por las células pancreáticas. Es importante notar que, ambos tipos de diabetes tienen mecanismos fisiopatológicos diferentes, pero en el desarrollo de este proyecto se le dará mayor enfoque a la DM1, ya que los pacientes que la presentan, son dependientes de la insulina en la mayoría de los casos a temprana edad, principalmente porque en ausencia de insulina ocurren graves complicaciones metabólicas agudas (cetoacidosis diabética (CAD), el síndrome hiperglucémico hiperosmolar (SHH) y la hipoglucemia iatrogénica) que pueden llevar a la mortalidad y morbilidad significativa (Chawla, 2011), esto ocurre una vez se haya destruido más del 90% de las células β, las cuales son consideradas extrañas por el organismo en el desarrollo de la fisiopatología (Elizondo & Mendoza, 2018).

2.2 Avances en la ingeniería biomédica

2.2.1 Encapsulación celular

En los últimos años, se han realizado múltiples intentos para prevenir el rechazo de las células trasplantadas por parte del sistema inmunológico en pacientes con DM1, siendo la encapsulación celular una opción prometedora en la bioingeniería y un gran avance en la ciencia de los materiales. Esta tecnología implica colocar las células trasplantadas dentro de una membrana biocompatible en un intento de aislar las células del ataque inmune del huésped y mejorar o prolongar su función in vivo (Lim et al., 2010).

En términos más específicos, la encapsulación celular implica contener células individuales o en grupo, dentro de una membrana polimérica semipermeable. La membrana permite la difusión de nutrientes esenciales como la glucosa y la insulina para el caso de la DM,

al mismo tiempo que restringen la difusión de moléculas inmunológicas más grandes (Orive et al., 2014).

Las células se pueden encapsular en dos geometrías distintas, denominadas macro y microcápsulas. En las macrocápsulas las células son inmovilizadas en un dispositivo relativamente grande en los que el transporte de solutos depende de la difusión o la convección, mientras que, en las microcápsulas, las células están atrapadas dentro de un polímero típicamente esférico a base de hidrogel, logrando el objetivo de liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas (Orive et al., 2018), las partículas que tengan un tamaño entre 1 a 1000 µm son consideradas microcápsulas, aunque algunos autores extienden el tamaño hasta 5000 µm (Garcia, 2019). Estos hidrogeles son sistemas coloidales compuestos por uno o varios polímeros hidrófilos cuyas cadenas están entrecruzadas por uniones físicas o químicas formando redes tridimensionales, los cuales se caracterizan por su capacidad de captación y retención de fluidos acuosos del medio que los rodea, con una capacidad de hinchamiento que les permite hidratarse hasta el equilibrio como un balance entre hidratación y fuerzas elásticas (Martínez Martínez, 2016). Los hidrogeles basados en polímeros naturales brindan diferentes ventajas de biocompatibilidad, biodegradabilidad y reconocimiento biológico celular, en comparación a los polímeros sintéticos (Martínez Martínez, 2016).

2.3 Biomateriales para la fabricación de la cápsula

2.3.1 Alginato

Es un polímero natural derivado del ácido algínico de estructura lineal, destacado por sus propiedades gelificantes, conformado por ácido alfa-L-gulurónico y ácido beta-D-manurónico. Además, al ser preparado en forma de hidrogel es utilizado en la elaboración de microcápsulas esféricas para sistemas de liberación de fármacos, macromoléculas o células, cuya matriz de gel

aporta resistencia mecánica, rigidez y flexibilidad (Díaz Benito, 2019). Este polímero es biocompatible, no tóxico y cuenta con diferentes propiedades fisicoquímicas (alta solubilidad, capacidad de retención de agua, formación de películas, propiedades gelificantes, y por último viscosidad y rigidez que dependen de factores como peso molecular, concentración, temperatura, pH y fuerza iónica.) que lo hacen adecuado para distintos tipos de aplicaciones biológicas (Elizondo & Mendoza, 2018), debido a que presenta una estructura similar a la matriz extracelular creando un microambiente húmedo. Su proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes (excepto el magnesio), de los cuales el ion calcio es el más empleado, ya que, al difundirse en la solución de sal de alginato hasta unirse a la cadena polimérica, ocasiona un reordenamiento estructural, lo cual da como resultado un material sólido (Kaklamani G et al., 2014). Cuya preparación normalmente es en frio a diferencia de otros polisacáridos gelificantes (Díaz Benito, 2019).

2.3.2 Óxido de grafeno

Se denomina óxido de grafeno (GO) a las láminas exfoliadas monomoleculares, producto de la dispersión del óxido de grafito en un medio ácido. El método típico de síntesis de GO fue desarrollado por Hummers y colaboradores. Este material contiene grupos funcionales hidroxilos, carbonilos y epoxi. La presencia de oxígeno en los bordes y planos basales de GO aumenta su hidrofilidad y mejora su dispersabilidad en agua en comparación con el grafeno (Jalaja et al., 2016).

Este nanomaterial bidimensional es bastante atractivo, debido a sus excelentes propiedades físicas, como lo es su módulo de elasticidad promedio de 32 GPa y esfuerzo último a la fractura de 120 Mpa (Zhu et al., 2010), además presenta alta relación superficie/volumen, gran facilidad de dispersarse, tanto en agua como en solventes orgánicos, así como su biocompatibilidad y no

toxicidad, lo cual le ha permitido ser utilizado en diversas aplicaciones prometedoras en la biomedicina, especialmente para la funcionalización de un hidrogel, con propiedades mecánicas y térmicas superiores, en donde dependiendo del método de mezcla se puede llegar a obtener una mejora significativa del módulo de compresión y la difusividad agregándole pequeñas cantidades de GO al hidrogel (Serrano-Aroca et al., 2018)..

3. Metodología Experimental

Para cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo de investigación, se realizaron las siguientes etapas:

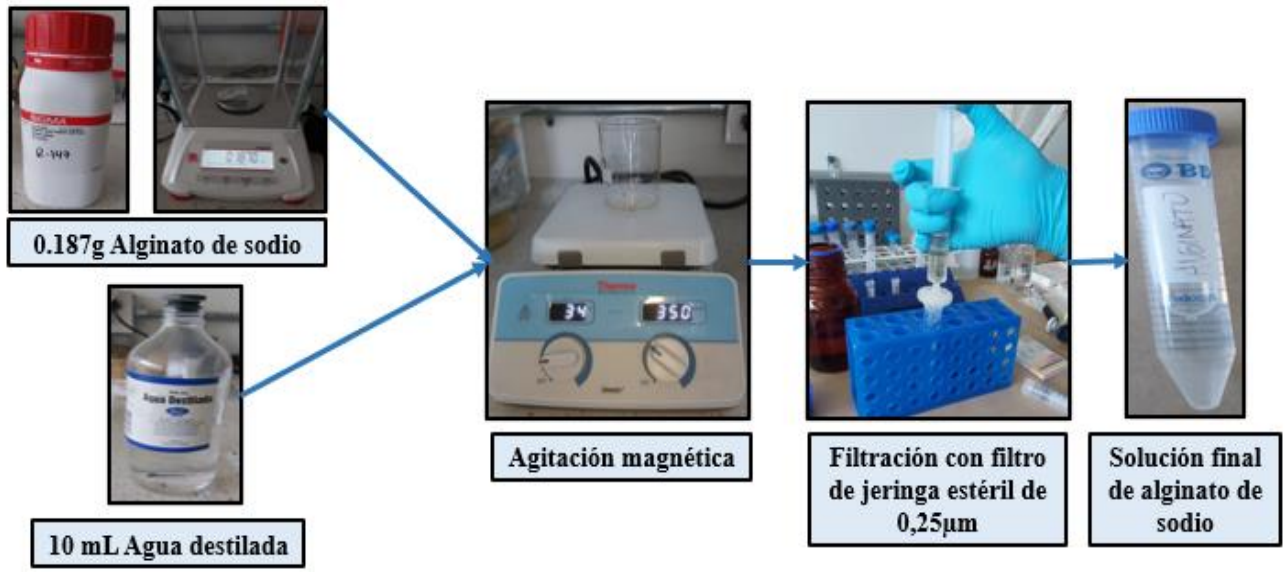
3.1 Fabricación del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno

3.1.1. Preparación de solución de Alginato

Se preparó una solución de alginato al 1,87% (p/v) en agua destilada a temperatura de 35 a 40°C aproximadamente, en agitación magnética a 350 rpm y posterior filtración. Finalmente se midió el pH hasta alcanzar un rango de 7.0-7.4.

Figura 1.

