



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

“DESARROLLO DE GELES BASADOS EN NANOCRISTALES DE CELULOSA MODIFICADOS EN SISTEMAS EUTÉCTICOS PROFUNDOS PARA EL CULTIVO 3D DE CÉLULAS.”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

PRESENTA:

ING. ANDREA GRISELDA BLANCO GUTIÉRREZ

DR. JOSUÉ DAVID MOTA MORALES
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

DRA. KARLA OYUKY JUÁREZ MORENO
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, ENERO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales – UNAM
Acuerdo del Comité Académico del 28 de junio de 2023

Declaración de Autoría

Yo, Andrea Griselda Blanco Gutiérrez, hago constar que esta tesis titulada, "Desarrollo de geles basados en nanocristales de celulosa modificados en sistemas eutécticos profundos para el cultivo 3D de células" y el trabajo presentado en ella son de mi autoría, asimismo,

Yo confirmo que:

Este trabajo fue hecho totalmente durante el periodo de mis estudios de Maestría en el Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales (PCeIM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Ninguna parte del presente trabajo ha sido usada para algún tipo de grado o certificación en la UNAM, ni en alguna otra Institución.

Cuando se ha citado el trabajo de otros autores, siempre se ha dado la fuente de origen. Con la excepción de dichas citas, la totalidad de la información contenida en el presente trabajo es de mi autoría.

He reconocido todas las fuentes de ayuda usadas en este trabajo.

Cuando el trabajo fue hecho en colaboración con otros, he especificado cuáles fueron sus contribuciones.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc., sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía.

Acepto que, en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Nombre Alumno: Ing. Andrea Griselda Blanco Gutiérrez

Firma: Griselda Blanco Gtz.

Nombre del Tutor: Dr. Josué David Mota Morales

Firma: 

Fecha: 13 de octubre del 2023

Contenido

Dedicatorias.....	2
Agradecimientos.....	3
1 Resumen.....	4
2 Índice de Figuras.....	5
3 Introducción	8
3.1 Tejidos.....	8
3.1.1 Tejido conectivo y no conectivo	8
3.1.2 Matriz Extracelular (MEC).....	9
3.1.3 Cultivo celular.....	11
3.2 Hidrogeles.....	12
3.2.1 Características de un hidrogel para aplicaciones biomédicas	13
3.2.2 Desventajas de los hidrogeles actuales	13
3.3 Celulosa	14
3.3.1 Nanocristales de celulosa (CNC).....	15
3.3.2 Obtención de los CNC.....	16
3.3.3 Hidrogeles de CNC para aplicaciones biológicas	17
3.3.4 Técnicas de modificación superficial para los CNC para aplicaciones biomédicas....	19
3.4 Solventes Eutécticos Profundos (DES).....	19
3.4.1 Aplicaciones de los DES en celulosa	21
3.4.2 Funcionalización de celulosa en DES.....	21
4 Hipótesis.....	23
5 Objetivos	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos específicos	23
6 Métodos	24
6.1 Funcionalización de la CNC.....	24
6.1.1 Preparación del DES de Ácido Oxálico Dihidratado y Cloruro de Colina (OxAcDi/ChCl) 24	
6.1.2 Funcionalización de la CNC con DES.....	24
6.2 Caracterización de los CNC.....	26
6.2.1 Análisis por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	26
6.2.2 Valoración conductimétrica.....	27

6.2.3	Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	29
6.2.4	Análisis por Difracción de rayos X (XRD).....	30
6.3	Hidrogeles de CNC.....	30
6.3.1	Pruebas de retención con agua	30
6.3.2	Pruebas de retención con medio de cultivo (DMEM)	31
6.3.3	Reología.....	32
6.4	Cultivo celular en 3D	32
6.4.1	Ensayo de MTT	33
6.4.2	Ensayo con Resazurina	35
6.4.3	Ensayo para Microscopía Confocal.....	37
6.5	Adsorción de proteínas	38
6.5.1	Método de Bradford.....	38
7	Resultados y discusión.....	40
7.1	Caracterización de los CNC.....	40
7.1.1	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	40
7.1.2	Valoración conductimétrica.....	41
7.1.3	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	43
7.1.4	Difracción de Rayos X (XRD)	44
7.2	Hidrogeles de CNC.....	45
7.2.1	Pruebas de retención con agua	45
7.2.2	Pruebas de retención con DMEM	46
7.2.3	Reología.....	48
7.3	Cultivo celular en 3D	51
7.3.1	Ensayo de MTT	51
7.3.2	Ensayo de viabilidad celular por reducción de resazurina	54
7.3.3	Morfología celular en hidrogeles mediante microscopía confocal	57
7.4	Adsorción de proteínas	60
7.4.1	Método de Bradford.....	60
8	Conclusiones.....	62
9	Perspectivas.....	63
	Referencias bibliográficas.....	64

Dedicatorias

A mis padres Julieta y Jorge, su guía y sacrificio han sido los cimientos de mi vida, cada logro mío es logro de nosotros tres.

A Emilio y Alberto por su amor incondicional.

A mi tía Angélica por el apoyo desde el primer día del comienzo de este proceso.

A mi familia, por su amor y apoyo en cada decisión y proyecto.

A mi segunda familia Irma, Javier, Patricia y Diego por el acompañamiento en este proceso.

A Antonio por todo tu amor y por ser mi refugio constante.

A Amparito, te extraño todos los días.

Agradecimientos

Experimentar cada etapa del proceso que condujo a la conclusión de este proyecto ha sido enormemente gratificante, y alcanzar este punto no habría sido posible sin el respaldo y colaboración de personas e instituciones que han contribuido de manera significativa para que este trabajo llegue a un feliz término.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Josué David Mota Morales. Su apoyo y guía han sido fundamentales en mi camino académico y profesional. Estoy verdaderamente agradecida por su dedicación y motivación constante para dar lo mejor de mí durante el desarrollo de este trabajo. Yoda best.

Muchas gracias a la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno y a la Dra. Luz María López Marín por su valiosa contribución a este proyecto, así como por sus valiosos comentarios que han contribuido a mejorar cada parte de este.

Gracias Javier, Vanessa, Kaori, Priscila, Saúl, Iván, a mis amigos del CFATA y compañeros del Polymer Lab, gracias por todo su apoyo durante mi estadía, por las discusiones científicas y por sus muestras de afecto y amabilidad, nuestro tiempo juntos ha hecho el camino más placentero.

Además, deseo extender mi gratitud al CFATA y a la UNAM por todos los apoyos brindados durante este periodo, en especial por los programas PAEP y el PAPIIT IA206022. Quiero agradecer al CONAHCYT por la oportunidad brindada y la generosa beca que me ha sido otorgada en los últimos dos años. Reconozco que este respaldo ha desempeñado un papel fundamental en mi desarrollo académico.

Agradezco de igual forma a todos los laboratorios que me brindaron su apoyo, lo que permitió que los resultados de este proyecto ampliaran su alcance.

- Nanotox Lab responsable Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno; por el apoyo con reactivos, materiales y equipos y por abrirme las puertas de su laboratorio.
- Laboratorio de Nanobio-Óptica, responsable Dra. Luz María López Marín; por el apoyo con los resultados obtenidos del UV-Vis y por abrirme las puertas de su laboratorio.
- Laboratorio de Reología perteneciente al CUCEI de la Universidad de Guadalajara, responsable Dr. J. Félix Armando Soltero Martínez, así como al Mtro. Raúl Ortega Córdova y Ing. Alejandro Aguilar Ramírez; por el apoyo en los ensayos de reología.
- Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales responsable Dr. Remy Ávila Foucat, y al Dr. Reinher Pimentel Domínguez; por el apoyo en los ensayos de microscopía confocal.
- Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales responsable M en C. Manuel Aguilar Franco; por el apoyo en los resultados obtenidos en el SEM.
- Laboratorio de Física de alimentos, responsable Dr. Mario Enrique Rodríguez García; por el apoyo con los análisis por FTIR.
- Laboratorio de Difracción de Rayos X del CFATA, responsable Dra. Beatriz Millán Malo; por el apoyo con las pruebas de Difracción de Rayos X.
- Al Laboratorio de Microscopía de Fuerza Atómica del Instituto de Física BUAP, responsable Dr. Francisco Javier Flores Ruíz; por el apoyo con los resultados del AFM.
- Laboratorio de ondas de choque responsable Dra. Blanca Edith Millán Chiu; por el apoyo con el blanco de calcoflúor.

1 Resumen

Los hidrogeles a base de celulosa son materiales innovadores que han sido parte de muchas aplicaciones biomédicas debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad. En la búsqueda de un hidrogel que tenga características clave para poder retener células entre sus redes poliméricas, esta tesis introduce un nanomaterial biocompatible, los nanocristales de celulosa, que son funcionalizados con el fin de cambiar su química superficial por grupos $-COOH$ que mejoraran las interacciones en los hidrogeles formando así un material más homogéneo. La funcionalización de los CNC se dio por medio de solventes eutécticos profundos formados de cloruro de colina y ácido oxálico. En este trabajo se reportan nanocristales de celulosa funcionalizados a cuatro diferentes tiempos, CNC-OSO₃H, CNC-1h, CNC-2h y CNC-3h. Estos materiales fueron caracterizados por FTIR, valoración conductimétrica, pruebas de retención de agua y DMEM, microscopía confocal y SEM. Además, debido a sus propiedades biocompatibles y a su potencial aplicación biomédica, la citocompatibilidad de estos materiales fue estudiada en cultivo de células de colon HT-29 y fibroblastos 3T3-L1; sus niveles de toxicidad fueron medidos mediante ensayos de MTT, resazurina y microscopía confocal. Esto resultó en un hidrogel que exhibió propiedades químicas, físicas, mecánicas y biocompatibles que, en conjunto, proporcionaron un soporte físico para las células HT-29 y los 3T3-L1.

2 Índice de Figuras

Figura 1.- Esquema representativo de las diferentes superficies de una célula epitelial polarizada y su interacción con el tejido conectivo.	9
Figura 2.- Imagen representativa de la MEC y las proteínas que la componen. Tomado y editado de Biomaterials (2016), 86, 68-82. ⁴	10
Figura 3.- Comportamiento celular cultivo celular 2D, donde no se representa la morfología fisiológica real vs 3D las células se cultivan en un ambiente similar a in vivo. Tomado y editado de Nanomaterials 2021,11481. ¹³	11
Figura 4.- Aplicaciones de los hidrogeles. Tomado y editado de Carbohydrate Polymers 283 (2022) 119161. ¹⁸	12
Figura 5.- Estructura química de la celulosa.....	14
Figura 6.- Micrografía TEM de los CNC marca CelluForce NCC. Tomado de ACS Sustainable Chem. Eng. 2021, 9, 45. ³¹	16
Figura 7.- Esquema de la estructura de la madera desde un árbol a la molécula de la celulosa y aplicaciones biomédicas mayores. Tomado y editado de Cellulose (2021) 28:1893–1931. ³⁶	17
Figura 8.- a) Dispersión de CNC al 1% en agua, c) Hidrogel de CNC al 15% en agua. Tomada y modificada de Chem. Soc. Rev., 2018, 47, 2609—2679. ⁴⁰	18
Figura 9.- Cuatro tipos de DES basados en la fórmula general.....	20
Figura 10.- Representación esquemática de los CNC derivados de las reacciones con (a) el DES de ChCl-ácido oxálico (OA) y (b) CNC derivada del proceso de hidrólisis. Tomado de Cellulose 2021, 28 (10), 6183–6199. ⁵⁸	22
Figura 11.- Método seguido para la preparación del DES y estructuras químicas del ácido oxálico dihidratado y cloruro de colina.	24
Figura 12.- Esterificación de la celulosa.....	25
Figura 13.- Proceso de liofilización de la CNC después del tratamiento de funcionalización con DES.	25
Figura 14.- a) Curva de valoración conductimétrica característica para ácidos fuertes. b) Curva de calibración típica para ácidos débiles con presencia de ácidos fuertes titulados con NaOH.....	29
Figura 15.- Reducción de MTT a Formazán.	34
Figura 16.- Representación del tratamiento agregado a la placa de 96 pozos.....	34
Figura 17.- Reducción de resazurina a resorufina.	35
Figura 18.- Diseño de experimento para el análisis de viabilidad celular por medio de la técnica Resazurina.	36
Figura 19.- Ejemplificación del retiro del sobrenadante para los lavados con PBS.	38
Figura 20.- Espectro FTIR de la CNC comercial (CNC-OSO ₃ H) y de la CNC carboxilada a diferentes tiempos de reacción (CNC-1h, CNC-2h, CNC-3h).	41
Figura 21.- Curvas de valoración conductimétrica para las muestras de CNC-OSO ₃ H valorado con NaOH (10mM), donde el punto de equivalencia corresponde a 1.63 mL, 1.65 mL y 1.57 mL respectivamente.....	41
Figura 22.- Curvas de valoración conductimétrica para las muestras de CNC-COOH funcionalizada a diferentes tiempos con DES (CNC-1h, CNC-2h, CNC 3h), valoradas con NaOH (10mM).....	42
Figura 23.- Imágenes de AFM en modo sensor de altura de a) los CNC antes del tratamiento con el DES (CNC-OSO ₃ H) y b) los CNC después de 3 horas de funcionalización con el DES CNC-3h.	43
Figura 24.- a) Imagen AFM de un nanocrystal de celulosa (CNC-OSO ₃ H) en dos dimensiones con una longitud de 208 nm. b) Imagen tridimensional del CNC mostrado en la imagen a. c) Perfil de altura	