Esquema del proceso de preparación de la solución de alginato



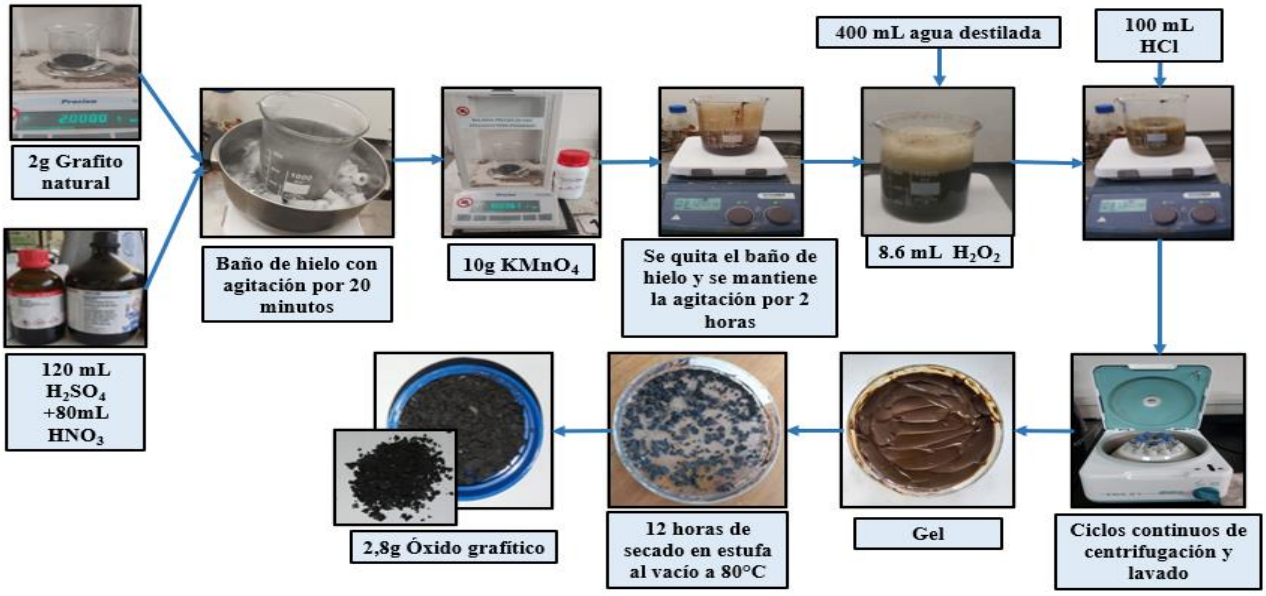
3.1.2 Síntesis de óxido de grafeno

El óxido de grafeno (GO) se sintetizó mediante el método de Hummers modificado (Vargas, O., 2013). Para realizar la síntesis, se agregó en un vaso de precipitados de 1 L, 2 g de grafito natural, 120 mL de H_2SO_4 (98%) y 80 mL de HNO_3 (65%). La suspensión se mantuvo en un baño de hielo con agitación durante 20 minutos. Pasado este tiempo se agregó el oxidante, 10g de $KMnO_4$, en pequeñas porciones. Una vez terminado, se retiró el baño de hielo y se mantuvo la agitación durante 2 horas. Se añadieron 400 mL de agua destilada. Luego se agregó 8.6 mL de H_2O_2. Cuando la temperatura de la suspensión descendió, se agregaron 100 mL de disolución acuosa (10 %) de HCl a la mezcla.

Mediante continuos ciclos de centrifugación y lavado con agua destilada se retiraron las especies disueltas hasta que el residuo obtuvo un pH neutro. El material decantado en los tubos de la centrifugadora pasó a pH ácido. Finalmente, se obtuvo el óxido grafitico (cerca de 2.8 g) al secar el gel durante 12 horas a 80 ºC en una estufa de vacío como se ha descrito previamente.

Figura 2.

Esquema del proceso de síntesis del GO a partir de grafito.



3.1.3 Hidrogel de alginato y óxido de grafeno

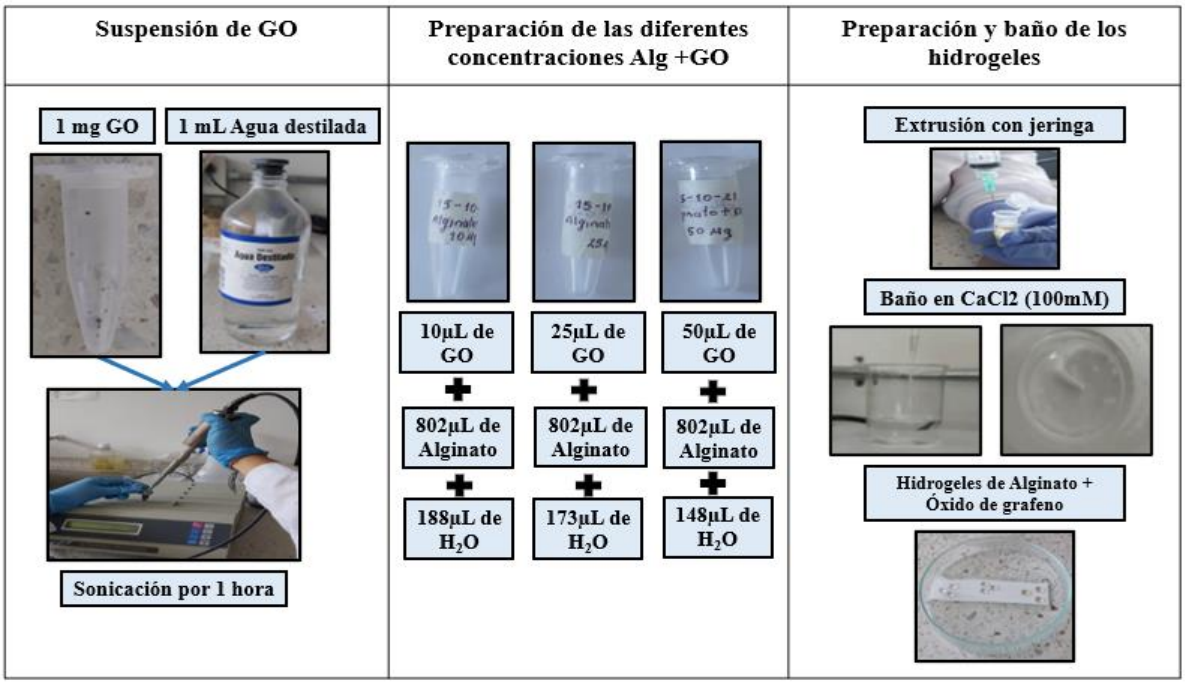
Una vez obtenida la solución de alginato al 1,87% (p/v), se realizó la suspensión de óxido de grafeno a una concentración de 1mg/mL seguido de sonicación.

Para preparar los hidrogeles de alginato y GO se realizaron diferentes diluciones con el fin de evaluar varias concentraciones de GO en solución de alginato al 1,5%. Se evaluaron las concentraciones de GO 10 µg/mL; 25 µg/mL y 50 µg/mL.

Una vez se obtuvieron las mezclas de las soluciones de alginato y GO, se extruyeron y se ajustó el pH en el rango 7.0-7.4. Finalmente, para favorecer la gelificación iónica de las perlas resultantes de alginato y GO (AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50), se pusieron en contacto en una solución de $CaCl_2$ (100mM) en agitación a 230 rpm durante 15 minutos.

Figura 3.

Esquema del proceso de preparación de los hidrogeles AL 1,87%, ALGO10, ALGO25 y ALGO 50



3.1.4 Encapsulación de las células beta pancreáticas

Inicialmente, las células BRIN-BD11 (Apéndice A) fueron cultivadas a una densidad de 2000 células /cm^2 en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino 10 % (v/v), antibiótico/antimicóticos 100IU/ml a 37°C en una atmósfera de 5% de CO2 tras confluencia y para realización del ensayo, las células fueron levantadas empleando 0,25% de tripsina-EDTA y se suspendieron en las soluciones previamente realizadas de alginato y GO. La gelificación iónica, mediante el método de extrusión fue el mecanismo utilizado para la encapsulación celular, el cual consistió en producir pequeñas gotas de material por medio de una pipeta y éstas caían en un baño de iones calcio formando así una cápsula de gel (Ortiz et al., 2021), cuyo diámetro final fue de 4mm aproximadamente. Como controles, se realizó la suspensión de las células BRIN-BD11 en la matriz de alginato y GO encapsuladas y sin encapsular, asimismo se suspendieron en una solución de alginato sin GO, para evaluar el aporte de este último a la matriz.

3.2 Caracterización fisicoquímica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno

3.2.1 Análisis elemental

Para evaluar la pureza y composición química del GO se realizó la técnica de análisis elemental, con el fin de determinar el contenido total de carbono (C), hidrogeno (H), nitrógeno (N) y oxígeno (O) presentes en la muestra sólida, esta técnica consistió en la oxidación completa del óxido de grafeno mediante la combustión con oxígeno puro, la cual genera gases compuestos uniformes de C, H, N y diferentes productos de combustión CO_2, H_2O y N_2, (STTI, 2021). se utilizó un SDCHN435 Carbon Hydrogen & Nitrogen Analyzer, Con un tiempo de análisis por muestra ≤5 minutos, y un consumo de helio de 0.7 L/min.

3.2.2 Análisis de contenido de cenizas

Para determinar la cantidad de impurezas presentes en el óxido de grafeno se procedió a pesar el remanente de carbón o coque quemado de la muestra en condiciones estrictamente de temperatura, tiempo, atmósfera y especificaciones del equipo.

El ensayo se realizó de la siguiente manera: se pesó 1 g de óxido de grafeno en un crisol de porcelana, se colocó en una mufla fría y se calentó gradualmente hasta una temperatura de 450-500 °C en una hora. Posteriormente se mantuvo 1h más hasta alcanzar una temperatura de 700-750 °C. Una vez culminado el tiempo se extrajo el crisol con la muestra, se dejó enfriar en el desecador y se registró el peso. (NTC 1859).

3.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el objetivo de obtener información de las características morfológica, estructurales y químicas del hidrogel de alginato con GO, se utilizó la técnica de Microscopía electrónica de barrido, la cual es una técnica de caracterización superficial que se fundamenta en el uso de electrones para formar imágenes (Clavijo, 2013). Para esto, se usó el microscopio electrónico QUANTA FEG 650. La toma de imágenes se realizó en ultra vacío con un voltaje de 25 kV, utilizando electrones secundarios (SE) y electrones retrodispersados (BSE), las muestras fueron deshidratadas y recubiertas con oro previamente al ensayo. Para el análisis químico se utilizó el analizador de energía dispersada de rayos X (EDS) con un voltaje de aceleración de 25 kV.

3.2.4 Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Se utilizó la técnica de Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) para estudiar y verificar la incorporación de monómeros a la estructura de hidrogeles, asimismo observar la presencia de los grupos funcionales característicos de cada monómero. El principio

básico de esta técnica se basa en la excitación de grupos moleculares por un haz de luz infrarroja, que genera movimientos vibracionales en los enlaces de la molécula (Carr & Williams, 1997). Para realizar esta técnica se hizo uso del espectrofotómetro infrarrojo CARY 630 FTIR. Los espectros de las muestras fueron tomados a temperatura ambiente en modo transmitancia, realizando 8 barridos dentro de un rango de número de onda de 4000 - 600 cm^{-1}. Las muestras fueron previamente deshidratadas para mejorar la obtención de datos del ensayo.