de la línea dibujada en a y su longitud. d) Imagen AFM de un nanocrystal de celulosa (CNC-3h) en dos dimensiones con una longitud de 207 nm. b) Imagen tridimensional del CNC mostrado en la imagen d. c) Perfil de altura de la línea dibujada en a y su longitud.....	44
Figura 25.- Espectro XRD de las muestras de CNC secos, se muestran los CNC comercial (CNC-OSO ₃ H) y de los CNC carboxilados a las 3 horas de reacción con el DES.	45
Figura 26.- a) Pruebas de retención de agua. b) Soluciones de CNC al 1% en peso de CNC, CNC-3h liofilizada (izquierda), CNC comercial (derecha). c) Hidrogel de CNC-3h húmeda al 15% de CNC....	46
Figura 27.- Microscopía confocal de un hidrogel de CNC-3h, teñida con blanco de calcoflúor a una concentración de 2 wt% respecto a diferentes medios y se dejó incubar por 48 h a 37°C. a) CNC-H ₂ O b) CNC-DMEM-sSFB, c) CNC-DMEM-cSFB.....	47
Figura 28.- Microscopía electrónica de barrido de un hidrogel de CNC al 2 wt% respecto a diferentes medios, se dejó incubar por 48 h y se liofilizó. a) CNC-H ₂ O, b) CNC-DMEM-sSFB, c) CNC-DMEM-cSFB.....	48
Figura 29.- Barridos de deformación de a) CNC-AGUA y b) CNC-DMEM	50
Figura 30.- Barridos de frecuencia de a) CNC-AGUA y b) CNC-DMEM	50
Figura 31.- Ensayo de MTT para evaluar la toxicidad del material de los CNC funcionalizados a diferentes horas y a diferentes concentraciones en células de colon (HT-29) después de 24 h de incubación. El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA-two way, con el Software GraphPad Prism; en donde * p<0.05, indicando que es significativamente diferente respecto al control. Además, se presenta una diferencia significativa entre medias de CNC 3h (4, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL) y entre las medias de CNC 2h (4, 2, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL).	52
Figura 32.- Ensayo de MTT para evaluar la toxicidad del material de los CNC funcionalizados a diferentes horas y a diferentes concentraciones en fibroblastos (3T3-L1) después de 24 h de incubación. El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA-two way, con el Software GraphPad Prism; en donde no se mostraron diferencias significativas respecto al control. Además, se demostró que existe una diferencia significativa entre las medias de CNC-0h y CNC-1h a una concentración de 1.5 mg/Ll.....	53
Figura 33.- Reacción de las muestras de CNC con el DMEM antes de los lavados con PBS.	54
Figura 34.- Ensayo Azul Alamar utilizando resazurina para evaluar la actividad metabólica de las células de colon HT-29 en contacto con 20 mg/mL de CNC funcionalizados a diferentes tiempos. El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA-two way, con el Software GraphPad Prism; en donde * p<0.05 que demuestra que se mostraron diferencias significativas respecto al control. Además, se demostró que existe una diferencia significativa entre las medias de los pozos en CNC-1h y CNC-3h.....	55
Figura 35.- Ensayo Azul Alamar utilizando resazurina para evaluar la actividad metabólica de fibroblastos 3T3-L1 en contacto con 20 mg/mL de CNC funcionalizados a diferentes tiempos. El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA-two way, con el Software GraphPad Prism; en donde * p<0.05 que demuestra que se mostraron diferencias significativas respecto al control. Además, se demostró que existe una diferencia significativa entre las medias de los pozos en CNC-1h y CNC-3h, también en los hidrogeles entre CNC 3h con CNC 1h y CNC2h.....	56
Figura 36.- Imágenes obtenidas por el microscopio confocal donde se tomó un z-Stack con cinco diferentes canales. En rojo fibroblastos 3T3-L1 (yoduro de propidio), en azul hidrogel de CNC-3h al 2% en peso (blanco de calcoflúor). Imágenes ordenadas de los planos superiores a los inferiores del z-Stack que corresponden con a), b), c) y d) respectivamente.	58

Figura 37.- Reconstrucción tridimensional. a) Vista superior. b) Imagen espejo de (a) Se remarcan las células en 3D. 59

Figura 38.- Reconstrucción tridimensional vista lateral. Se aprecian las células 3T3-L1 marcadas en la Figura 37 como 1, 2 y 3..... 59

Figura 39.- Curva de calibración para concentraciones conocidas de BSA..... 60

3 Introducción

3.1 Tejidos

En el proceso de crecimiento de los organismos multicelulares complejos como las plantas y los animales, las células progenitoras experimentan cambios que las convierten en diferentes tipos de células, cada una con sus propias composiciones, estructuras y funciones características. Las células de un tipo dado suelen agruparse para formar un tejido y desempeñar cooperativamente una función común.¹ Un tejido es la unidad básica de la estructura de los órganos, el cual está compuesto de un conjunto de células similares que se agrupan para llevar a cabo una función específica. Distintos tejidos pueden organizarse para formar un órgano. Cuando las células diferentes de los tejidos funcionan coordinadamente permite que el organismo realice muchas actividades esenciales.

Los diferentes tejidos, a pesar de su forma y función se agrupan en cinco clases principales: epitelial, conectivo, muscular, nervioso y sangre.

3.1.1 Tejido conectivo y no conectivo

3.1.1.1 *Tejido conectivo (no epitelial)*

El tejido conectivo se distingue de otros tejidos sólidos por su composición, ya que la mayor parte de su volumen está formado por matriz extracelular (MEC) en lugar de células. Aunque existen varios tipos de células presentes en los tejidos conectivos, la mayoría de sus componentes son producidos por fibroblastos. Los fibroblastos son células mesenquimales diversas que participan en el mantenimiento del tejido al producir una MEC compleja y crear nichos de señalización a través de señales biológicas y bioquímicas.²

Estos componentes comúnmente suelen ser fibras proteicas insolubles, proteoglucanos, diversas proteínas multiadhesivas y hialuronano, un glicosaminoglicano no sulfatado de gran tamaño. La proteína más abundante en el tejido conectivo es el colágeno, esta molécula se suele asociar para formar polímeros fibrilares que proporcionan resistencia mecánica entre los tejidos conectivos.³

3.1.1.2 *Tejido no conectivo (epitelial)*

El tejido epitelial es aquél que cumple la función de revestir las superficies internas y externas de los órganos, este suele ser una capa similar a una lámina y se conoce como epitelio. Las células del tejido

epitelial se clasifican como células polarizadas debido a que sus membranas plasmáticas están estructuradas en al menos dos regiones separadas. Las diferentes superficies en una célula epitelial se denominan apical (parte superior), basal (parte inferior) y lateral (lados). La basal generalmente entra en contacto con la MEC subyacente. La lateral y basal, juntas se encuentran en el lado más cercano a los vasos sanguíneos. Y el lado apical es el que se encuentra en contacto con la sangre.¹

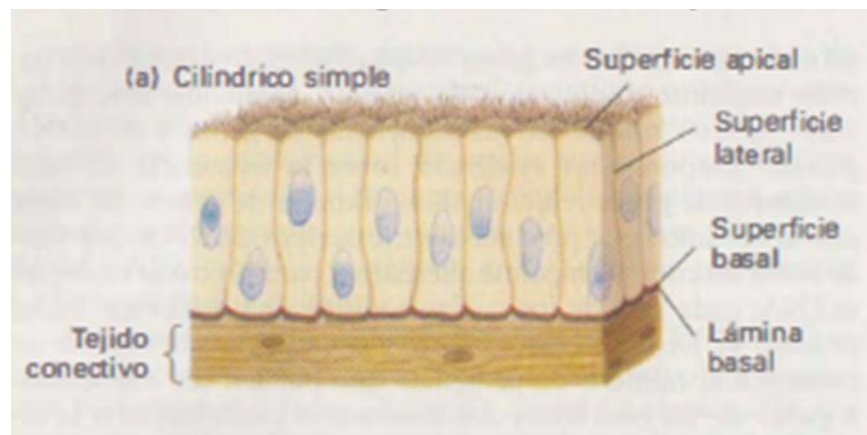


Figura 1.- Esquema representativo de las diferentes superficies de una célula epitelial polarizada y su interacción con el tejido conectivo.

Estas láminas del tejido epitelial de varias capas pueden actuar como barreras que sean selectivamente permeables, regulables, además de generar comportamientos en el organismo que pueden ser químicos. La lámina de tejido epitelial de una sola capa actúa como medio para transportar iones y moléculas pequeñas de un lado de la capa a otro. Además, este epitelio puede presentar morfologías y funciones específicas al encontrarse en diversas partes del cuerpo. Los epitelios de varias capas.

3.1.2 Matriz Extracelular (MEC)

La Matriz Extracelular (MEC) es una matriz fibrosa típicamente compuesta de sustancias bioquímicas que son segregadas por las células que habitan el tejido u órgano. En consecuencia, la composición y topología de la MEC es única para cada tejido y varía dependiendo de las necesidades fisiológicas, esto hace que esta proporcione las condiciones para que todas las clases de células puedan sobrevivir y proliferar.⁴ Está compuesta de proteínas estructurales (laminina, colágeno, fibronectina), factores de crecimiento, polisacáridos y glicosaminoglicanos dispuestos en una estructura tridimensional.⁴

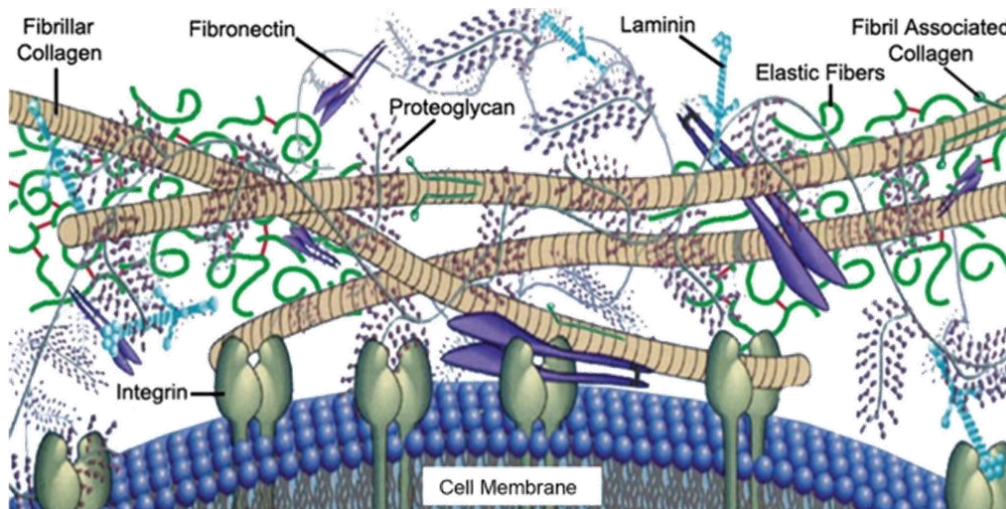


Figura 2.- Imagen representativa de la MEC y las proteínas que la componen. Tomado y editado de *Biomaterials* (2016), 86, 68-82.⁴

La MEC que brinda el entorno, que sirve como soporte físico esencial, desencadena señales bioquímicas y biomecánicas requeridas para que se genere la difusión de nutrientes, transferencia de desperdicios metabólicos y el transporte de gases, también permite que las células presenten morfogénesis, diferenciación y homeóstasis del tejido.⁵

En la MEC de todos los tejidos, predominan tres tipos de moléculas: en primer lugar, los proteoglucanos altamente viscosos que amortiguan el contacto entre las células y unen moléculas extracelulares; las fibras de colágeno, que proporcionan fuerza mecánica y elasticidad a los tejidos y; las proteínas multiadhesivas, que se unen e interconectan los receptores de adhesión de la superficie celular y otros componentes en la MEC.

Para los tejidos conectivo y no conectivo existen moléculas particulares para cada tejido. Los principales componentes para el tejido no conectivo son el colágeno tipo IV, lamininas, entactina y perlecano.

In vitro, los avances en medicina, ingeniería y biología permiten mimetizar las condiciones físicas y químicas de un sistema vivo. El cultivo de células en 3D *in vitro* proporciona un modelo robusto para desarrollar terapias más efectivas contra el cáncer haciendo investigaciones en su progresión, nuevas estrategias para la detección de drogas y permite una mejor comprensión de cómo las células interactúan entre sí y con su entorno. Los cultivos en 3D necesitan inducir respuestas morfológicas y fisiológicas correctas, expresión de genes, polaridad y morfología celular.

Para el cultivo celular, es imprescindible un material capaz de mimetizar las características físicas, químicas y mecánicas de la MEC que contenga una estructura tridimensional, gelatinosa y flexible, estas características brindarán el soporte necesario para generar el crecimiento, proliferación y comunicación entre las células.⁶ Además, es necesario evaluar su biocompatibilidad en términos de falta de toxicidad, adhesión celular, propiedades de proliferación y habilidades para diferenciarse en un nuevo tejido.