3.2.5 Espectroscopía Raman

Para determinar el grado de grafitización del GO, se realizó el análisis Raman, que es una técnica fotónica de alta resolución, donde la luz se dispersa por el material al hacer incidir un haz de luz monocromático. Se utilizó un espectrofotómetro LabRAM HR Evolution Raman-HORIBA. Las condiciones de adquisición de los espectros RAMAN de las muestras fueron las siguientes: rango de adquisición de (400-4000) cm^{-1}, rejilla de 600 planos/mm, láser de 532 nm y objetivo de 50X.

3.2.6 Análisis termogravimétrico (TGA)

Para medir la masa del GO dentro de los hidrogeles a diferentes temperaturas se hizo uso del análisis termogravimétrico (TGA), para esto se empleó el analizador Termogravimétrico TGA 5500 (TA Instruments, Inc). Las condiciones bajo las cuales se realizó este ensayo fueron: para el GO un rango de temperatura 0–600 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, con oxígeno y para los hidrogeles AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50, se usó un rango de temperatura de 0-400°C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, con atmósfera de nitrógeno constante.

3.2.7 Hinchamiento

La capacidad de hinchamiento que tienen los hidrogeles permite la determinación de sus propiedades mecánicas, debido a la cantidad de agua que puede absorber en su estructura, dicho proceso comprende dos etapas, en la primera de ellas los grupos hidrofílicos más polares de la matriz son hidratados por las moléculas de agua y en la segunda etapa, las moléculas de agua interaccionan con los grupos funcionales hidrofóbicos de las cadenas (Farahani V, et al., 2010). La cantidad de agua absorbida por un hidrogel depende de la temperatura y la interacción específica entre las moléculas de agua y las cadenas poliméricas.

Experimentalmente, para la determinación del grado de hinchamiento de los hidrogeles, se prepararon 9 muestras para cada condición (AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50), se pesaron inicialmente y se registraron los datos como peso inicial (Pi), luego se introdujeron los hidrogeles en cajas de Petri con 3 mL medio de cultivo para recubrirlos por completo y se incubaron por 7 horas a 37°C, pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo y se secó cada hidrogel con papel filtro para remover su exceso de medio, este peso final se registró como Pf y posteriormente se realizó el cálculo de porcentaje de hinchamiento utilizando la ecuación 1 (Farahani V, et al., 2010).

$$\%Hinchamiento = \frac{(Pf - Pi)}{Pi} x100 \qquad (1)$$

3.2.8 Degradación

La degradación de las muestras se evaluó utilizando la relación de pérdida de peso y se calculó a partir del valor promedio del cambio de peso de 9 muestras por cada condición de hidrogel. La fórmula matemática utilizada para calcular la relación de pérdida de peso de las muestras se proporciona mediante la siguiente ecuación (Huang et al., 2018).

$$\% \, Pérdida \, de \, peso = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (2)$$

Para realizar este ensayo se prepararon los hidrogeles y se tomaron sus pesos iniciales (Pi), posteriormente se introdujeron 9 perlas de cada condición en una caja Petri y se les añadió 3 mL de medio de cultivo a cada una y se mantuvieron en incubación durante 7 horas a 37 °C, seguidamente se les retiró el medio de cultivo y se llevaron nuevamente a estufa donde se dejaron secar por completo. Finalmente se toman los pesos en seco de cada hidrogel (Pf) y se procedió a realizar un análisis estadístico, utilizando la ecuación 2.

3.2.9 Análisis Reológico

Con el objetivo de estudiar las propiedades de flujo y deformación de los hidrogeles, se realizó un análisis reológico, el cual, a través de la deformación de cizalla aplicada permite conocer la respuesta elástica y viscosa de los materiales. Por medio del análisis reológico se puede determinar: Módulo de almacenamiento ($G´$) que está relacionado con la medición de la energía de deformación almacenada en la muestra durante el proceso de cizalla. Esta energía está completamente disponible después de que la carga aplicada es removida y actúa como la fuerza que compensa parcial o totalmente la deformación anterior, y el módulo de pérdida o viscosidad ($G´´$), que es una medición de la energía de deformación utilizada en la muestra durante el proceso de cizalla y se pierde después de que se retira la carga, es decir, es la energía disipada del sistema. (Yan & Pochan, 2010)

Para llevar a cabo los estudios de reología, se utilizó un reómetro MCR 302 ANTON PAR, con platos paralelos de 20 mm de diámetro y un sistema Peltier para el control de la temperatura. Con el objetivo de determinar el módulo de almacenamiento ($G´$) y el módulo de pérdida ($G´´$), se realizaron barridos de amplitud, con una deformación: 0.01-100% y una frecuencia angular de 10 rad/s, y barridos de frecuencia con una deformación: 0.1% para todas las muestras, excepto para

el hidrogel de ALG1,87% que fue de 0.05%, y una frecuencia: 100-0.1 rad/s a una temperatura de 25 °C.

3.3 Caracterización mecánica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno

3.3.1 Ensayo de análisis dinámico mecánico (DMA)

Se realizaron los ensayos de compresión a cada uno de los hidrogeles de AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50, con el fin de determinar su máxima deformación y módulo de Young, esto se llevó a cabo en el equipo DMA Q800, empleando una pre-carga de 0,001 N, una rampa de 0,5 N/min a una temperatura de 37°C. El módulo de Young para cada uno de los hidrogeles ensayados se obtuvo a partir de la pendiente en la región lineal de las curvas tensión-deformación.

3.4 Caracterización biológica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno

3.4.1 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Este método permitió captar el compuesto MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), por medio de la reacción en las mitocondrias de las células vivas, donde se redujo a formazán por la enzima succínica deshidrogenasa mitocondrial (Castro de pardo, 2006) lo cual, permitió el análisis de la cantidad de células vivas presentes en los hidrogeles mediante espectrofotometría, ya que su tonalidad cambió de color amarillo a morado.

Para realizar este ensayo se sembraron células BRIN-BD11 a una densidad de 2000 células/cm^2 en las diferentes soluciones (AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50) y en el control (células cultivadas en monocapa). Seguidamente, se realizaron las perlas de cada condición de hidrogeles y se depositaron 3 perlas en cada pozo de una placa de 48, se llevaron a incubación por 5h a una temperatura de 37 °C. Se incubaron las muestras en una proporción 1:1 de reactivo de MTT y medio de cultivo RPMI-1640 después de 5 horas de incubación.

A medida que pasó el tiempo, se visualizó la precipitación de cristales de formazan en las células de los hidrogeles y los controles. Se extrajo la cantidad de medio de los pozos dejando solamente los cristales y se les añadió DMSO, posteriormente, la placa se mantuvo en agitación durante 1h. La disolución resultante de cada pozo se depositó por triplicado a una placa de lectura de 96 pozos debidamente marcada.

Finalmente se añadió el blanco de reactivo por triplicado del DMSO y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 570 nm.

3.4.2 Ensayo de citotoxicidad (Live/Dead)

El ensayo Live/Dead es una tinción empleada como método colorimétrico para la evaluación de la viabilidad celular, mediante la medición de dos parámetros: la actividad intracelular esterasa y la integridad del plasma de membrana, utilizando dos tinciones: la calceína y el etidio (Rodriguez, A., 2014).

Este ensayo se realizó con el fin de examinar la población celular en el interior de cada hidrogel de alginato y alginato con GO a diferentes concentraciones y a su vez comprobar que el proceso de gelificación no resultara citotóxico, el procedimiento para la realización de este ensayo fue el siguiente: Se sembraron células BRIN-BD11 a densidad 2000 células/cm^2 en las diferentes soluciones (AL 1,87% y ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50), tras incubación durante 5 horas con medio, posteriormente se realizaron lavados sucesivos con PBS 1X y posteriormente tinción con Calceína 4 Mm y Homodímero de Etidio 2 μM.

Para el control de vivos se agregó solo Calceína y para el control de muertos se agregó solamente Homodímero de Etidio, estas preparaciones cubrieron todos los pocillos de la placa, seguidamente se dejaron incubar 45 minutos protegidos de la luz, después de ese tiempo, se agregó solución de montaje y lectura en microscopio de fluorescencia OLYMPUS.

3.4.3 Ensayo de proliferación celular (PicoGreen)

El método elegido para medir la proliferación celular fue el ensayo PicoGreen. El cual es un tinte fluorescente de ácidos nucleicos que permite cuantificar la concentración de DNA de doble cadena en la solución, es decir, una medida de las células vivas en las muestras.

Para realizar este ensayo se sembraron células BRIN-BD11 a una densidad de 2000 células/cm^2 en las diferentes soluciones (AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50), y en el control. Se prepararon perlas de hidrogel de cada condición y se depositaron 4 perlas por pozo en placas de 48, a los cuales se les añadió medio y se mantuvieron en incubación durante 24h.

Pasado ese tiempo, los hidrogeles fueron lavados y digeridos durante una noche a una temperatura de 56 ºC, mientras que los controles fueron congelados a -20 ºC, luego se preparó una curva estándar con el objetivo de encontrar las concentraciones de DNA en la ecuación de la recta. Una vez pasada las 24h, se transfirió la muestra al plato de 96 pozos, se añadió el reactivo de PicoGreen, se incubó y se realizó lectura en el equipo Synergy H.

3.4.4 Análisis estadístico

Para cada ensayo se montaron mínimo 6 réplicas, a partir de los resultados obtenidos se sacó la media, desviación estándar y el error estándar, con el fin de determinar diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de viabilidad entre las diferentes concentraciones de GO empleadas y el control sin tratamiento, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de 1 test post hoc Dunnett considerando valores significativos $p < 0,05$ a $p < 0,001$. La comprobación de la normalidad de los datos se realizó con test de Shapiro Wilk.

4. Resultados y Discusión

4.1 Resultados de la caracterización fisicoquímica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno

4.1.1 Análisis elemental

La composición química del óxido de grafeno se determinó mediante el análisis elemental y los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 1.

Tabla 1.

Resultado del análisis elemental realizado al GO.

Muestra	Contenido del elemento (%)				Razón
	C	H	N	O*	C/O
GO	44,01	2,52	0,20	53,94	0,81
*O% = 100% – C% – H% – N% – Cenizas%					

Después de realizar la síntesis, la relación C/O para el óxido de grafeno es de 0,81, lo que indica un alto grado de oxidación, debido a la presencia de grupos funcionales oxigenados, que se acompaña del mayor espacio entre capas, debido al espacio que ocupan los grupos funcionales (Aliyev et al., 2018).