Los hidrogeles son materiales altamente versátiles particularmente prometedores en los campos de biología y medicina. Debido a su capacidad de sintonización, los hidrogeles han demostrado su potencial en varias aplicaciones biomédicas, que incluyen andamios para tejidos⁷, lentes de contacto⁸, curación de heridas⁹, sistemas de liberación controlada de fármacos¹⁰ y dispositivos de diagnóstico¹¹.

3.1.3 Cultivo celular

La célula es la unidad elemental de los seres vivos. En general, está constituida de una membrana fluida, organelos especializados y material genético. Las células se someten a diferenciación y son el origen de tejidos especializados y altamente organizados.¹²

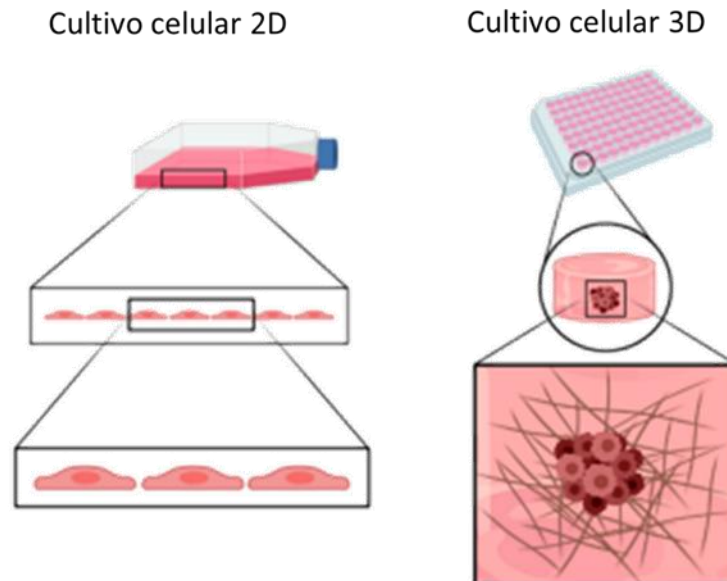


Figura 3.- Comportamiento celular cultivo celular 2D, donde no se representa la morfología fisiológica real vs 3D las células se cultivan en un ambiente similar a in vivo. Tomado y editado de Nanomaterials 2021,11481.¹³

En el medio natural dentro de todos los tejidos y órganos, la mayoría de las células crecen en un entorno tridimensional (3D) donde están rodeadas por una matriz extracelular (MEC). La disposición

tridimensional de las células está regulada por las características estructurales de la MEC, que al brindar soporte, altera la respuesta celular al estrés mecánico, lo que conduce a la regulación de un destino morfológico celular a través de la mecanotransducción en respuesta a la tensión ejercida por las células.¹⁴

3.2 Hidrogeles

Los hidrogeles son redes de polímeros tridimensionales, flexibles, capaces de retener una gran cantidad de agua en su estado hinchado. Estos están hechos de materiales naturales o sintéticos, y pueden reticularse mediante enlaces covalentes, complejación iónica, enlaces de hidrógeno y mediante interacciones hidrófobas.^{15 16} Además, las propiedades que presentan los hidrogeles son de gran interés para aplicaciones biomédicas como las mecánicas, biocompatibilidad, degradación, porosidad, o hinchamiento.¹⁷

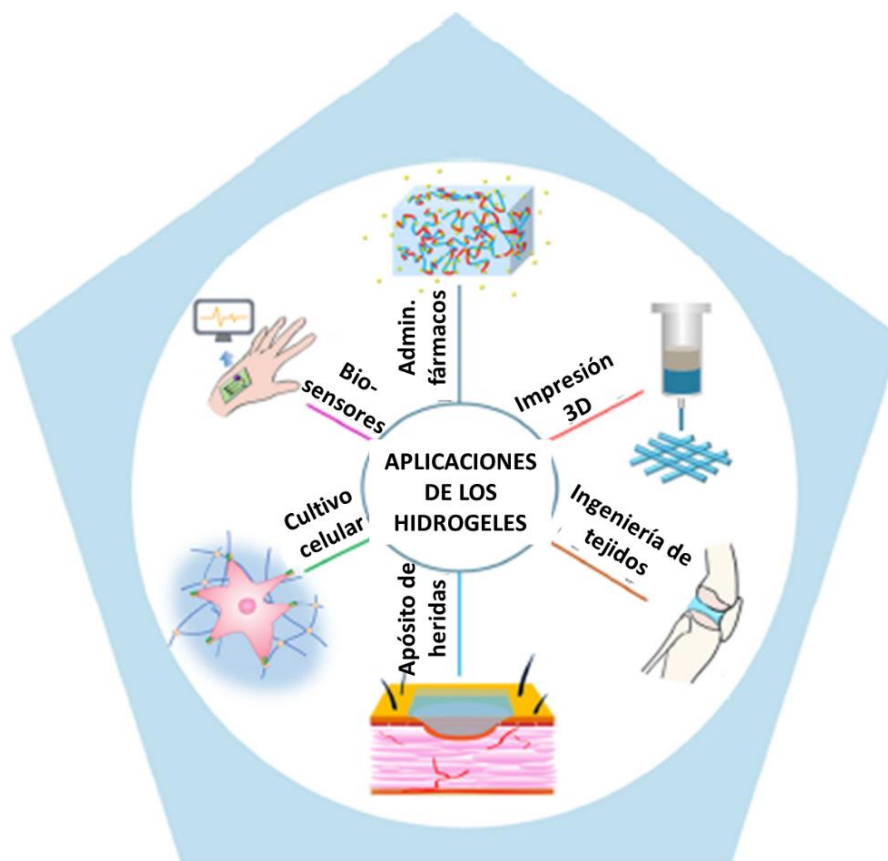


Figura 4.- Aplicaciones de los hidrogeles. Tomado y editado de Carbohydrate Polymers 283 (2022) 119161.¹⁸

3.2.1 Características de un hidrogel para aplicaciones biomédicas

La capacidad de los hidrogeles para modificarse y replicar las condiciones físicas y bioquímicas encontradas en el sistema biológico implica la necesidad de cumplir con ciertos requisitos específicos en términos de propiedades mecánicas, estabilidad en el pH, fuerza iónica y temperatura. Otro aspecto importante en los hidrogeles es el tamaño de la red del hidrogel, controlar los poros permite diseñar la difusión de moléculas en la matriz. Cuando el tamaño de la red es menor que el diámetro de las biomoléculas, el hidrogel actúa como un filtro que impide la difusión de las biomoléculas y viceversa.¹⁹ Es crucial que la estructura de la red del hidrogel sea lo suficientemente flexible y resistente, principalmente cuando se requiere mantener partículas como células, proteínas o nanopartículas en su interior.²⁰

En términos de cultivo celular tridimensional, los parámetros importantes de los hidrogeles incluyen resistencia mecánica, elasticidad, porosidad, facilidad de funcionalización, biodegradabilidad y compatibilidad celular. La síntesis de los hidrogeles normalmente incluye un último paso de lavado para remover los reactivos que potencialmente pueden dañar células o tejidos. Si es requerido, la esterilización por radiación de UV puede ser utilizada para minimizar la aparición de contaminaciones por microorganismos como bacterias u hongos.²¹

Existen factores cruciales que representan barreras significativas en cuanto al uso extensivo de los hidrogeles en el campo biomédico. La mayoría de los polímeros utilizados suelen derivarse de un origen sintético, no biodegradable o reciclable, lo que representa grandes desafíos en cuanto a su sustentabilidad ambiental.²²

3.2.2 Desventajas de los hidrogeles actuales

Durante décadas se han estudiado hidrogeles de diferentes materiales para diversas aplicaciones biomédicas, algunos de ellos han desencadenado en propiedades o características no deseadas al hacer un cultivo celular.

Existen hidrogeles basados en alginatos, ácido hialurónico y polietilenglicol que en su forma no modificada suelen ser rígidos (en el orden de 10 s de kPa), presentan un tamaño de poro pequeño en el orden de nanómetros, no soportan una adhesión celular fuerte (basada en integrinas) y no pueden ser degradados por proteinasas secretadas por células. Como resultado, las células embebidas en estos hidrogeles pueden sobrevivir por semanas, mantenerse esféricas, migrar mal y proliferar lentamente.²³

Varias investigaciones han reportado que Matrigel ofrece un entorno mecánico y químico óptimo para el cultivo de células *in vitro*, debido a que es capaz de mimetizar las propiedades encontradas *in vivo* en la MEC. Matrigel es un hidrogel comercial derivado de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Lamentablemente, debido a su origen biológico, Matrigel podría llevar patógenos y antígenos no identificables, además presenta variaciones lote a lote que afectan la reproducibilidad de estudios comparativos con el crecimiento de las células.^{24 25}

Un material de hidrogel natural prometedor para cultivo celular son aquellos hechos con nanocristales de celulosa (CNC), estos también son utilizados como materiales biomédicos para aplicaciones en ingeniería de tejidos. El interés en estas aplicaciones se debe a las estructuras ligeras y resistentes que se pueden producir de forma eficaz. Los hidrogeles de nanocelulosa se han destacado como un material altamente versátil, sustentable, no tóxico y renovable para múltiples aplicaciones biomédicas, entre ellas el cultivo celular.

3.3 Celulosa

La celulosa es el polisacárido más común en la naturaleza y se encuentra en mayor cantidad en plantas, donde actúa como componente principal, aunque también se puede encontrar en bacterias y algas. La nanocelulosa puede ser extraída de madera o plantas por tratamiento mecánico, enzimático o químico para primero remover los residuos de lignina y hemicelulosa y después para deconstruir la estructura celulósica jerárquica.²⁶

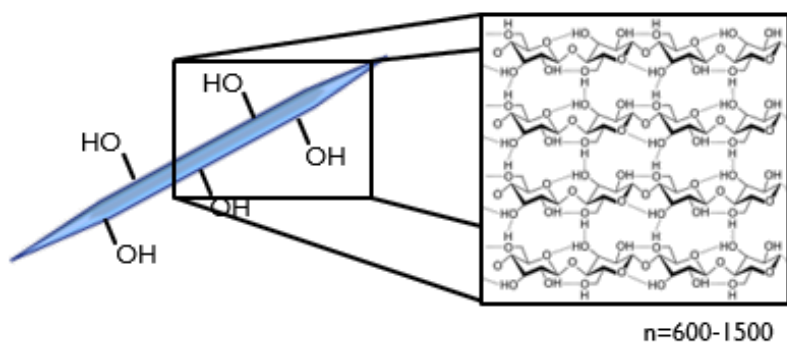


Figura 5.- Estructura química de la celulosa.

Este polímero lineal está compuesto de moléculas D-glucopiranosas y presenta enlaces covalentes beta-1,4-glucosídicos, donde el carbono C1 de una molécula está unido al carbón C4 de la unidad adyacente. En cada unidad de glucopiranosas, existen dos grupos hidroxilos secundarios en C2 y C3,

así como un grupo hidroxilo primario en C6, además de un átomo de oxígeno en el grupo éter. Estos enlaces controlan su habilidad para enlazarse con hidrógenos, su organización en estructuras jerárquicas que pueden afectar su solubilidad en agua, y las propiedades mecánicas de las estructuras formadas. La celulosa es insoluble en agua y forma suspensiones coloidales.²⁷ La unidad repetitiva de la celulosa se denomina celubiosa.²⁸

Las interacciones hidrofóbicas predominan en la estructura cristalina celulósica, lo que influye en su solubilidad debido a la naturaleza anfifílica del polímero. Esta asociación desempeña un rol fundamental en la solubilidad de la celulosa, lo que la hace insoluble en agua y que tienda a formar suspensiones coloidales.²⁷

En las últimas décadas la celulosa ha experimentado un aumento significativo en su utilización, debido a su abundancia y versatilidad en la creación de una amplia gama de nanomateriales. Los nanomateriales de celulosa (CNM) varían en tamaño, proporción, forma y composición química superficial. Se pueden obtener varios tipos de CNM a partir de la celulosa utilizando diferentes métodos, estos pueden ser nanofibras de celulosa (CNF), celulosa bacteriana (BNC) y los nanocristales de celulosa (CNC).

3.3.1 Nanocristales de celulosa (CNC)

Los nanocristales de celulosa (CNC) son partículas en forma de aguja, generalmente con dimensiones que oscilan entre los 2-50 nm de ancho y 100-200 nm de largo, que han atraído atención significativa en muchas investigaciones. Están compuestos por fragmentos de cadenas de celulosa y exhiben una estructura altamente cristalina. Es posible obtener varios tipos de CNC con variaciones en estructura, morfología, propiedades fisicoquímicas y aplicaciones y esto depende de factores como el origen y madurez de la celulosa, las condiciones de reacción y los métodos de procesamiento utilizados.²⁹

Los CNC son un tipo de material único que deriva de las fibras naturales de la celulosa. Estos tienen excelentes propiedades como alta relación de aspecto, baja toxicidad, un excelente rendimiento mecánico y buena biocompatibilidad. Es bien sabido que su alta fuerza mecánica es atribuida a su alta estructura cristalina y a la existencia de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. Además, su gran área superficial y su abundancia en grupos hidroxilo proporciona la posibilidad de modificaciones químicas.³⁰

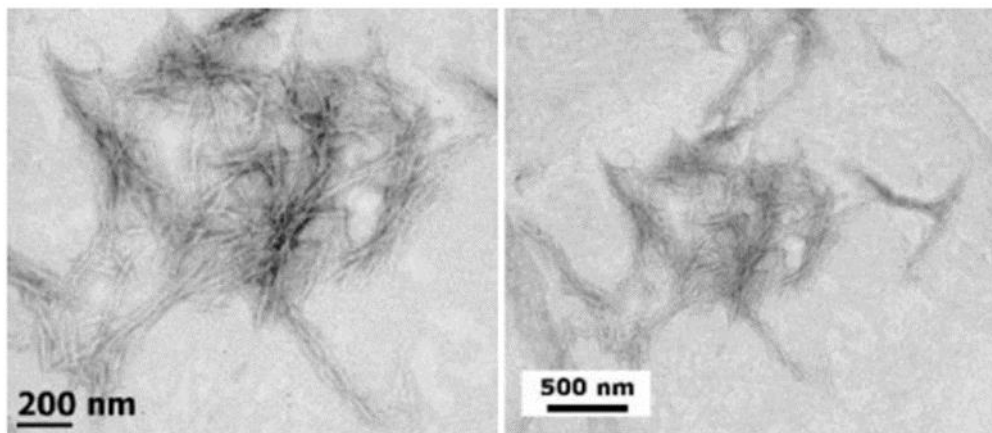


Figura 6.- Micrografía TEM de los CNC marca CelluForce NCC. Tomado de ACS Sustainable Chem. Eng. 2021, 9, 45.³¹

3.3.2 Obtención de los CNC

Los CNC se obtienen por hidrólisis con ácido fuerte de la pulpa de celulosa, disolviendo las partes amorfas de las fibras mientras sus dominios cristalinos se mantienen intactos. Los ácidos comúnmente usados para la síntesis de los CNC son ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico.³² Dependiendo del tipo de fuente de celulosa y del proceso del tratamiento va a variar el tamaño de los CNC.

El primer paso en la obtención de los CNC es la eliminación completa o parcial de materiales no celulósicos de la materia prima para producir fibras de celulosa individuales a partir de un compuesto ácido en una concentración conocida (hidrólisis ácida). Las moléculas de ácido penetran en las fibras de celulosa y luego se rompen las regiones amorfas para formar los CNC. Además, se ha informado que sales inorgánicas y sales de metales de transición, actúan como catalizadores en la hidrólisis ácida.^{33 34}

La hidrólisis enzimática es un método alternativo que es económico y ambientalmente viable. Se utilizan celulasas que actúan como catalizadores, la endoglucanasa se ataca, hidroliza y degrada las regiones amorfas de una mezcla, mientras que la exoglucanasa reacciona con la cadena celulósica desde los extremos reductores o no reductores.³⁵ Estas enzimas trabajan en sinergia en la hidrólisis de la celulosa.

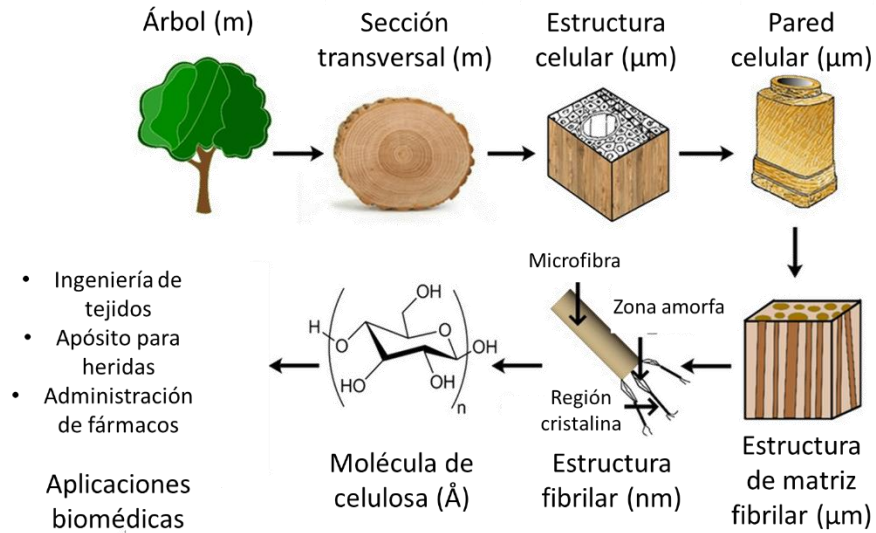


Figura 7.- Esquema de la estructura de la madera desde un árbol a la molécula de la celulosa y aplicaciones biomédicas mayores. Tomado y editado de *Cellulose* (2021) 28:1893–1931.³⁶

Se han empleado métodos mecánicos como la microfluidización, la ultrasonificación y la homogeneización a alta presión o la molienda con bolas, en combinación con otros métodos, para la producción de CNC. Además, numerosos estudios han demostrado recientemente que los solventes eutécticos profundos (DES) pueden utilizarse como medios de reacción eficientes y alternativos para la hidrólisis controlada y selectiva de la celulosa para aislar CNCs.³⁷ Independientemente de su fuente, todos los tipos de nanocelulosa pueden formar hidrogeles.

3.3.3 Hidrogeles de CNC para aplicaciones biológicas

Los hidrogeles de celulosa son materiales suaves con alto contenido de agua (de 95 a 99.9% en peso), presentan una red con poros de diferentes diámetros y rigidez que, exhiben excelentes propiedades mecánicas.³⁸ Además, difieren de muchos hidrogeles ya que su polímero constitutivo es insoluble en agua. Esto significa que los CNC forman una suspensión coloidal en agua mientras otros geles forman una solución.³⁹ Esta suspensión provoca que se generen interacciones entre los CNC que ayudan a mantener la estructura de hidrogel. Las fuerzas de interacción física incluyen la electrostática, enlaces de hidrógeno, enredo de cadenas, Van der Waals, e interacciones hidrofóbicas e iónicas. Estas interacciones reversibles se alteran fácilmente cuando la fuerza interactuante entre las fibras se desintegra.

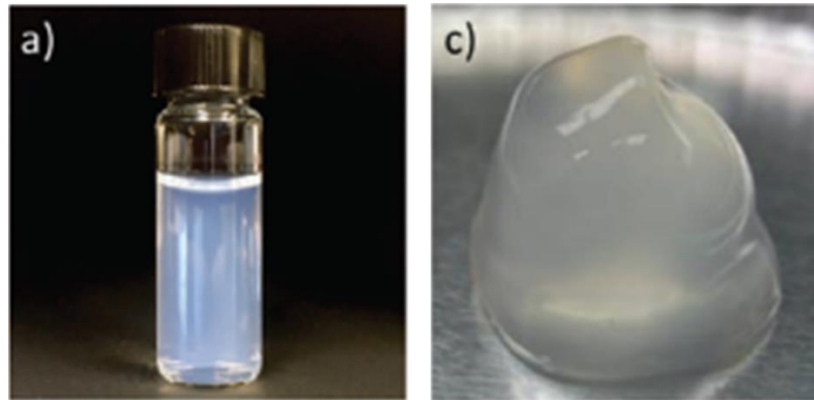


Figura 8.- a) *Dispersión de CNC al 1% en agua, c) Hidrogel de CNC al 15% en agua. Tomada y modificada de Chem. Soc. Rev., 2018, 47, 2609—2679.*⁴⁰

Los hidrogeles a base de CNC ya han sido clasificados como no citotóxicos, no carcinógenos, son biodegradables y biocompatibles y presentan propiedades térmicas y mecánicas deseadas, lo que los hace una opción competitiva para múltiples aplicaciones biomédicas. Además, los CNC muestran una buena habilidad de hinchamiento macroscópico debido al efecto osmótico también conocido como entropía del contraíón.¹⁶ Esto significa que las cadenas de polímero cargado en un medio acuoso deben estar rodeadas de contraiones para alcanzar la neutralidad electrostática.⁴¹

Esta capacidad de absorber agua permite el control del tamaño de poro y su distribución dentro de la estructura local del gel; esto también afecta las propiedades mecánicas del gel como flexibilidad y rigidez. Al igual que otros hidrogeles, es posible ajustar este entorno acuoso a cierto pH o fuerza iónica específica mientras se mantiene la estructura de red y la estabilidad coloidal.⁴² Además, se pueden añadir aditivos como azúcares, sales o aminoácidos para lograr un equilibrio osmótico y regular el flujo de agua en el medio.⁴³

Los CNC con superficies modificadas se utilizan como agentes antibacterianos y antivirales, andamios para ingeniería de tejidos, biomarcadores o sensores, vectores génicos, vehículos de administración de medicamentos y andamios para biocatalizadores.

Cuando se trata de cultivo celular, la mayoría de las células en nuestro organismo requieren un punto de anclaje, lo que implica que necesitan adherirse a un sustrato para mantenerse con vida. Sin embargo, en el caso de los hidrogeles diseñados para la encapsulación de células, suelen carecer de las interacciones de unión necesarias. Por lo tanto, es fundamental incorporar compuestos que promuevan la adhesión celular en estos hidrogeles para permitir la unión celular y, al mismo tiempo, mantener la viabilidad celular.⁵

Los hidrogeles de CNC presentan una alta relación de aspecto y área superficial, lo que los convierte en candidatos ideales a ser químicamente modificados con grupos funcionales o incorporando biomoléculas.¹⁶ La funcionalización de los CNC proporciona mejoras en las propiedades físicas o químicas y un mejor control de interacciones biológicas, adaptando los hidrogeles a aplicaciones específicas.

3.3.4 Técnicas de modificación superficial para los CNC para aplicaciones biomédicas.

Escoger la técnica más apropiada para procesar el hidrogel de CNC dependerá de la aplicación final deseada y sus requerimientos. Una de las reacciones más comunes es la esterificación de la celulosa, ya que esta es base para otros tipos de modificación superficial.⁴⁴ Después de la hidrólisis de las materias primas, los CNC resultantes tienen diferentes grupos funcionales en su superficie dependiendo del agente de hidrólisis. La mayoría de estos grupos se pueden utilizar para anclar otras moléculas en los CNC a través de diversas reacciones. Algunos de los métodos más importantes de modificación superficial son:

- Oxidación: Se utiliza el reactivo 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il-oxidanilo (TEMPO) para oxidar CNC carboxilados.
- Amidación: Se utiliza el reactivo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDCI) el cual se aplica siempre durante la conjugación de proteínas en la superficie de los CNC carboxilados.
- Esterificación: Se pueden utilizar piridina, microondas, TEMPO o anhídros ácidos para esterificar los CNC sulfatados, oxidados o fosforilados.
- Carbamación: Los isocianatos pueden reaccionar con los grupos hidroxilo en la superficie de los CNC. Estas reacciones suelen utilizarse para la modificación de la superficie de los CNC con moléculas fluorescentes u otros grupos funcionales.

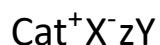
Sin embargo, las técnicas utilizadas para crear estos grupos funcionales deseados utilizan disolventes o productos químicos que suelen ser tóxicos y no biodegradables.

3.4 Solventes Eutécticos Profundos (DES)

Los disolventes eutécticos profundos o DES por sus siglas en inglés (Deep Eutectic Solvent) son sustancias químicas novedosas y prometedoras que pueden funcionar como disolventes, reactivos y catalizadores en muchas aplicaciones.⁴⁵

Los DES son mezclas binarias de sales cuaternarias de amonio (aceptores de enlaces de H) con un donador de enlaces de H, cuya composición corresponde a un punto eutéctico.⁴⁶ Estos componentes forman una mezcla eutéctica, lo que lleva a una significativa disminución del punto de congelación, con un punto de fusión más bajo que los componentes individuales y se obtiene una temperatura de transición vítrea.⁴⁷

Existen cuatro clasificaciones de DES los cuales están basados en la fórmula general descrita por Abbott et al.⁴⁸ En la Figura 9 se observa un diagrama de estas clasificaciones. La diversidad de combinaciones posibles de los materiales iniciales proporciona una herramienta poderosa para controlar las propiedades físicas de los DES.



Donde: “Cat⁺” es normalmente un amonio, sulfonio o fosfonio; “X⁻” es una base de Lewis; “Y” representa un ácido de Lewis o ácido de Brønsted y; “z” es el número de moléculas “Y” que interactúan con el anión correspondiente.⁴⁹



Figura 9.- Cuatro tipos de DES basados en la fórmula general.

Los DES tipo III son los más estudiados en la literatura. Desde el primer informe de un DES reportado por Abbott et al.,⁵⁰ en el cual se utilizó una proporción molar 1:2 de coluro de colina (ChCl) y urea respectivamente, se han investigado nuevas combinaciones de donadores de enlace de hidrógeno y

aceptores de enlace de hidrógeno. Uno de los aceptores de enlaces hidrógeno más comunes es el ChCl, posiblemente por su disponibilidad, el cual se suele combinar con diferentes tipos de donadores de enlaces hidrógeno muy diversos.⁵¹ El ChCl ha despertado un gran interés en los DES debido a su bajo costo, baja toxicidad⁵², biodegradabilidad y biocompatibilidad⁵³ de la sal.