4.1.2 Análisis de cenizas

Para calcular el porcentaje de cenizas se utilizó la siguiente ecuación reemplazando los valores obtenidos.

$$\%\ Cenizas = \frac{17{,}406 - 17{,}4026}{18{,}4530 - 17{,}4026} * 100$$

$$Cenizas = 0{,}323\%$$

El óxido de grafeno empleado estaba libre de materia mineral, ya que su contenido de cenizas es de un 0,3% y un 99,7% de contenido entre Carbón, Oxigeno, Nitrógeno e Hidrogeno.

Esto indica que, el procedimiento de limpieza del GO, mediante continuos lavados con agua y centrifugación, fue efectivo.

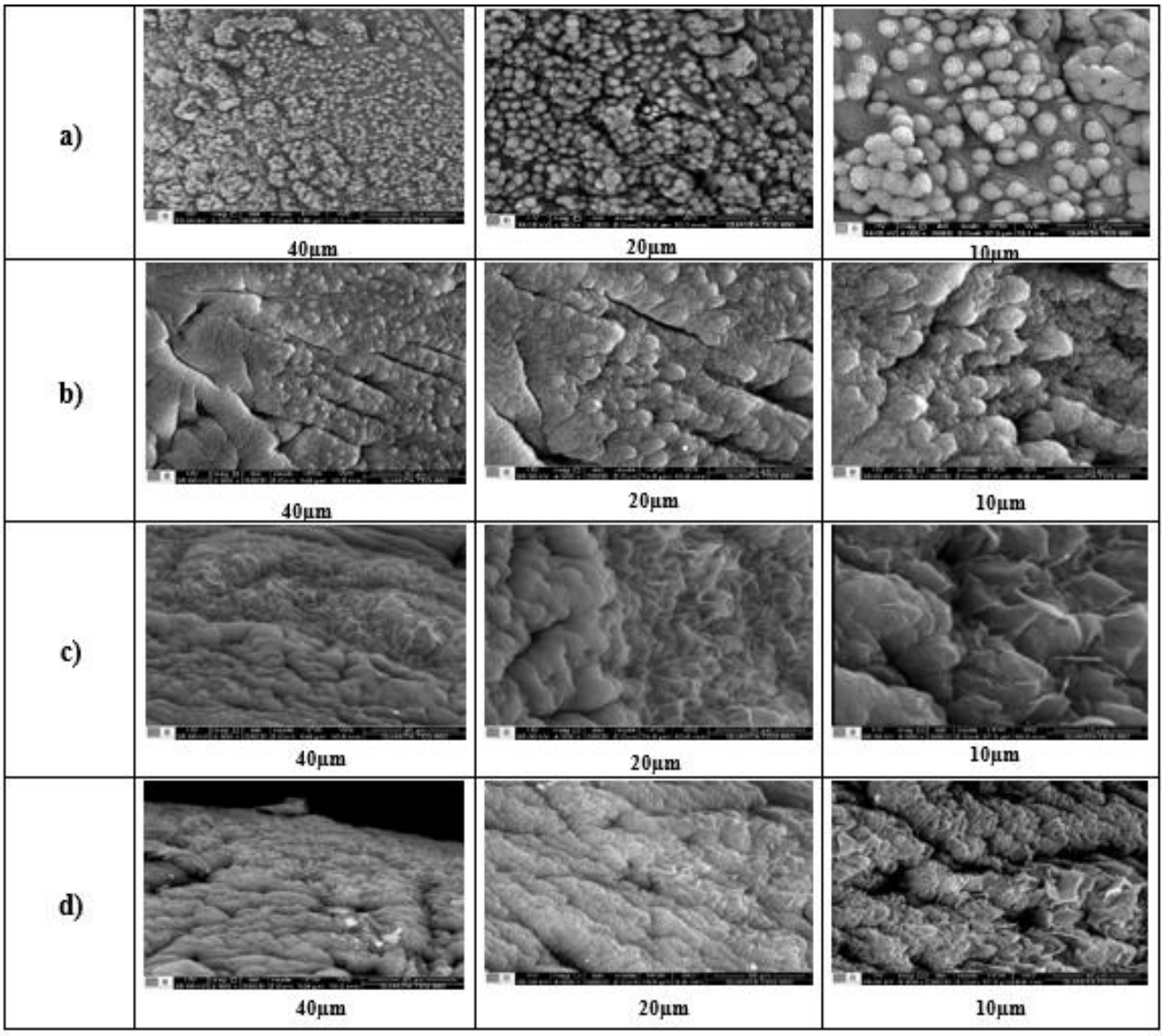
4.1.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la Figura 4, se presentan las micrografías tomadas a los hidrogeles de alginato de sodio al 1,87% y a los hidrogeles con diferentes concentraciones de GO, con el fin de dar una idea de la homogeneidad y la microestructura de las perlas, las cuales muestran notables diferencias en sus morfologías.

El hidrogel de AL 1,87% (Figura 4a) muestra una matriz con microesferas granulares de tamaño uniforme, dispersas a lo largo de la superficie como es común en este tipo hidrogeles (Ablouh, E. H., et al, 2019), mientras que en los hidrogeles con diferentes concentraciones de GO (Figura 4b, c y d), se observaron cambios en la morfología de la superficie, revelando algunas estructuras sobresalientes en forma de láminas regulares a lo largo de la matriz, que podrían atribuirse al GO incrustado en el alginato. Esta morfología se atribuye a la interrupción de las láminas de carbono planar sp2, debido a la interacción con carbono hibridado sp3 (Colom et al., 2020). A medida que se aumentan dichas concentraciones se observa mayor rigidez y grosor en la superficie del hidrogel y mayor uniformidad de las hojuelas presentes, evidenciando la incorporación del GO a la matriz de alginato (Li et al., 2018). Una dispersión uniforme y cierto grado de alineación de GO dentro de la matriz de alginato junto con una buena adhesión interfacial entre GO y alginato, deberían conducir a una mejora significativa en la estabilidad térmica y las propiedades mecánicas del hidrogel (Ionita et al., 2013).

Figura 4.

Micrografías (SEM) de los Hidrogeles: (a) AL 1,87%, (b) ALGO 10, (c) ALGO 25 y (d) ALGO 50.

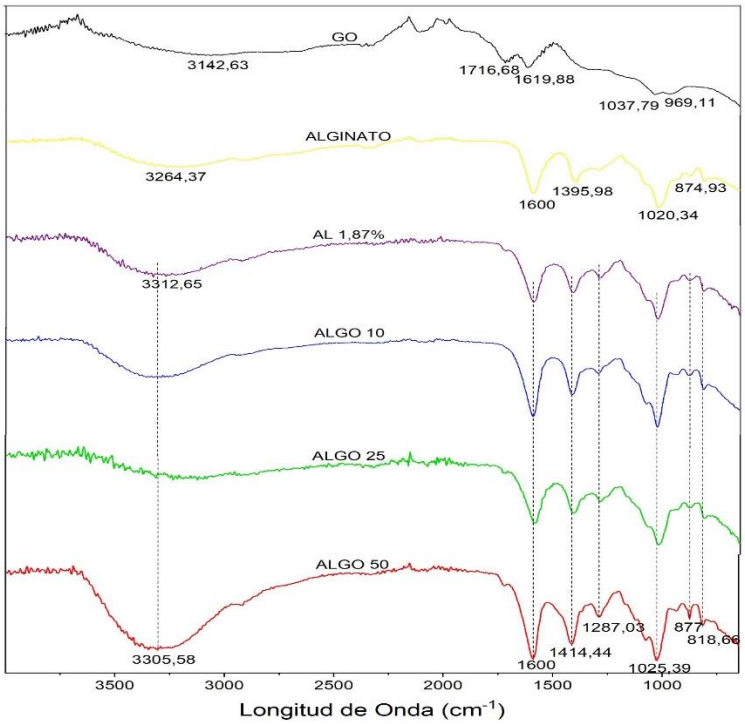


4.1.5 Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

En la Figura 5 se presentan los espectros de las 3 concentraciones de alginato con óxido de grafeno (ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50) y como controles los espectros de GO, alginato puro e hidrogel de AL 1,87%.

Figura 5.

Espectros FTIR de GO, alginato de sodio puro, hidrogeles de AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50.



En la región comprendida entre 3000 y 3600 cm^{-1} se observa una banda ancha de absorción en todas las muestras estudiadas, lo cual es atribuido a los modos de vibración de grupos hidroxilos, debido al agua absorbida (Yang et al., 2008). En el espectro de GO se encuentran presentes los siguientes grupos funcionales: carbonilos (C=O) a ~1716,68 cm^{-1}, carboxilos (COOH) a ~1619,88 cm^{-1} y epóxidos a ~1037,79 cm^{-1} y ~969,11 cm^{-1}. Estos picos característicos en el espectro FT-IR indicaron que el GO se ha sintetizado con éxito (Wang, J. et al, 2014).

Para el caso de los espectros de alginato puro, hidrogel AL 1,87% e hidrogeles de alginato con GO, guardan cierta similitud en la emisión de señales que representan los mismos grupos funcionales, debido a que la proporción del GO en los hidrogeles es relativamente pequeña. Se presentan bandas de absorción entre ~1600 cm^{-1} y ~1414,44 cm^{-1}, características de alargamientos asimétricos y simétricos de los grupos carboxilato (COOH) del polímero de alginato; además, las

bandas alrededor de ~1287,03 cm^{-1} y ~1025,39 cm^{-1} corresponden a la vibración del estiramiento de los grupos C–O, mientras que las bandas a ~ 887 cm^{-1} y ~ 818,66 cm^{-1} se asigna a la vibración de estiramiento de los grupos C–O–C y se atribuyen a su estructura de polisacárido (Smitha et al., 2005). Según la literatura disponible (Sartori et al., 1997), la banda de deformación simétrica del grupo carboxilo en 1395,98 cm^{-1} para el alginato puro, mostró un desplazamiento hacia 1414,14 cm^{-1} en los hidrogeles de alginato cuando se añadieron iones calcio a las soluciones. Este comportamiento es una evidencia de la reticulación iónica de los grupos carboxilatos.