Los DES poseen una gran cantidad de características que los convierten en sustancias novedosas, entre estas se pueden encontrar: compatibilidad con el agua, baja presión de vapor, no inflamabilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad son características clave que hacen que los DES ofrezcan ambientes únicos.^{47 54} Además, los DES han ganado interés porque permiten que ocurran reacciones químicas que no habían sido encontradas en otros solventes, como en temperaturas y presiones extremas al tiempo que exhiben capacidades de solvatación inusuales y conductividad iónica.⁴⁶

3.4.1 Aplicaciones de los DES en celulosa

Los DES a base de ChCl son sustancias novedosas que pueden ser aplicadas en múltiples áreas donde se destacan por sus aspectos medioambientales, económicos y tecnológicos. El interés en los DES para utilizarse como un solvente compatible con la celulosa se ha incrementado en los años recientes, aunque este sistema de solvente no disuelve la celulosa, se ha investigado para varias aplicaciones con resultados prometedores. *Abbott et al., 2006* Desarrollaron una cationización exitosa del algodón utilizando DES de ChCl y urea; esta ocurrió cuando el ChCl reaccionó con los grupos OH disponibles de la celulosa.⁵⁵ *Sirviö et al., 2015* promovieron la nanofibrilación de la pulpa blanqueada mediante un DES de ChCl y urea, también reportaron que algunas hemicelulosas pueden ser disueltas en el tratamiento y que los grupos OH pueden convertirse en carbamatos.⁴⁵

Estudios recientes demuestran que los DES basados en ChCl (ChCl/ácido oxálico, ChCl/urea) pueden ser usados para la modificación superficial de los nanocristales de celulosa y valorización de compuestos de celulosa obteniendo así ácidos carboxílicos y ésteres en la superficie de los materiales, estos grupos ayudan a la estabilización de los hidrogeles correspondientes.^{56 57}

3.4.2 Funcionalización de celulosa en DES

Los DES se han propuesto como una alternativa ecológica para la síntesis y disolución de nanomateriales de celulosa, incluyendo la funcionalización o incorporación de grupos carboxílicos aniónicos en la superficie de la celulosa. A pesar de esto, solo muy pocas investigaciones han reportado la funcionalización de la celulosa con algún DES.

Lim et al., 2021 describieron que el uso de DES de ChCl y ácido oxálico resultó en una CNC cargada con grupos COOH después de un tratamiento de hidrólisis ácida en la pulpa de celulosa.⁵⁸

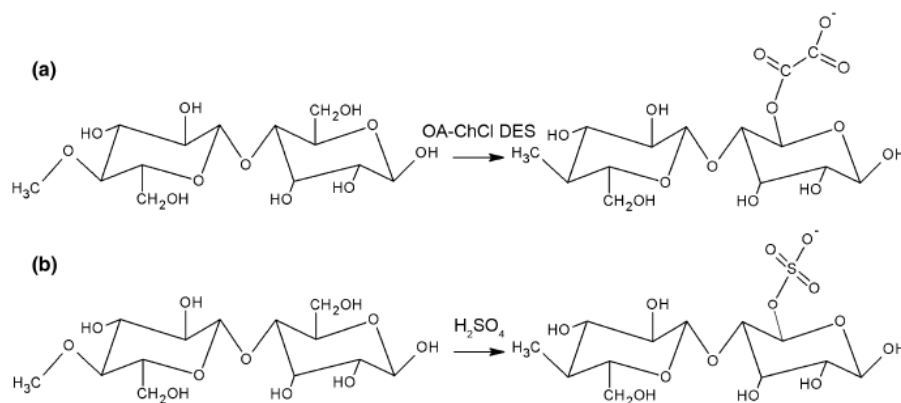


Figura 10.- Representación esquemática de los CNC derivados de las reacciones con (a) el DES de ChCl-ácido oxálico (OA) y (b) CNC derivada del proceso de hidrólisis. Tomado de *Cellulose* 2021, 28 (10), 6183–6199.⁵⁸

Sirviö et al., 2015 lograron cuantificar los mmol/Kg de grupos COOH en diferentes muestras de CNC tratados con DES de ChCl y ácido oxálico dihidratado y otro DES de ChCl y ácido oxálico anhidro, en diferentes relaciones molares y distintos tiempos de reacción.⁵⁶

Por otra parte, *Cao et al., 2022* estudió la carboxilación de la celulosa en un DES de ChCl y diferentes donadores de enlaces hidrógeno como ácido cítrico, málico, malónico, cítrico, oxálico y succínico.⁵⁹

Haciendo una comparación con uno de los métodos más utilizados para esterificar la superficie de la celulosa, como es el uso del TEMPO, el uso de DES sobresale en este proceso de funcionalización debido a la biodegradabilidad, baja toxicidad, facilidad de degradación y bajo costo. Aunque se han investigado varias aplicaciones prometedoras y se han llevado a cabo investigaciones en esta dirección, aún prevalece un conocimiento limitado en cuanto a las interacciones entre las fibras de celulosa y los DES.

4 Hipótesis

La funcionalización superficial de los nanocristales de celulosa con grupos carboxilos mediante un DES formado por ácido oxálico y cloruro de colina permitirá la formación de hidrogeles con propiedades fisicoquímicas y mecánicas básicas que puedan servir como estructuras de soporte tridimensionales para el cultivo de células en 3D.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Desarrollo de un gel en medio acuoso basado en nanocristales de celulosa (CNC) funcionalizada empleando sistemas eutécticos profundos (DES) que sirva como andamio para promover el cultivo tridimensional de células de tejido conectivo y no conectivo.

5.2 Objetivos específicos

- Estudiar la funcionalización de los CNC en DES compuesto de ácido oxálico dihidratado / cloruro de colina (OxAcDi/ChCl) en una relación equimolar (1:1).
- Caracterización de los CNC por FTIR, valoración conductimétrica, AFM, pruebas de retención de agua, XRD y reología.
- Estudio de la formación de geles con los CNC en medios de cultivo.
- Exploración comparativa en cultivos de células de tejido conectivo como fibroblastos (3T3-L1) y de tejido no conectivo células de colon (HT-29).

6 Métodos

6.1 Funcionalización de la CNC

Reactivos: Cloruro de Colina (ChCl, Sigma Aldrich, C7527, BioReagent, suitable for cell culture, suitable for insect cell culture, $\geq 98\%$), Ácido Oxálico Dihidratado (OxAcDi, Sigma Aldrich, 247537, ACS reagent, $\geq 99\%$), Nanocristales de Celulosa (CNC, CelluForce NCC[®]), Alcohol Etílico (Etanol, 96°), Agua desionizada.

6.1.1 Preparación del DES de Ácido Oxálico Dihidratado y Cloruro de Colina (OxAcDi/ChCl)

Procedimiento: Para preparar el DES se secó el ChCl en un frasco de 500 mL, el cual se colocó en un horno de convección a una temperatura de 90 °C durante 24 horas. Luego, se mezcló el ChCl con OxAcDi utilizando una relación molar 1:1, y se agregó un agitador magnético recubierto con teflón. El frasco se tapó herméticamente y se colocó en un baño de aceite, manteniendo una temperatura constante de 60°C. La agitación se mantuvo constante a 500 rpm hasta obtener un líquido homogéneo, viscoso y transparente, este proceso aseguró la formación del DES como se puede observar en la Figura 11.

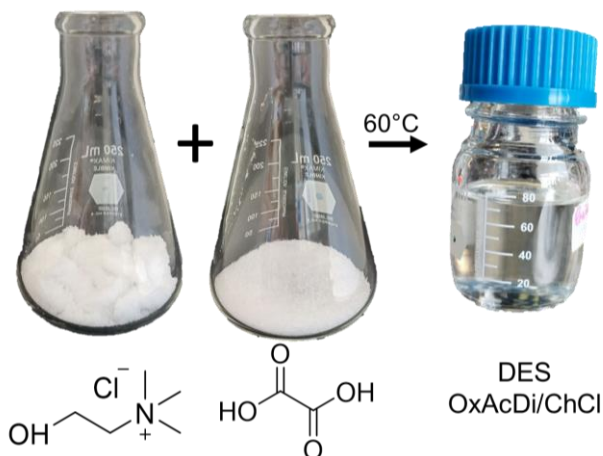


Figura 11.- Método seguido para la preparación del DES y estructuras químicas del ácido oxálico dihidratado y cloruro de colina.

6.1.2 Funcionalización de la CNC con DES

Procedimiento: Los CNC se colocaron en un frasco de vidrio junto con el DES OxAcDi/ChCl a 60°C en una relación al 1% en peso de CNC respecto al DES. Se llevó el frasco a agitación (vórtex) por 30 s hasta obtener una mezcla homogénea. Luego, el frasco se cerró herméticamente y se sumergió en

un baño de aceite a 60°C, con una agitación constante a 500 rpm. Este proceso se llevó a cabo durante un tiempo específico para cada muestra (CNC-1h, CNC-2h, CNC-3h). Para recuperar las muestras, se retiraron 4 mL de la solución bien agitada y se transfirieron a un Tubo Falcon de 15 mL donde se añadieron 10 mL de etanol para detener la reacción de esterificación (Figura 12). La mezcla se agitó nuevamente durante 30 s en un vórtex. Cada tubo Falcon se colocó en una centrífuga Centurion Scientific (1.K241) y se centrifugó por 5 min a 6,000 rpm (usando el rotor BRK 5324). Por último, se lavó cada muestra con etanol hasta que la conductividad del sobrenadante fue aproximadamente 54 $\mu\text{S}/\text{cm}$ que es la conductividad del etanol puro. Para los lavados se retiró el sobrenadante (en el cual se midió la conductividad), se agregaron 10 mL de etanol, se llevó el tubo Falcon al vórtex por 1.5 min y de nuevo se colocó en la centrífuga por 5 min a 6,000 rpm hasta que los CNC precipitaron formando una pastilla. Este paso se repitió 8 veces hasta que no se presentaron indicios de presencia de DES en la muestra.



Figura 12.- Esterificación de la celulosa.



Figura 13.- Proceso de liofilización de la CNC después del tratamiento de funcionalización con DES.

6.2 Caracterización de los CNC

CNC liofilizados: Con el fin de caracterizar los CNC se retiró completamente el líquido sobrenadante después del octavo lavado. Luego, los CNC se dispersaron en 5 mL de agua y se sometieron a agitación en un vórtex durante 1 min. A continuación, se procedió a congelar la muestra durante al menos 6 horas a -20°C , para finalmente liofilizar la muestra por 24 h para poder obtener un material seco (aerogel).

6.2.1 Análisis por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Se llevó a cabo un análisis mediante FTIR con el propósito de identificar los enlaces químicos y grupos funcionales presentes en los CNC en función del tiempo de exposición al DES. Para esto se recurrió a la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR).

En la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, la luz infrarroja interactúa con una muestra, y el equipo se encarga de medir la cantidad de luz absorbida, reflejada o transmitida después de dicha interacción. Cada espectro infrarrojo típico corresponde a un material con señales de absorción o reflejancia que representan las frecuencias de vibración entre los enlaces químicos que componen dicho material. Dado que cada material es una composición única de grupos funcionales, la FTIR proporciona una identificación química distintiva de las muestras.⁶⁰ Además, se puede utilizar para obtener información sobre una amplia gama de materiales, entre ellos los nanomateriales como los CNC. El espectro FTIR final muestra la absorbancia de la luz IR en función del número de onda.

Reactivos: Ácido clorhídrico (HCl) (Analytika, No. CAS 7647-01-0, 37%).

Procedimiento: Se pesaron 50 mg de cada muestra de los CNC liofilizados en tubos Eppendorf y a cada una se agregaron 250 μL de HCl 0.1 N para asegurar la protonación de los ácidos carboxílicos en el caso de los CNC-COOH y el ácido sulfónico en los CNC-OSO₃H (sulfatada comercial), posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente (25°C) por 24 h. La caracterización química de los CNC sin tratamiento (CNC-OSO₃H) y de los CNC tratados con DES a diferentes tiempos (1, 2 y 3 horas), se efectuó en un espectrofotómetro (Spectrum Two Perkin Elmer). Los espectros correspondientes a CNC-OSO₃H, CNC-1h, CNC-2h y CNC-3h fueron registrados a temperatura ambiente en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} y a una resolución espectral de 4 cm^{-1} utilizando el modo ATR.

6.2.2 Valoración conductimétrica

La densidad de carga en la superficie de los CNC proporciona la repulsión electrostática necesaria para mantener su estabilidad coloidal en suspensiones acuosas. Además, las propiedades físicas y químicas del material se pueden ver influenciadas por esta carga superficial. Para cuantificar de manera precisa tanto los ácidos fuertes (CNC-OSO₃H) como los ácidos débiles (CNC-COOH) presentes en la superficie de la CNC funcionalizada y comercial se deben seguir protocolos distintos. En este sentido, se llevó a cabo el ensayo de valoración conductimétrica descrito por *Foster et al. en Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47 (8), 2609-2679.⁴⁰

Reactivos: Agua desionizada, Cloruro de sodio (NaCl, Sigma Aldrich, 793566, Anhydrous, free-flowing, Redi-Dri ≥99%), Hidróxido de sodio (NaOH, Analytyka, No. CAS 1310-73-2, lenteja, P.M. 40.00), HCl (Analytyka, No. CAS 7647-01-0, 37%).

- a) Procedimiento para ácidos fuertes: Se agregaron 0.1 g de CNC-OSO₃H a valorar en un vial de 12 mL y se añadieron 10 mL de agua desionizada para tener una muestra al 1%. Posteriormente se agitó la mezcla en un vórtex por 1 min luego se sonicó por 5 min y se repitió este paso 3 veces. La solución anterior se diluyó en 197 mL de agua desionizada, se dejó en agitación a 500 rpm por 5 min hasta que toda la mezcla quedó homogénea. Utilizando el conductímetro HANNA Instruments (HI763 100), previamente calibrado, se anotó la medida de conductividad. Se agregaron 2 mL de NaCl (100 mM) para incrementar la conductividad de la solución a un rango apreciable y se anotó la conductividad 1 min después. En agitación constante se añadieron 100 µL de NaOH (10 mM). Para este paso el pH debería estar cerca de 5 dependiendo de la concentración de CNC y la densidad de carga. Para cada adición de NaOH se debe permitir que la conductividad estabilice por 45 s antes de anotar el valor. Al llegar al punto equivalente, el exceso de NaOH debe ser añadido para obtener suficientes datos registrados para una regresión lineal estadísticamente significativa, aproximadamente el mismo número de puntos existentes antes del punto de equivalencia. Las mediciones se realizaron por triplicado.
- b) Procedimiento para ácidos débiles: Se diluyeron 10 mL de CNC-COOH al 1% en 197 mL de agua desionizada, se dejó en agitación a 500 rpm por 5 min hasta homogeneizar la mezcla. Utilizando el conductímetro, previamente calibrado, se anotó la medida de conductividad cuando esta se estabilizó. Se agregaron 2 mL de NaCl (100 mM) para incrementar la conductividad a un rango apreciable y se anotó la conductividad 1 min después. Se agregó

1 mL de HCl (100mM) para compensar la carga iónica y nuevamente se anotó el valor de conductividad después de estabilizar la reacción por 1 min. En agitación constante se añadieron 100 μ L de NaOH (10 mM). Para cada adición de NaOH se debe permitir que la conductividad se estabilice por 45 s antes de anotar el valor. Al llegar al punto equivalente, se debe añadir un exceso de NaOH.

Dado que la conductividad está directamente relacionada con la cantidad de electrolitos en solución es fundamental que la conductividad medida sea ajustada según el volumen de NaOH añadido a cada punto. Este ajuste se realiza utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Conductividad}_c = (\text{Conductividad}_m) \left(\frac{V_i + V_0}{V_i} \right) \quad (1)$$

En ambos tipos de ensayos, la cuantificación de los grupos CNC-OSO₃H y CNC-COOH se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$-\text{OSO}_3\text{H} / -\text{COOH} = \left(\frac{\text{vol}_{\text{NaOH}} \times [\text{NaOH}]}{m_{\text{CNC}}} \right) \quad (2)$$

Cálculo de la carga molar equivalente:

CNC-OSO₃H: Se calcula mediante el volumen de NaOH añadido a una concentración molar conocida, el cuál es determinado como la intersección de las dos regresiones (punto de neutralización) que corresponde a la cantidad de ácidos fuertes -OSO₃H presentes en la superficie de la CNC. (Figura 14a).

CNC-COOH: Se calcula mediante dos puntos de equivalencia (PE); el primero es la zona en que el NaOH ha titulado todos los ácidos fuertes y el segundo es donde el NaOH ha titulado todos los ácidos débiles. El contenido de ácidos carboxílicos corresponde a la diferencia de volumen de NaOH añadido entre ambos puntos de equivalencia. (Figura 14b)

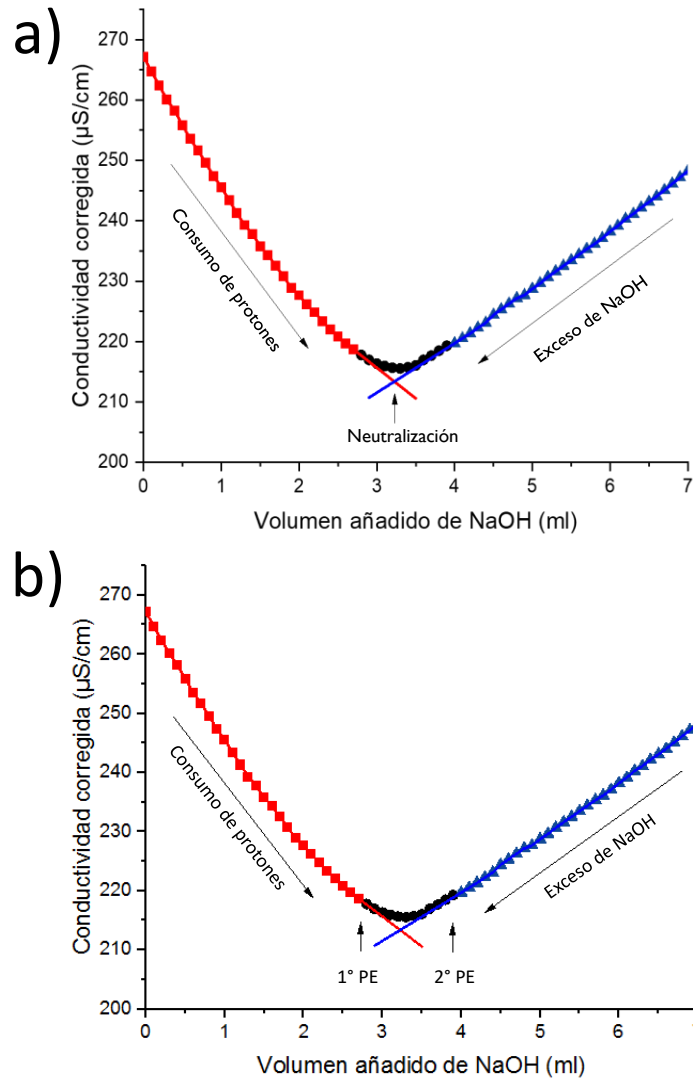


Figura 14.- a) Curva de valoración conductimétrica característica para ácidos fuertes. b) Curva de calibración típica para ácidos débiles con presencia de ácidos fuertes titulados con NaOH.

6.2.3 Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La AFM es una técnica que implica un proceso en el que un escáner piezoeléctrico barre la superficie de una muestra. Durante este proceso, la interacción punta/superficie se detecta por un fotodiodo, que determina con gran precisión las variaciones en la inclinación o amplitud de la oscilación de la punta. Esta capacidad de detección permite alcanzar una resolución a nivel atómico.⁶¹

Con el propósito de comprobar las dimensiones de partícula o aglomeraciones presentes en los CNC como resultado del proceso de funcionalización, se llevó a cabo un análisis a través de la técnica de AFM. Esta metodología se considera uno de los enfoques más efectivos para obtener esa información.⁶²

Procedimiento: Las muestras de CNC-OSO₃H y CNC-3h se dispersaron en agua desionizada y posteriormente se depositaron en un sustrato de silicio y se dejaron secar a temperatura ambiente para obtener una dispersión uniforme. Se utilizó un Microscopio de Fuerza Atómica marca Bruker (Dimension Edge) para examinar la morfología superficial de los CNC antes y después de la incorporación de los grupos -COOH en su superficie. Las imágenes fueron obtenidas en modo contacto con una sonda Bruker SL10.

6.2.4 Análisis por Difracción de rayos X (XRD)

Se realizó un estudio de XRD para poder verificar el índice de cristalinidad en la muestra de CNC funcionalizada y hacer una comparación con la CNC sulfatada comercial.

Procedimiento: Se utilizaron las muestras de CNC-OSO₃H y CNC-3h secas las cuales se colocaron en los porta muestras del equipo de Difracción de Rayos X Rigaku Ultima IV, la técnica se realizó mediante un análisis de polvos en un arreglo Bragg-Brentano.

Además, se calculó el índice de cristalinidad (CI) a partir de la intensidad del pico del plano cristalino principal (002) de la intensidad I_{max} a 22.4° y la intensidad I_{am} del pico a 18° asociado a la fracción amorfa de la celulosa, según la siguiente ecuación:⁶³

$$CI = \frac{I_{max} - I_{am}}{I_{max}} \times 100 \quad (3)$$

6.3 Hidrogeles de CNC

CNC húmedos: Para obtener una muestra que fuera capaz de hincharse después de la funcionalización, los CNC se suspendieron en etanol y se almacenaron a una temperatura de 4°C.

6.3.1 Pruebas de retención con agua

La ventaja clave de utilizar nanomateriales en diversas aplicaciones radica en su alta área superficial, como lo expresa la famosa frase *“there’s plenty of room at the bottom”*. Por lo tanto, resulta fundamental identificar las estrategias más efectivas para lograr la máxima dispersión en el medio de interés. Previo a la investigación de la potencial bioaplicación de los hidrogeles, se llevaron a cabo estudios para analizar cómo se hinchan los hidrogeles en agua en distintas concentraciones y bajo diferentes procesos de secado de los CNC una vez funcionalizados.

Procedimiento: (1) Se pesaron 100 mg de las muestras de CNC (CNC-OSO₃H y CNC-3h liofilizada) a las cuales se le agregó agua destilada a una concentración conocida para evaluar su capacidad de retención de agua. (2) En otro experimento, se hizo una dilución de CNC-OSO₃H y CNC-3h liofilizada al 1% en peso de CNC para observar su comportamiento de dispersión. (3) Finalmente, se prepararon diversas concentraciones utilizando los CNC húmedos (1%, 2%, 3%, 4%, y 5% en peso de CNC) de ambas muestras, CNC-OSO₃H y CNC-3h, en agua destilada, utilizando agitación vigorosa (vórtex) para asegurar una mezcla homogénea. Esto con el propósito de determinar la concentración mínima requerida para la formación de un gel con alta viscosidad verificada visualmente como resistencia al flujo.

6.3.2 Pruebas de retención con medio de cultivo (DMEM)

Una vez identificada la estrategia para alcanzar la óptima dispersión de los CNC para la formación de un gel viscoso que no fluye (hidrogel de CNC), se llevaron a cabo ensayos utilizando el medio de cultivo conocido como “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM). El DMEM es una solución de cultivo que consiste en una combinación de sales y aminoácidos que, cuando se complementan con suero fetal bovino (SFB), proporcionan un entorno favorable para el crecimiento de diversas células de mamífero.

Reactivos: Tampón de fosfato salino (PBS; 1X, estéril con un pH de 7.4), blanco de calcoflúor (1%), agua Mili Q, Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM; suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de estreptomicina/penicilina, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio; esterilizado y ajustado a un pH de 7.4), Suero Fetal Bovino (SFB).

Procedimiento para Microscopía Confocal: En 3 tubos Eppendorf se añadieron 40 mg de CNC-3h agregando a cada uno 1 mL de PBS y 20 µL de blanco de calcoflúor (0.1%), se dejaron reposar por 10 minutos. Posteriormente, el contenido de cada tubo se sometió a tres lavados con PBS llevándolos a agitación en un vórtex durante 1.5 min, para después centrifugar las muestras a 5,000 rpm durante 5 min, eliminando el sobrenadante. Una vez retirado el sobrenadante, cada muestra fue dispersada en 1 mL de agua Mili Q para obtener un hidrogel de CNC al 4% en peso de CNC respecto al agua.

Cada tubo con el hidrogel se diluyó en 1 mL de diferentes medios (agua Mili Q, DMEM sin SFB y DMEM con SFB al 10%) y se sometieron a agitación en un vórtex para obtener hidrogeles al 2% en peso de CNC respecto al medio acuoso utilizado. Finalmente, cada hidrogel se colocó en un plato para cultivo celular con fondo de vidrio y se incubó durante 48 h a 37°C. Las imágenes se obtuvieron

utilizando el microscopio confocal Zeiss Axio LSM 880, a un aumento de 10X, se realizó un z-Stack (reconstrucción 3D) y se utilizaron 3 canales para su análisis: campo claro, yoduro de propidio (emisión 617 nm y excitación 535 nm) y blanco de calcoflúor (emisión 475 nm y excitación 380 nm).

Procedimiento para Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): Se pesaron 40 mg de CNC-3h en 3 tubos Eppendorf y se hidrataron con 1 mL agua Mili Q, cada tubo se llevó al vórtex por 1.5 min para obtener un hidrogel al 4% en peso de CNC respecto al agua. El hidrogel de cada tubo fue transferido en un vaso de precipitado de 5 mL y se diluyeron en 1 mL de diferentes medios. (agua Mili Q, DMEM sin SFB, DMEM con SFB al 10%). Esto permitió obtener hidrogeles al 2% en peso de CNC respecto al medio acuoso correspondiente. Las 3 muestras se llevaron a incubar por 48 h a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron congeladas a -20°C y liofilizadas por 24 horas. Las imágenes fueron obtenidas mediante un Microscopio electrónico de barrido por emisión HITACHI SU8230 de emisión de campo de cátodo frío.