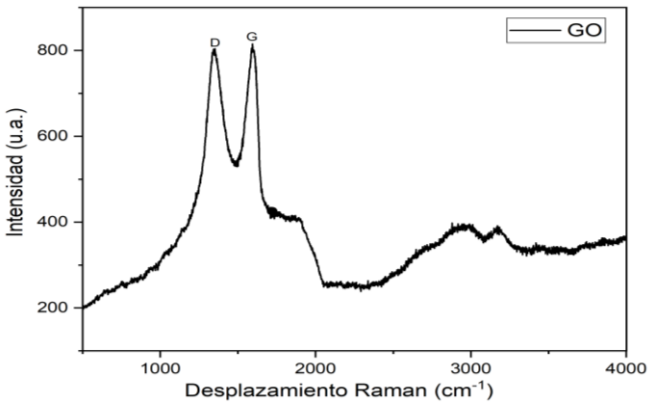
Por otro lado, con la adición de GO, el pico en~ 3312,65 cm^{-1} (vibración de estiramiento O–H) en el hidrogel AL 1,87%, se ampliaron y cambiaron a longitudes de onda más pequeñas ~3305,58 cm^{-1} para los hidrogeles ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50, lo que puede atribuirse a la interacción de alginato y GO a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares. La atracción electrostática lograda y el enlace de hidrógeno entre alginato y GO pueden derivar una respuesta mecánica mejorada (Ionita et al., 2013).

4.1.6 Espectroscopía Raman

Los cambios estructurales en el GO sintetizado a partir del grafito natural, se confirmaron mediante el uso de espectroscopía Raman presentados en la Figura 6.

Figura 6.

Espectros Raman de GO



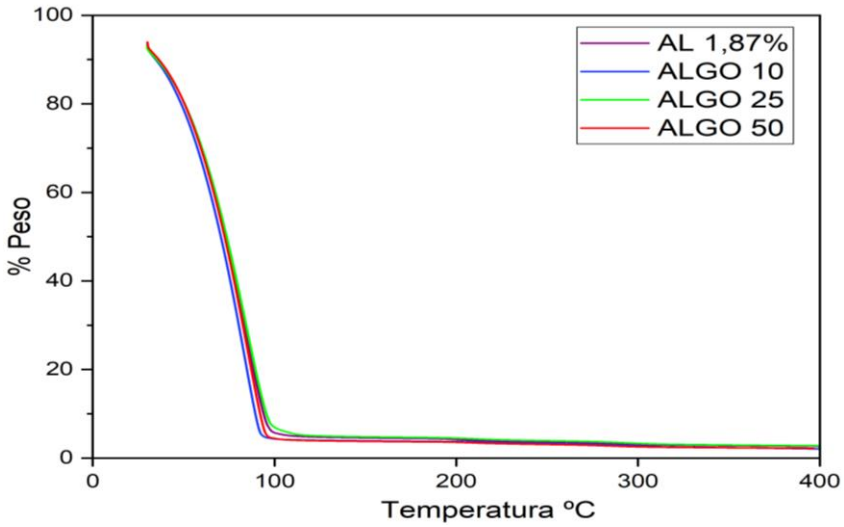
La banda D corresponde a la hibridación sp3 del carbono, mientras que la banda G corresponde a la hibridación sp2 del carbono. La relación de intensidad (ID / IG) de la banda D / banda G fue de 0,85 demostrando así el grado de oxidación de las nano hojas de GO (o relación de carbono sp3 / sp2) en las perlas de alginato/GO (Zhang, Zhang, Shao y Hu, 2016).

4.1.7 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los resultados de degradación térmica de las distintas muestras de AL 1,87% y ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50, se muestran en el termograma de las Figuras 7**.** En donde los diferentes hidrogeles, sometidos al ensayo termogravimétrico, presentaron un comportamiento muy similar con una pérdida de masa constante, desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente 100°C, esto debido a la cantidad de agua presente en cada muestra, alcanzando una pérdida de masa superior al 90%. Posteriormente, se observó que a partir de los 100 °C cambia el ritmo de pérdida de masa, lo que se puede atribuir a que el carbono presente en alginato y en el GO no llega a quemarse, ocurriendo una pérdida continua de grupos funcionales.

Figura 7.

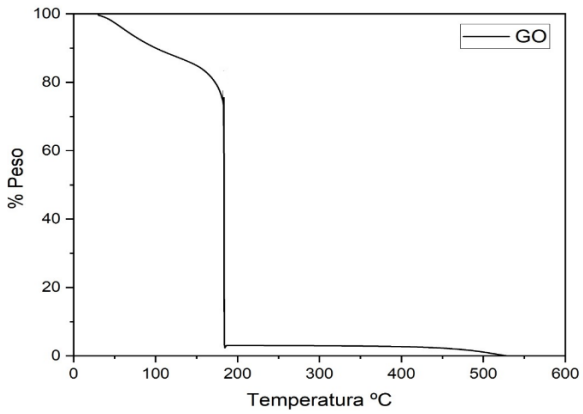
Termograma de los hidrogeles de alginato con diferentes concentraciones de GO.



El ensayo realizado a la muestra de GO, no es comparable directamente con los demás resultados de los hidrogeles de alginato, ya que no se realizó bajo las mismas condiciones de atmósfera inerte. Sin embargo, permite caracterizar el GO de forma separada.

Figura 8.

Termograma del GO.



El GO presentó, de acuerdo con la Figura 8, una pendiente de disminución de masa relativamente baja antes de los 180°C, después de esta temperatura perdió el 70% de su masa, siendo esto favorable para el objeto de investigación, ya que el GO entre los 34°C y 41°C pierde menos del 1% de su masa, haciéndolo muy estable y aportándole al hidrogel la estabilidad necesaria para soportar mejor las temperaturas que presenta el cuerpo humano.

4.1.8 Hinchamiento

A continuación, se presenta la Tabla 2 con los porcentajes de hinchamiento de los hidrogeles de alginato y alginato con diferentes concentraciones de óxido de grafeno.

Tabla 2.

Porcentajes de hinchamiento de los hidrogeles AL 1,87% y ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50.

Concentraciones	**AL 1,87%**	**ALGO 10**	**ALGO 25**	**ALGO 50**
% Hinchamiento	38,73%	23,84%	22,21%	15,84%

De acuerdo a la información contenida en la tabla anterior, las propiedades de hinchamiento de las microcápsulas de alginato se vieron afectadas por la presencia de GO, ya que las nanopartículas disminuyen significativamente el efecto de hinchamiento. Estos resultados indican que a mayor concentración de GO en las microcápsulas de alginato, mayor será su resistencia a los cambios osmóticos y posterior ruptura que las microcápsulas de AL 1,87% (Ciriza et al., 2015).

La reducción en la absorción de agua de los hidrogeles a medida que se aumenta la concentración de GO, sugiere que los grupos que interactúan están muy cerca, lo que también puede contribuir a un aumento de la conductividad por entrecruzamiento iónico (Smitha et al., 2005). Cuanto mayor sea el agente entrecruzante incorporado en la estructura del hidrogel, mayor será el entrecruzamiento dando como resultado una estructura más compacta y menos hinchada.

4.1.9 Degradación

Se presenta la Tabla 3 con los porcentajes de degradación de los hidrogeles de alginato y alginato con diferentes concentraciones de GO utilizando la ecuación 2.

Tabla 3.

Porcentajes de degradación de los hidrogeles de AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50.

Concentraciones	**AL 1,87%**	**ALGO 10**	**ALGO 25**	**ALGO 50**
% Degradación	97,03%	96,12%	95,80%	95,36%

De acuerdo a la información contenida en la tabla anterior, se observó que el porcentaje de degradación disminuyó a medida que se aumentó el contenido de GO en los hidrogeles, esto es debido a que el GO presenta un mejor comportamiento térmico como se pudo evidenciar en el análisis termogravimétrico realizado (Figura 8), el hidrogel ALGO 50 presentó la menor tasa de degradación de 95,36%, mientras que el hidrogel de AL 1,87% presentó la mayor tasa de

degradación con 97,03%, permitiendo concluir que a mayor contenido de GO, el hidrogel tardará mayor tiempo en degradarse a una temperatura de 37°C.

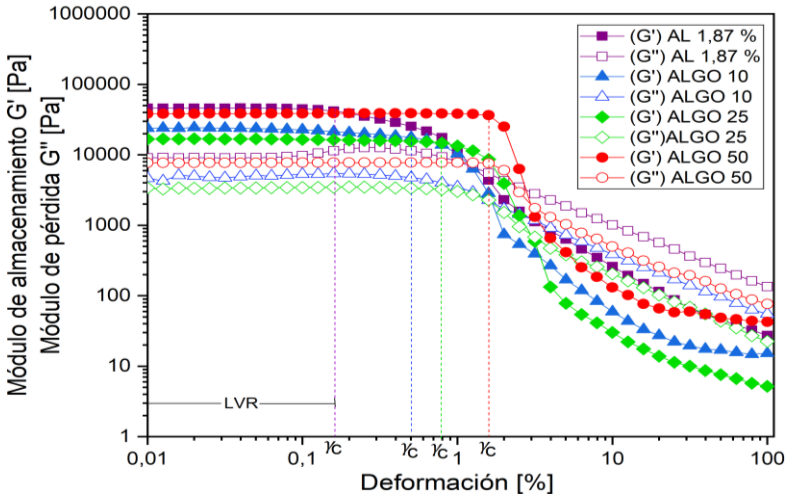
4.1.10 Análisis Reológico

Para el análisis reológico se procedió a comparar el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida o viscosidad (G'') de acuerdo con el esfuerzo cortante, como se observa en la Figura 9.