6.3.3 Reología

La reología estudia cómo la materia se deforma y fluye ante la aplicación de diferentes esfuerzos. La reología de los líquidos poliméricos es complicada y depende de varios factores como la temperatura y la concentración. Estudiar la reología de los materiales poliméricos aporta conocimientos para optimizar sus propiedades físicas y químicas.⁶⁴

Procedimiento: Para los ensayos de reología se prepararon dos muestras, la primera de CNC-3h (2% en peso), en agua destilada (CNC-AGUA) y la segunda en agua-DMEM (1:1 relación volumen) (CNC-DMEM); ambas soluciones se agitaron en un vórtex por 1 min. Se realizaron barridos de deformación y frecuencia para ambas muestras utilizando el reómetro AR-G2 de TA Instruments con una geometría cono truncado de 40 mm de diámetro con una inclinación de 2°, manteniendo la temperatura a 37°C durante el ensayo.

6.4 Cultivo celular en 3D

Reactivos: DMEM (suplementado con SFB al 10%, 1% de L-glutamina, 1% de estreptomicina/penicilina, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio; esterilizado y ajustado a un pH de 7.4), Solución Tripsina/EDTA 1 X (estéril, almacenada a -20°C hasta su uso), PBS (estéril), MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; Sigma Aldrich, M5655), azul tripano, tween al 20%, Resazurin sodium salt (al 10%, Sigma Aldrich R7017, Bioreagent, suitable for cell culture).

Para todos los experimentos los CNC (CNC-OSO₃H, CNC-1h, CNC-2h, CNC-3h) fueron esterilizados por 10 min con luz UV antes del contacto con las células.

Cultivo celular de fibroblastos: La línea celular 3T3-L1 corresponde a células de fibroblastos obtenidas a partir de tejido desagregado de un embrión de ratón suizo albino (*Mus musculus*),⁶⁵ estos fueron cultivados en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino SFB al 10%, bajo condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

Cultivo de células de colon: La línea de células de colon HT-29 corresponde a células provenientes del adenocarcinoma intestinal humano,⁶⁶ fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con SFB al 10% bajo condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

6.4.1 Ensayo de MTT

El MTT es capaz de permear la membrana celular e identificar pequeñas alteraciones en la actividad metabólica que se correlaciona con el número de células en crecimiento tras la exposición a un agente tóxico. Este ensayo consiste en la conversión del colorante amarillo soluble en agua (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) en un compuesto púrpura insoluble conocido como formazán, mediante la acción de la reducción mitocondrial (Figura 15). Las células que tienden a dividirse tienen una mayor velocidad en la reducción del MTT. Posteriormente el formazán se disuelve y extrae en isopropanol, su concentración se determina mediante densidad óptica a 595 nm. Este ensayo tiene una sensibilidad por encima de ~10⁶ células por pozo⁶⁷ y fue desarrollado por Tim Mosmann en 1983.⁶⁸ Se realizó un ensayo del MTT con el fin de demostrar la viabilidad celular (3T3-L1 y HT-29) en presencia de los materiales de CNC a bajas concentraciones en correspondencia a ensayos típicos de nanocristales de celulosa.^{69 70}

Procedimiento: En el ensayo con MTT, se utilizó una placa de 96 pozos, y en cada pozo se colocaron 10,000 células (3T3-L1) con 100 µL de DMEM y se incubó por 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Se prepararon diferentes tratamientos para el ensayo, variando las concentraciones (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 y 4 mg de CNC liofilizados por mL de DMEM) utilizando distintas muestras liofilizadas (CNC-OSO₃H, CNC-1h, CNC-2h, CNC-3h); cada tratamiento se sometió a sonicación por 10 min para lograr una buena dispersión de las muestras.

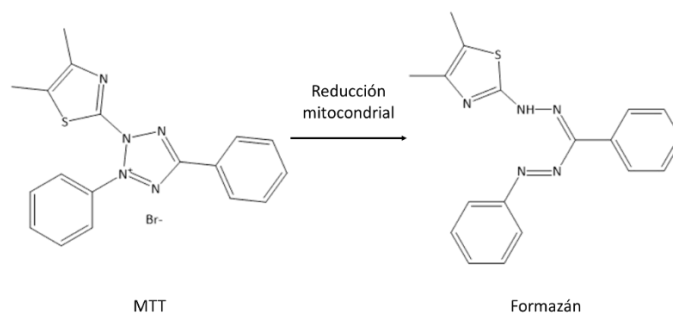


Figura 15.- Reducción de MTT a Formazán.

Tras las 24 h de incubación de las células, se retiró el medio de la placa de 96 pozos y se añadieron 100 μL de cada tratamiento por pozo. Los tratamientos se administraron según la Figura 16, para el control positivo se agregaron 100 μL de DMEM por pozo y para el tratamiento negativo se agregaron 100 μL de Tween al 20%. Posteriormente, la placa se incubó por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 .

Después de las 24 h de incubación, se retiró el medio y se lavó la placa dos veces con PBS. En seguida, se agregaron 10 μL de MTT y 90 μL de DMEM por pozo y con ayuda de una micropipeta se realizó una agitación cuatro veces a cada uno de los pozos para asegurar una mezcla adecuada. La placa se incubó nuevamente durante 4 h bajo las mismas condiciones previas (37°C y 5% de CO_2). Posterior a esto, se agregaron 100 μL de isopropanol a cada pozo y se mezclaron siete veces con ayuda de la micropipeta. Finalmente, la placa se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min y se procedió a medir la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas iMark (BIO-RAD) mediante UV-Vis. Cada ensayo se realizó por triplicado. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para las células HT-29.

	CNC 0h	CNC 1h	CNC 2h	CNC 3h
0.25 mg/mL				
0.5 mg/mL				
1 mg/mL				
1.5 mg/mL				
2 mg/mL				
4 mg/mL				
Control positivo	✓	✓	✓	
Control negativo	✓	✓	✓	

Figura 16.- Representación del tratamiento agregado a la placa de 96 pozos.

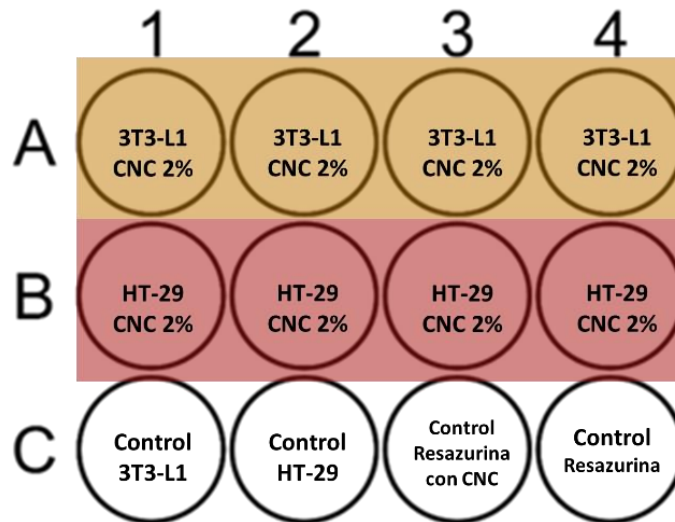


Figura 18.- Diseño de experimento para el análisis de viabilidad celular por medio de la técnica Resazurina.

Incubación de las células con la resazurina: Una vez pasadas las 48 horas, a cada uno de los pozos se agregaron 0.5 mL de resazurina (0.02%). La placa se incubó por 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

Lectura en el espectrofotómetro: Una vez pasadas las 4 horas, se recolectó todo el volumen de los pozos A3, A4, B3 y B4 utilizando una micropipeta y se transfirió cada uno de ellos a un pozo limpio, con el fin de tomar la medida sólo de las células dentro del hidrogel. Luego, las placas fueron centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para precipitar los nanocristales de celulosa, y se tomaron 1.5 mL del sobrenadante de cada pozo, los cuales se transfirieron a celdas de cuarzo para su posterior lectura. La absorbancia se monitoreó a 570 nm utilizando 600 nm como referencia, utilizando un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific). Se construyó un gráfico que representa el porcentaje de viabilidad celular (4) en función de las muestras de CNC.

$$\% \text{Reducción} = \frac{(E_{\text{oxi}600} \times A_{570}) - (E_{\text{oxi}570} \times A_{600})}{(E_{\text{red}570} \times C_{600}) - (E_{\text{red}600} \times C_{570})} \times 100 \quad (4)$$

Donde:

$E_{\text{oxi}600}$ = 117,216, $E_{\text{red}600}$ = 14,652, $E_{\text{oxi}570}$ = 80,586, $E_{\text{red}570}$ = 155,677, A_{570} = absorbancia de la muestra a 570 nm, A_{600} = absorbancia de la muestra a 600 nm, C_{570} = absorbancia del control a 570 nm y C_{600} = absorbancia del control a 600 nm.

6.4.3 Ensayo para Microscopía Confocal

Reactivos: Solución de permeabilización (0.5% Triton X-100/PBS 1X), solución de fijación (formaldehído al 4% en PBS), yoduro de propidio (1mg/mL en PBS), blanco de calcoflúor (1%).

Para obtener imágenes reales del comportamiento tridimensional de las células 3T3-L1 en presencia de los CNC al 2%, fue necesario realizar un análisis mediante un microscopio confocal. La microscopía confocal proporciona mapas de distribución espacial altamente precisos en dos y tres dimensiones de la concentración de iones en células que contienen o han sido marcados con un fluoróforo. Además, permite la observación en tiempo real de la mayoría de los eventos críticos a nivel celular.⁷²

Para poder observar las muestras fue necesario teñir los CNC con blanco de calcoflúor y los fibroblastos 3T3-L1 con yoduro de propidio. El blanco de calcoflúor es un colorante que tiene afinidad por los polisacáridos altamente orientados, como los nanocristales de celulosa. Se ha planteado que este compuesto no solo se adsorbe en la superficie de los CNC, sino que lo hace de manera orientada.⁷³ El yoduro de propidio es un fluorocromo que es capaz de unirse en una relación estequiométrica a los ácidos nucleicos, lo que significa que la cantidad de fluorescencia emitida está directamente relacionada al contenido de ADN presente en una célula.⁷⁴

Procedimiento: Se preparó una muestra de 1 mL de CNC-3h al 4% en peso agitada en un vórtex por 1 min, con esto se formó un hidrogel que no fluye. Posteriormente, en dos cajas para microscopio confocal con fondo de vidrio se agregaron con cuidado 500 μ L de la muestra, asegurándose que quedara en el fondo de vidrio. Estas cajas se incubaron a 37°C por 20 minutos.

Tras ese periodo, se añadieron 160,000 células (3T3-L1) en 200 μ L de DMEM a una de las cajas, goteando con cuidado la solución de células dentro de los CNC. En la otra caja se agregaron 200 μ L de DMEM sin células y se llevaron a incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 horas. Luego, se agregaron 300 μ L de DMEM a cada caja, dejando caer la solución por las paredes de la caja y se mantuvieron incubando a 37°C y 5% de CO₂ por 48 horas.

Tras las 48 horas, se trataron las muestras para su posterior observación. A cada muestra se le agregó 1 mL de solución de fijación y se llevó a 4 °C por 15 min, en seguida se hizo un lavado con PBS (Figura 19). Después, se agregó 1 mL de solución de permeabilización y se llevó a 4 °C por 15 min, posteriormente se hizo un lavado con PBS. Se añadieron 50 μ L de blanco de calcoflúor y 50 μ L de yoduro de propidio a cada muestra, y se incubaron en la oscuridad durante 15 min. Finalmente, se hicieron 3 lavados con PBS por cada muestra.

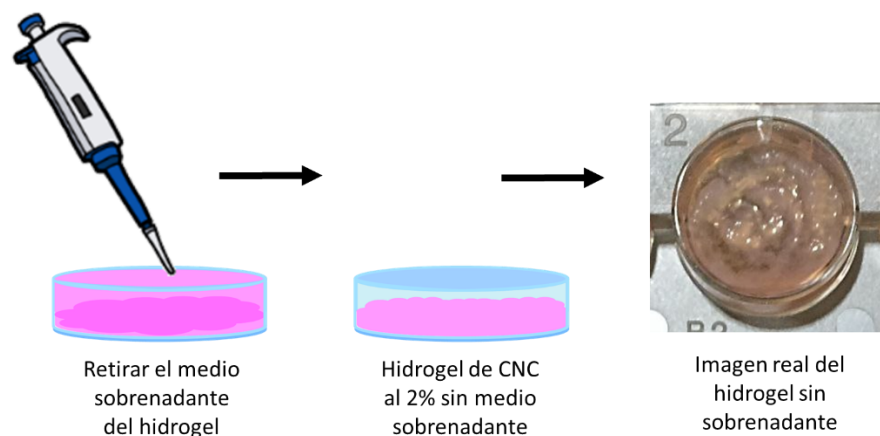


Figura 19.- Ejemplificación del retirado del sobrenadante para los lavados con PBS.