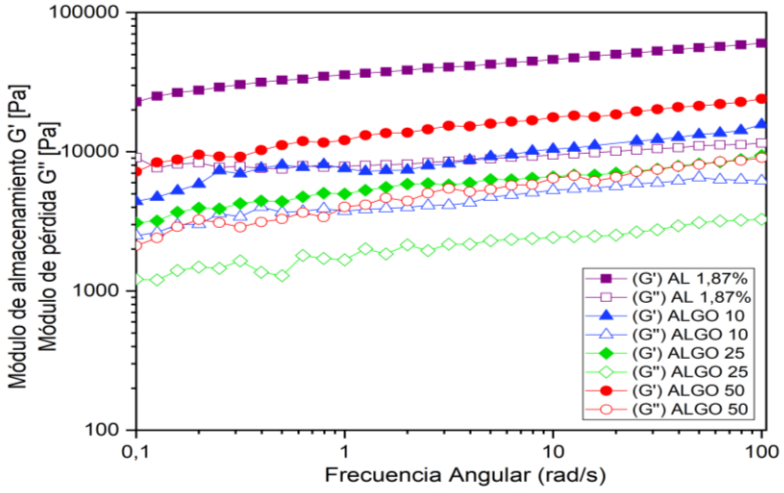
Figura 9.

(a)Barrido de amplitud y (b) barrido de frecuencia para el análisis reológico de los hidrogeles AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50.

a)



b)



La Figura 9a, muestra los resultados de los módulos de almacenamiento (G´) y de pérdida (G´´) de los hidrogeles de AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50, en función a la deformación aplicada, en los cuales se observó que el módulo de almacenamiento es superior al módulo de pérdida (G´ > G´´), predominando el carácter elástico sobre el carácter viscoso del material (Mezger, 2006).

Por otro lado, se pudo observar que cada una de las muestras presenta una zona lineal donde G' y G'' son prácticamente independientes de la deformación que se produce, indicando así su rango de viscoelasticidad lineal (LVR), el cual está relacionado con la forma estable y estructurada que poseen los hidrogeles (Wong et al., 2015).

La variación en las concentraciones de GO utilizadas dentro de cada hidrogel, influye en los valores del módulo de almacenamiento (G´) y en los valores de la deformación crítica por cizalla (γc), la cual se determina como el valor de deformación máxima en donde el valor de G´ permanece constante. De acuerdo con la Figura 9a para los hidrogeles AL 1,87%, ALGO 10 y ALGO 25 los valores de γc son 0,16, 0,50 y 0,80% respectivamente, mientras que para el hidrogel ALGO 50 el valor de γc corresponde a 1,58%, lo cual señala que este último presenta un mayor rango LVR, indicando que existe un efecto positivo en la estabilidad estructural del hidrogel.

La Figura 9b muestra las gráficas de los ensayos oscilatorios de los hidrogeles AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50 en función de la frecuencia angular aplicada. En todos los casos, se muestra el comportamiento viscoelástico de los hidrogeles, donde el módulo elástico es predominante frente al módulo viscoso (G´ > G´´) provocando que el material presente un comportamiento de una estructura sólida. Además, se puede observar que los módulos de almacenamiento (G´) y perdida (G´´) para el hidrogel AL 1,87%, presenta valores más elevados

que los demás hidrogeles, esto es debido a que se fijó un valor menor de deformación en el ensayo para esta muestra, pues los módulos disminuían rápidamente, debido a las propiedades del hidrogel.

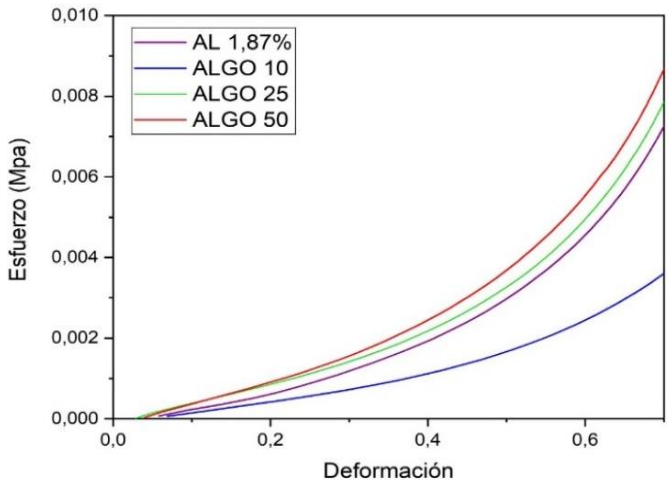
4.2 Resultados de la caracterización mecánica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno

4.2.1 Ensayo DMA

La Figura 10 muestra la relación de esfuerzo (MPa) vs deformación unitaria de cada uno de los hidrogeles realizados, los cuales presentaron dentro de la gráfica un comportamiento no lineal con concavidad hacia arriba (endurecimiento por deformación y pérdida de agua), atribuido a la densificación de la estructura o al incremento del grado de entrecruzamiento que genera una red polimérica más rígida y frágil (Gonzales, 2019), en este caso**,** cuando se le aplicó la carga a cada hidrogel, se deben haber modificado y reorientaron sus cadenas poliméricas, debido a que el líquido que contenían se empezó a salir y la fricción produjo un efecto endurecedor en el material (Ma et al., 2010).

Figura 10.

Curvas Esfuerzo vs Deformación obtenidas en el ensayo de compresión correspondiente a los hidrogeles AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50.



El módulo elástico por compresión de cada uno de los hidrogeles (AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50) fue calculado con las pendientes de las curvas en un rango de deformación de 0,1-0,3, los cuales dieron un valor de 0.0046, 0.0029, 0.0055 y 0.0056 MPa, respectivamente.

Los valores del módulo elástico para los hidrogeles de ALGO 50 y ALGO 25 fueron los más altos, esto es debido al aporte del GO, el cual mejora el comportamiento mecánico, ya que forma más puentes que refuerzan la matriz polimérica (Hu et al., 2016); sin embargo, este comportamiento no se observó para el hidrogel ALGO 10 con el que se obtuve un módulo de elasticidad menor al de AL 1,87%. Esto puede ser debido a que tienen mayor contenido de agua y esta actúa como plastificante, por lo que causa disminución en la rigidez de los hidrogeles.

Según los autores Rice et al., 2017, el módulo de Young de un páncreas sano se encuentra entre 0.0014 y 0.025 MPa, por lo que se puede inferir la similitud del comportamiento de los hidrogeles con el comportamiento elástico dentro de este órgano, siendo este material apto para trabajar dentro del mismo en el caso de ser empleado.

4.3 Resultados de la caracterización biológica del hidrogel basado en alginato y óxido de grafeno

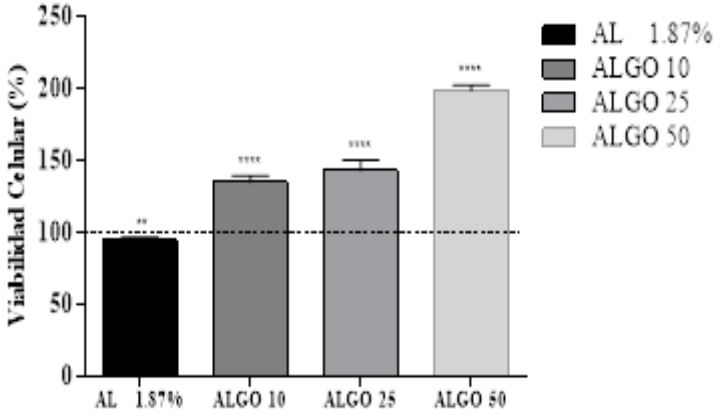
4.3.1 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El ensayo de viabilidad celular fue llevado a cabo con el fin de evaluar el efecto en la viabilidad y densidad celular con respecto a la concentración de GO contenido dentro de los hidrogeles elaborados.

La Figura 11 muestra la viabilidad celular promedio observada para cada uno de los hidrogeles probados; el porcentaje de viabilidad celular fue normalizado a células cultivadas en el plato a la misma densidad celular, representando el control el 100%.

Figura 11.

Porcentajes de viabilidad celular del Control, AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50. Los datos se presentan % Viabilidad Celular



El hidrogel de AL 1.87 % tuvo un valor promedio de viabilidad del 95 %, respecto al control, lo cual indica que no produce toxicidad en células beta pancreáticas cultivadas in vitro. Asimismo, para los hidrogeles ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50, los porcentajes de viabilidad incrementaron de forma significativa respecto al control, dando como resultado: 135,44, 143,61 y 199,67% respectivamente, considerando así que los hidrogeles con contenido de GO presentan una excelente viabilidad, ya que supera el 95% (Lasocka et al., 2021).

Los resultados revelaron que la actividad mitocondrial de las células BRIN-BD11 aumentaron significativamente ($p < 0,01$) a medida que se incrementaron las concentraciones de GO a cada hidrogel como se muestra en la Figura 11, demostrando así que el GO no produce efectos tóxicos en las células utilizadas en términos de viabilidad y por el contrario permite la adhesión y mejora la actividad mitocondrial de las mismas.

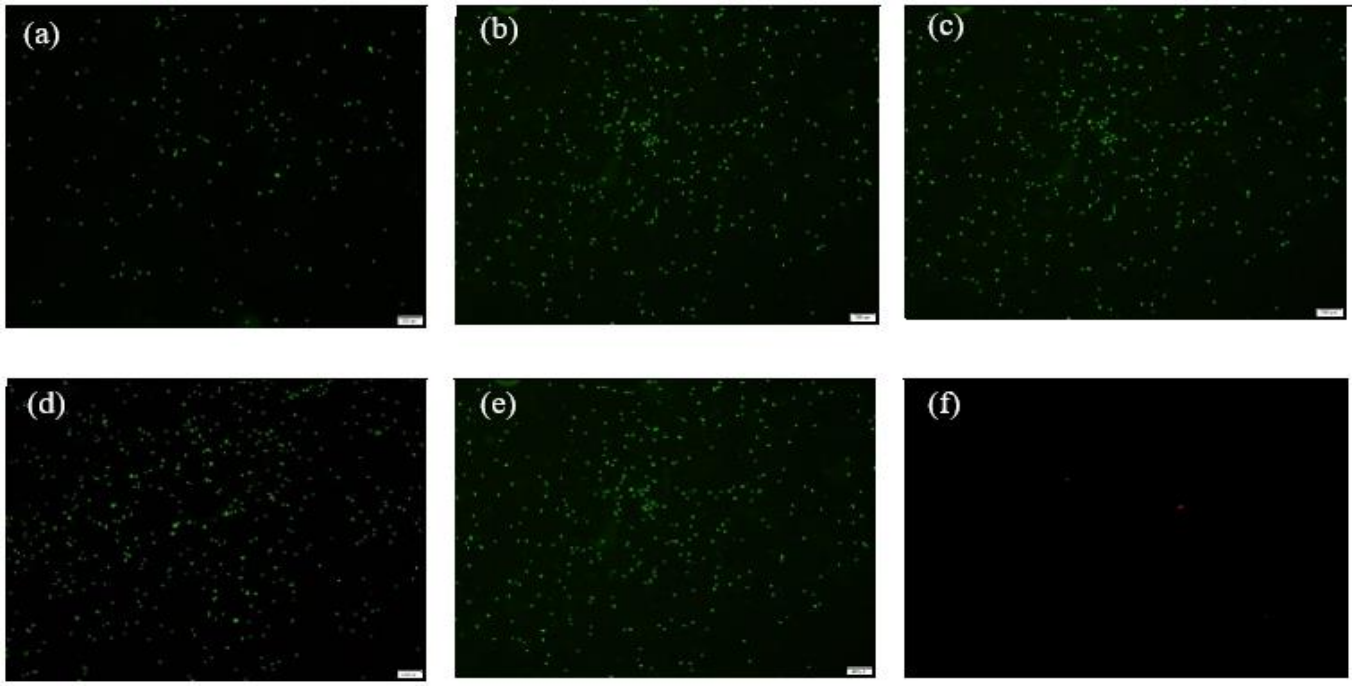
4.3.2 Ensayo de citotoxicidad (Live/Dead)

El ensayo de citotoxicidad (Live/Dead) fue llevado a cabo con el fin de comprobar la integridad de las células BRIN-BD11 luego de ser encapsuladas en los cuatro hidrogeles

preparados (AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50). Se empleó como control células cultivadas directamente en el plato.

Figura 12.

Micrografías (Objetivo 4X) del ensayo de citotoxicidad Live/Dead para las diferentes concentraciones: (a) AL 1.87%, (b) ALGO 10, (c) ALGO 25, (d) ALGO 50, (e) Control de células vivas, (f) Control de células muertas.



La Figura 12 muestra las micrografías de fluorescencia obtenidas en este ensayo en las cuales se pudo observar que las células que estuvieron en contacto con los hidrogeles, tanto con y sin GO, crecieron en buena densidad y están viables, corroborando los resultados obtenidos mediante la técnica de MTT.

Las imágenes correspondientes a los hidrogeles ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50 muestran mayor supervivencia celular que en el hidrogel AL 1,87%, los controles que se presentaron, (negativo y positivo Figura 12e y f), permiten comprobar que ambos fluoróforos tiñen

adecuadamente, aportando veracidad a los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas. En términos generales se puede decir que el sistema alginato/GO es viable para el mantenimiento de células productoras de insulina.

4.3.3 Ensayo de proliferación celular (PicoGreen)

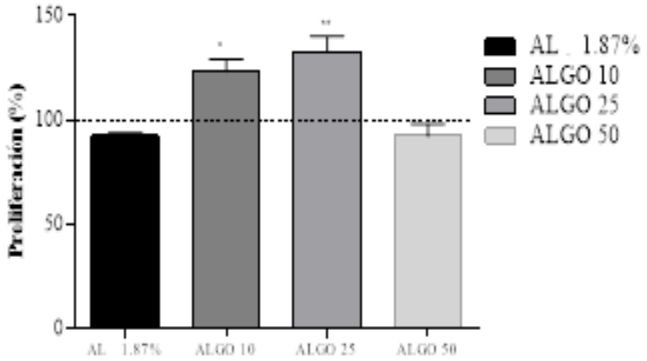
Con el objetivo de evaluar si las concentraciones de GO presentes en los hidrogeles elaborados aumentaban la proliferación celular como lo sugerían los resultados del ensayo de MTT, se realizó un ensayo de proliferación celular empleando PicoGreen.

En la Figura 13 se observa una similitud en los resultados del MTT con los hidrogeles ALGO 10 y ALGO 25, los cuales promovieron la proliferación celular con un valor promedio de 123,33 y 133%, respectivamente (diferencias estadísticamente significativas). Sin embargo, el hidrogel ALGO 50 no promovió la proliferación celular, ya que dio como resultado un valor promedio del 92,38% y mantuvo los niveles de fluorescencia similares a los del hidrogel AL 1,87% el cual presentó un 92,43% respecto al control, esto pudo deberse a que para el ensayo de MTT las células permanecieron incubadas dentro del hidrogel 5 horas y en el ensayo de PicoGreen estuvieron incubadas 24 horas, permitiendo deducir que quizás a esta concentración de GO se alteró el ciclo celular y perjudicó su proliferación celular a largo plazo. Sin embargo, es importante resaltar los resultados obtenidos de proliferación celular de ALGO 10 y ALGO 25. Resultados que ponen de manifiesto la utilidad del hidrogel diseñado pues favorecen la proliferación de células pancreáticas.

Figura 13.

Porcentajes de proliferación celular del Control, AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 y ALGO 50.

Los datos se presentan % Proliferación celular Vs Control (100%)



Los resultados presentados en el artículo de Ciriza et al., 2015, fueron muy similares en cuanto a la viabilidad obtenida para los hidrogeles ALGO 50, sin embargo se encontró que no realizaron un ensayo de proliferación celular, el cual fue evaluado en el presente estudio, encontrando un porcentaje de proliferación del 92,38% para el ALGO 50, quedando por debajo del control, siendo este un resultado poco favorecedor, pues al compararlo con los resultados obtenidos en los análisis de viabilidad, se esperaba que mantuviera la tendencia de ser el más óptimo para encapsular las células beta pancreáticas BRIN BD11.

5. Conclusiones

Los hidrogeles a base de alginato y GO fueron sintetizados con éxito, logrando encapsular células beta pancreáticas BRIN BD11 mediante la técnica de gelificación iónica, mostrando características estructurales y morfológicas similares a la literatura estudiada. Al añadir las diferentes concentraciones de GO a los hidrogeles, su morfología presentó cambios en cuanto a la aparición de láminas regulares por toda la superficie. Lo cual se le atribuye a la incrustación de GO en la matriz de alginato. Asimismo, al evaluar los espectros FTIR de los hidrogeles se encontró que seguían presentando los mismos grupos funcionales que el hidrogel de AL 1,87%, debido a las bajas concentraciones de GO agregadas, pero con la diferencia que la banda característica del grupo hidroxilo se redujo, indicando la interacción de alginato y GO a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares.

El efecto del óxido de grafeno en la composición de los hidrogeles ALGO 25 y ALGO 50 se vio reflejado en el aumento de su módulo elástico (0.0055 y 0.0056 MPa, respectivamente), permitiendo concluir que la adición de GO mejora las propiedades mecánicas debido a que forma más puentes que refuerzan la matriz polimérica. Por otro lado, las propiedades reológicas de todos los hidrogeles se analizaron en función de los módulos de almacenamiento G´ y perdida G´´, dando un comportamiento elástico predominante (G´ > G´´). Además, mostraron un rango viscoelástico lineal (LVR), el cual está relacionado con la estabilidad de las estructuras al deformarse por cizalla. Siendo el hidrogel ALGO 50 el más alto, con un valor de γc=1,56%, seguido del ALGO 25 con un valor γc=0,80%, lo cual indica que existe un efecto sobre la estabilidad estructural del hidrogel al incrementar la concentración de óxido de grafeno en los hidrogeles.

La biocompatibilidad de las células BRIN BD11 fue evaluada en los hidrogeles mediante estudios de citotoxicidad a través de los ensayos MTT y Live/Dead, los cuales mostraron resultados muy prometedores, evidenciando que las células sobrevivieron en todas las concentraciones (AL 1,87%, ALGO 10, ALGO 25 Y ALGO 50) y no fueron afectadas por la concentración de óxido de grafeno presente en los hidrogeles, alcanzando un porcentaje de viabilidad de 135,44% para ALGO 10, 143,61% para ALGO 25 y 199,67% para ALGO 50. Sin embargo, en el ensayo de proliferación celular (PicoGreen), el hidrogel ALGO 25 presentó mejores resultados con un valor promedio de 123,33%.

Después de analizar todos los estudios y comparar los resultados correspondientes a la caracterización fisicoquímica, mecánica y biológica, se puede concluir que el hidrogel ALGO 25 es la opción más viable para encapsular las células beta pancreáticas BRIN BD11.

Referencias Bibliográficas

Ablouh, E. H., Hanani, Z., Eladlani, N., Rhazi, M., & Taourirte, M. (2019). Chitosan microspheres/sodium alginate hybrid beads: an efficient green adsorbent for heavy metals removal from aqueous solutions. *Sustainable Environment Research*, 29(1). https://doi.org/10.1186/s42834-019-0004-9

Aliyev, E. M., Khan, M. M., Nabiyev, A. M., Alosmanov, R. M., Bunyad-zadeh, I. A., Shishatskiy, S., & Filiz, V. (2018). Covalently Modified Graphene Oxide and Polymer of Intrinsic Microporosity (PIM-1) in Mixed Matrix Thin-Film Composite Membranes. *Nanoscale Research Letters*, 13(1). https://doi.org/10.1186/s11671-018-2771-3.

Arifin, D. R., Kulkarni, M., Kadayakkara, D., & Bulte, J. W. M. (2019). Fluorocapsules allow in vivo monitoring of the mechanical stability of encapsulated islet cell transplants. *Biomaterials*, 221, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119410

Arifin, D. R., Long, C. M., Gilad, A. A., Alric, C., Roux, S., Tillement, O., Link, T. W., Arepally, A., & Bulte, J. W. M. (2011). Trimodal Gadolinium-Gold Microcapsules Containing Pancreatic Islet Cells Restore Normoglycemia in Diabetic Mice and Can Be Tracked by Using US, CT, and Positive-Contrast MR Imaging. *Radiology*, 260(3), 790–798. https://doi.org/10.1148/radiol.11101608

Carr, G. L., & Williams, G. P. (1997). Infrared microspectroscopy with synchrotron radiation. *Accelerator-Based Infrared Sources and Applications*, 3153, 51. https://doi.org/10.1117/12.290262

Castro de Pardo, C. (2006). *Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del MTT*. Fundación Universitaria San Martín, Bogotá.

Chawla, R. (2011). *Complications of Diabetes* (1.ª ed.). Jaypee Brothers Medical Publishers.

Ciriza, J., Saenz del Burgo, L., Virumbrales-Muñoz, M., Ochoa, I., Fernandez, L. J., Orive, G., Hernandez, R. M., & Pedraz, J. L. (2015). Graphene oxide increases the viability of C2C12 myoblasts microencapsulated in alginate. *International Journal of Pharmaceutics*, 493(1-2), 260-270. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.062

Ciriza, J., Saenz del Burgo, L., Gurruchaga, H., Borras, F. E., Franquesa, M., Orive, G., Hernández, R. M., & Pedraz, J. L. (2018). Graphene oxide enhances alginate encapsulated cells viability and functionality while not affecting the foreign body response. *Drug Delivery*, 25(1), 1147-1160. https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474966

Clavijo, J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3(3), 133–146. https://doi.org/10.15765/e.v3i3.420

Colom, X., Cañavate, J., Lis, M. J., Sanjuan, G., & Gil, I. (2020). Análisis estructural de Óxidos de Grafeno (GO) y Óxidos de Grafeno reducidos (Rgo). *Afinidad*, 77(591).

Díaz Benito, B. (2019). *Producción y caracterización de microesferas de alginato funcionalizadas con colágeno y pacido hialurónico como soporte tridimensional para el cultivo de células de mieloma múltiple*. (Tesis de pregrado). Universitat Politécnica de Valéncia, Valencia, España

Elizondo, S.G., & Mendoza, D.S. (2018). *Desarrollo de hidrogeles de alginato para ulceras diabéticas* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Farahani V, Fariba G, Samira V-F. (2010) Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran Polym J*. 19(5):375–98.

García, O., (2019). *Estudio de la influencia de los diferentes parámetros involucrados en la microencapsulación mediante coacevación compleja*. (Tesis de posgrado). Universitat Politécnica de Catalunya, Tarrassa, España.

Gonzales, K. (2019). *Sintesis de hidrogeles con derivado de quitosana y caracterización de sus propiedades fisicoqupimicas y mecánicas*. (Tesis de posgrado). Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú

Hu, Y.; Han, W.; Huang, G.; Zhou, W.; Yang, Z.; Wang, C. (2016). Highly Stretchable, Mechanically Strong, Tough, and Self-Recoverable Nanocomposite Hydrogels by Introducing Strong Ionic Coordination Interactions. *Macromol. Chem*. Phys. 217, 2717−2725.

Huang, Z., Qian, L., Yin, Q., Yu, N., Liu, T., & Tian, D. (2018). Biodegradability studies of poly(butylene succinate) composites filled with sugarcane rind fiber. *Polymer Testing*, 66, 319–326. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.02.003

Hummers, W.S., Offeman, R.E., (1958). Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc*. 80 1339-1339.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y certificaciones ICONTEC. (2010). *Determinación de cenizas en muestras de carbón y coque* (NTC 1859).

Ionita, M., Pandele, M. A., & Iovu, H. (2013). Sodium alginate/graphene oxide composite films with enhanced graphe and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 339–344. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.065

.Jalaja, K., Sreehari, V., Kumar, P. A., & Nirmala, R. J. (2016). Graphene oxide decorated electrospun gelatin nanofibers: Fabrication, properties and applications. *Materials Science and Engineering*: C, 64, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.036

Kaklamani g, Cheneler d, Grover lm, Adams mj, Bowen j. (2014). Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 36:135-42

Kim, J., Arifin, D. R., Muja, N., Kim, T., Gilad, A. A., Kim, H., Arepally, A., Hyeon, T., & Bulte, J. W. M. (2011). Multifunctional Capsule-in-Capsules for Immunoprotection and Trimodal Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(10), 2317–2321. https://doi.org/10.1002/anie.201007494

Lasocka, I., Szulc-Dąbrowska, L., Skibniewski, M., Skibniewska, E., Gregorczyk-Zboroch, K., Pasternak, I., & Hubalek Kalbacova, M. (2021). Cytocompatibility of Graphene Monolayer and Its graphene Focal Cell Adhesion, Mitochondrial Morphology and Activity in BALB/3T3 Fibroblasts. *Materials*, 14(3), 643. https://doi.org/10.3390/ma14030643

Li, J., Ma, J., Chen, S., Huang, Y., & He, J. (2018). Adsorption of lysozyme by alginate/52raphene oxide composite beads with enhanced stability and mechanical property. *Materials Science and Engineering:* C, 89, 25–32. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.03.023

Lim GJ, Zare S., Van Dyke M., Atala A. (2010) Microencapsulación celular. En: Pedraz JL, Orive G. (eds) Aplicaciones terapéuticas de la microencapsulación celular. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 670. Springer, Nueva York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5786-3_11

Ma R., Xiong D., Miao F., Zhang J., Peng Y., (2010). Novel PVP/PVA Hydrogels for Articular Cartilage Replacement. *Materials Science and Engineering*: C, 29 (6): 1979-1983

Martinez Martinez, M.T. (2016). *Desarrollo y aplicaciones hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos*. (Tesis de pregrado). Universitat Politécnica de Valéncia, Valencia, España

McClenaghan NH, Flatt PR (1999) Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines. *J Mol Med*. 77(1):235-43 PMID: 9930971.

Mezger TG. (2006) *The Rheology Handbook* (2nd Ed.). Vincentz. p. 180.

Omidian H, Park K, (2008) *Swelling agents and devices in oral drug delivery*, ene. De. Doi: 10.1016/S1773-2247(08)50016-5.

Orive, G., Emerich, D., Khademhosseini, A., Matsumoto, S., Hernández, R. M., Pedraz, J. L., Desai, T., Calafiore, R., & de Vos, P. (2018). Engineering a Clinically Translatable Bioartificial Pancreas to Treat Type I Diabetes. *Trends in Biotechnology*, 36(4), 445–456. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.01.007

Orive, G., Santos, E., Pedraz, J. L., & Hernández, R. M. (2014). Application of cell encapsulation for controlled delivery of biological therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 67-68, 3–14. https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.009

Ortiz, N., Ochoa, L. A., González, S. M., Rutiagas, O. M., & Gallegos, J. A. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. *TecnoLógicas, 24*(52), e1962. https://doi.org/10.22430/22565337.1962

Rice, A. J., Cortes, E., Lachowski, D., Cheung, B. C. H., Karim, S. A., Morton, J. P., & del Río Hernández, A. (2017). Matrix stiffness induces epithelial–mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, 6(7), e352–e352. https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.54

Rodriguez, A., (2014). *Desarrollo de un sistema de liberación prolongada de factor neural del crecimiento a partir de micropartículas de gelatina introducidas en dos scaffolds de ácido hialurónico y poli (etil acrilato*). (Tesis de pregrado). Universitat Politécnica de Valéncia, Valencia, España

Sarmiento Huertas, P. A., & Suarez Arnedo, A. (2015). *Desarrollo de geles a base de alginato de sodio con alto contenido de ácido αl-gulurónico para uso potencial como adhesivo para huesos*. (Tesis de pregrado). Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Sartori, C., Finch, D. S., Ralph, B., & Gilding, K. (1997). Determination of the cation alginate thin films by Fti.r. *spectroscopy*. *Polymer*, 38(1), 43–51. https://doi.org/10.1016/s0032-3861(96)00458-2

Serrano Aroca, Á., Iskandar, L., & Deb, S. (2018). Green synthetic routes to alginate-graphene oxide composite hydrogels with enhanced physical properties for bioengineering applications. *European Polymer Journal*, 103, 198-206. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.04.015

Servicios Técnicos de investigación STTI. (2021). *Análisis elemental. Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, España*.

Smitha, B., Sridhar, S., & Khan, A. (2005). Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell graphene. *European Polymer Journal*, 41(8), 1859–1866. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.018

Vargas Ceballos, O. (2013). *Estudio de materiales basados en grafeno para su uso como ánodos en baterías de Li-ión.* (Tesis de doctorado). Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

Wang, J., Liu, C., Shuai, Y., Cui, X., & Nie, L. (2014). Controlled release of anticancer drug using graphene oxide as a drug-binding effector in konjac glucomannan/sodium alginate

hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 223–229. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.009Zhao, J., Liu, F., & Li, F. (2014). Graphene Oxide: Physics and Applications. Springer Publishing.

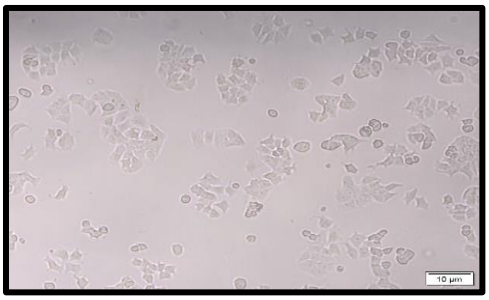
Wong, R., Ashton, M., & Dodou, K. (2015). Effect of Crosslinking Agent Concentration on the Properties of Unmedicated Hydrogels. *Pharmaceutics*, *7*(3), 305–319. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7030305

Yan, C., & Pochan, D. J. (2010). Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chemical Society Reviews*, 39(9), 3528. https://doi.org/10.1039/b919449

Yang, Xiaoying; Zhang, Xiaoyan; Liu, Zunfeng; Ma, Yanfeng; Huang, Yi; Chen, Yongsheng (2008). High-Efficiency Loading and Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride on Graphene Oxide. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(45), 17554–17558. Doi:10.1021/jp806751k

Zhang, C., Zhang, Y., Shao, H., & Hu, X. (2016). Hybrid silk fibers dry-spun fromregenerated silk fibroin/graphene oxide aqueous solutions. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 3349-3358

Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J. W., Potts, J. R., & Ruoff, R. S. (2010). Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Materials*, 22(35), 3906–3924. https://doi.org/10.1002/adma.201001068

Apéndices

Apéndice A. Células BRIN-BD11