6.5 Adsorción de proteínas

6.5.1 Método de Bradford

El método de Bradford es una técnica colorimétrica que sirve para la cuantificación de proteínas totales en una muestra. Este método se basa en la reacción de las proteínas en un medio alcalino para dar lugar a la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+1} con la detección altamente sensible y selectiva del catión cúprico. La reacción produce un cambio de coloración a color púrpura que se forma mediante la quelación de dos moléculas de ácido bicinonínico (BCA) con un ión cúprico, que es directamente proporcional a la concentración de proteínas presentes. El compuesto muestra una absorbancia a 562 nm y tiene un amplio rango de trabajo (20-2000 $\mu\text{L}/\text{mL}$).⁷⁵

Reactivos: Ácido bicinonínico (BCA reactivo A y BCA reactivo B), albúmina de suero bovino (BSA).

Procedimiento: Se siguió el protocolo descrito por la hoja de seguridad de los reactivos⁷⁶. Se preparó un estándar de 2 mg/mL y se mantuvo a 4°C hasta su uso posterior. Para preparar el reactivo de trabajo de BCA se utilizó la ecuación (5) para determinar el volumen total requerido que deberá estar en una relación 50 : 1, de los reactivos de BCA A : B.

$$\text{Volumen total} = (\# \text{estándares}) \times (\# \text{replicados}) \times (\text{volumen de BCA}) \quad (5)$$

Para preparar la curva de calibración se tomaron 0.05 mL de cada muestra estándar (Tabla 1) en tubos Eppendorf apropiadamente etiquetados y se añadieron 1 mL del

reactivo de BCA a cada tubo mezclando bien. Después los tubos se cubrieron de la luz y se incubaron a 60°C por 30 min. Una vez pasado este tiempo, se esperó a que los tubos se enfriaran a temperatura ambiente. Finalmente se transfirieron las muestras a celdas de cuarzo para su lectura en el Espectrofotómetro a 562 nm de absorbancia. La curva de calibración se utilizó para determinar la concentración de proteína en las muestras de CNC-3h.

Tabla 1.- Esquema de diluciones para el protocolo BCA (rango de trabajo 5-250 µL/mL)

Vial	Volumen del diluyente (µL)	Volumen del estándar de BSA	Concentración final de BSA (µL/mL)
A	700	100 µL del estándar	250
B	400	400 µL del vial A	125
C	450	300 µL del vial B	50
D	400	400 µL del vial C	25
E	400	100 µL del vial D	5
F	400	0	0 (blanco)

Se preparó un hidrogel de CNC-3h al 2% en peso, al que se le agregó una concentración de 250 µg de BSA por mililitro. Luego, se incubó la muestra por 48 horas a 37°C. Después de este tiempo, se centrifugó la muestra a 5,000 rpm durante 5 min y se tomaron 0.05 mL de esta, los cuales se transfirieron a un tubo Eppendorf que contenía 1 mL del reactivo BCA. Las muestras se cubrieron de la luz y se incubaron a 60°C por 30 min. Finalmente, la medición se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 562 nm.

7 Resultados y discusión

7.1 Caracterización de los CNC

7.1.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los nanocristales de celulosa de la marca CelluForce NCC® consisten en cadenas de celulosa cristalinas de 7.5 nm de ancho y 150 nm de largo que debido al método de obtención a partir de madera de árboles contiene grupos de semiéster de sulfato en su superficie, lo que resulta en un potencial Z de -51.3 ± 2.3 mV.⁷⁷ Para incrementar su dispersabilidad en agua y propiciar la formación de hidrogeles en medios acuosos, en este trabajo los CNC comerciales fueron procesados en un DES reactivo formado por ácido oxálico dihidratado y cloruro de colina, el cual se ha reportado que puede deconstruir un material lignocelulósico⁴⁶ para la extracción de los nanocristales de celulosa, y bajo las condiciones suaves de reacción (por ejemplo 60°C) es capaz de esterificar hidroxilos pendientes en la superficie de la CNC debido al ácido oxálico presente.⁵⁶ (Figura 12)

Para verificar que la reacción de esterificación superficial de los CNC comerciales en el DES OxAcDi/ChCl se llevó a cabo, se analizaron las muestras CNC-OSO₃H, CNC-1h, CNC-2h y CNC-3h mediante FTIR. El espectro FTIR obtenido de las muestras de CNC (Figura 20) demuestra la presencia de grupos carboxilos (-COOH) en la superficie de la CNC tratada con DES OxAcDi/ChCl, esto debido a que la esterificación de la CNC puede suceder en presencia de ácidos carboxílicos, como los presentes en el DES de OxAcDi/ChCl. Las vibraciones características de la celulosa se encontraron presentes en todas las muestras las cuales aparecen alrededor de 4000-2995 cm⁻¹ (-OH), 2900 cm⁻¹ (-CH) , 1640 cm⁻¹, 1430 cm⁻¹ (-CH₂-), 1027cm⁻¹ (C-O-C).^{30 9}

Haciendo una comparación con la muestra de CNC-OSO₃H (CNC comercial), en las muestras tratadas con DES (CNC-1h, CNC-2h, CNC-3h) se puede observar una nueva banda alrededor de 1740 cm⁻¹, la cual representa una superposición de las vibraciones del carbonilo que está presente en ésteres o ácidos carboxílicos. La superposición de estas vibraciones del carbonilo es característica de los semiésteres derivados de los ácidos dicarboxílicos de la celulosa.⁵⁶ Con estos resultados se puede corroborar con certeza que la superficie de los CNC fue efectivamente funcionalizada con grupos carboxilo (-COOH).

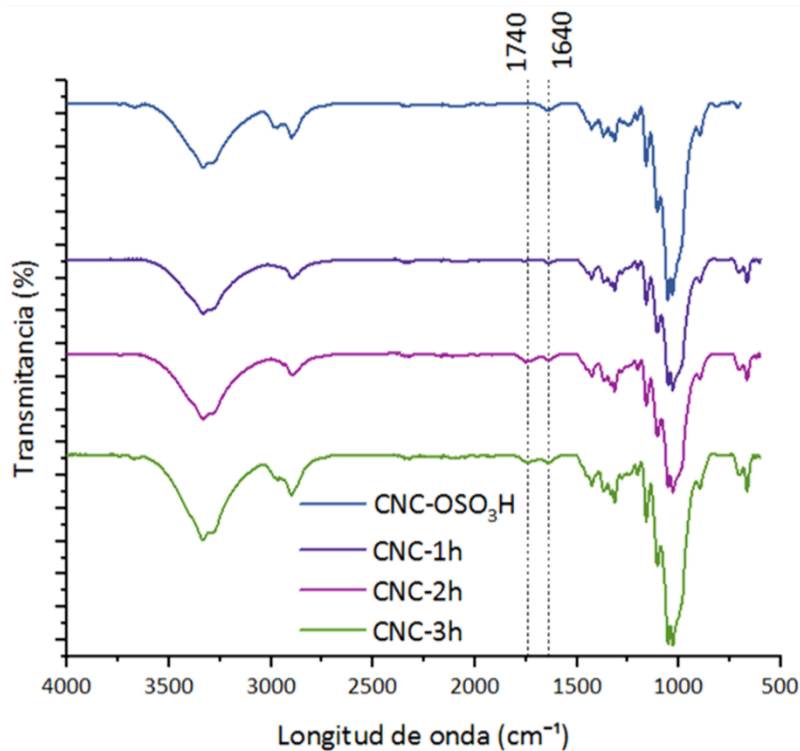


Figura 20.- Espectro FTIR de la CNC comercial (CNC-OSO₃H) y de la CNC carboxilada a diferentes tiempos de reacción (CNC-1h, CNC-2h, CNC-3h).

7.1.2 Valoración conductimétrica

Con el objetivo de cuantificar de manera precisa tanto los ácidos fuertes (CNC-OSO₃H) como los ácidos débiles (CNC-COOH) presentes en la superficie de la CNC funcionalizada y comercial se llevó a cabo una valoración conductimétrica utilizando NaOH (10mM).

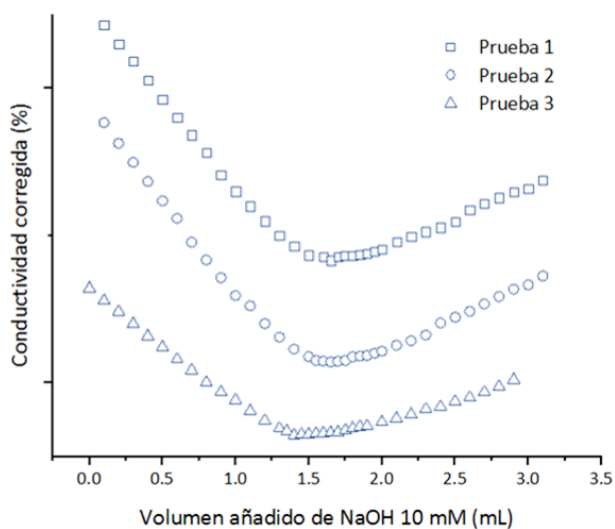


Figura 21.- Curvas de valoración conductimétrica para las muestras de CNC-OSO₃H valorado con NaOH (10mM), donde el punto de equivalencia corresponde a 1.63 mL, 1.65 mL y 1.57 mL respectivamente.

El ensayo de valoración conductimétrica para la determinación de los ácidos fuertes se muestra en la Figura 21, donde se presentan tres pruebas diferentes correspondientes a tres diferentes muestras de CNC-OSO₃H, todas sometidas a las mismas condiciones de funcionalización (relación de los CNC al 1% respecto al DES OxAcDi/ChCl (1:1), 60°C). El contenido de grupos de semiéster de sulfato (ácido sulfónico en estado protonado) obtenidos en este ensayo es de 155.09 ± 3.99 mmol/Kg de CNC. La Tabla 2 muestra una comparación de este resultado con los obtenidos en la literatura donde se utilizan CNC cuantificados de diferentes métodos. Donde el rango común de densidad de carga para CNC con grupos de semiéster de sulfato es de 80-350 mmol/Kg.⁴⁰

Tabla 2.- Tabla comparativa de la cuantificación de grupos -OSO₃H encontrados en diferentes CNC.

Muestra	mmol/Kg _{CNC}	Referencia
CNC-SOO ₃ H	155.09 ± 3.99	Este trabajo
R-OSO ₃ H	240 ± 12	(Cellulose 2015 , 22 (1), 101–116) ⁷⁸
S-CNC	212 ± 2	(Acta Biomater. 2019 , 87, 152–165) ⁷⁹
CNC	355	(ACS Sustain. Chem. Eng. 2022 , 10 (29), 9419–9430) ⁸⁰

Los ensayos de valoración conductimétrica para la CNC que fue funcionalizada a diferentes periodos de tiempo (CNC-1h, CNC-2h y CNC-3h), manteniendo constantes las condiciones de temperatura (60°C), agitación y concentración de CNC respecto al DES (1%), se representan en la Figura 22.

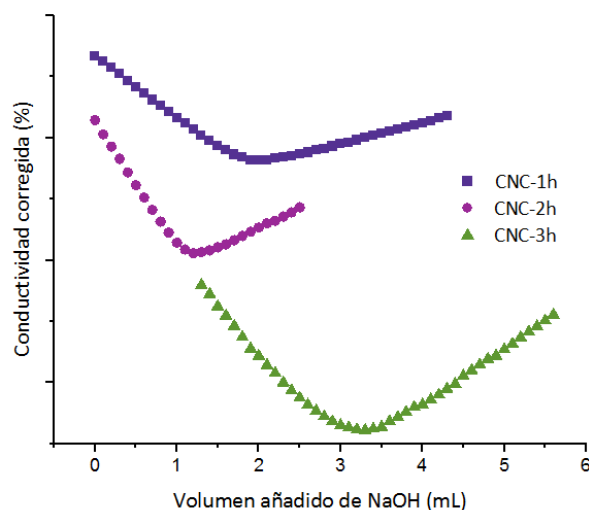


Figura 22.- Curvas de valoración conductimétrica para las muestras de CNC-COOH funcionalizada a diferentes tiempos con DES (CNC-1h, CNC-2h, CNC 3h), valoradas con NaOH (10mM).

La densidad de carga de grupos -COOH correspondiente a estos ensayos se muestra en la Tabla 3 donde se muestra una comparación con el trabajo realizado por *Sirviö et al., 2016* bajo condiciones similares de funcionalización.

Tabla 3.- Tabla comparativa de la cuantificación de grupos -COOH encontrados en diferentes CNC a 60°C.

Muestra	Tiempo de reacción (h)	mmol/Kg	Referencia
CNC-1h	1	236 ± 4	Este trabajo
CNC-2h	2	342 ± 2	Este trabajo
CNC-3h	3	375 ± 2	Este trabajo
DES2	2	200 ± 4	<i>(Biomacromoleculas 2016, 17 (9), 3025–3032)</i> ⁵⁶
DES3	3	270 ± 13	
DES4	6	230 ± 7	
DES5	2	230 ± 3	

7.1.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para obtener información sobre el impacto de la funcionalización superficial de los nanocristales de celulosa sobre sus dimensiones y aspectos morfológicos, se realizaron comparaciones de las características de los CNC por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM).

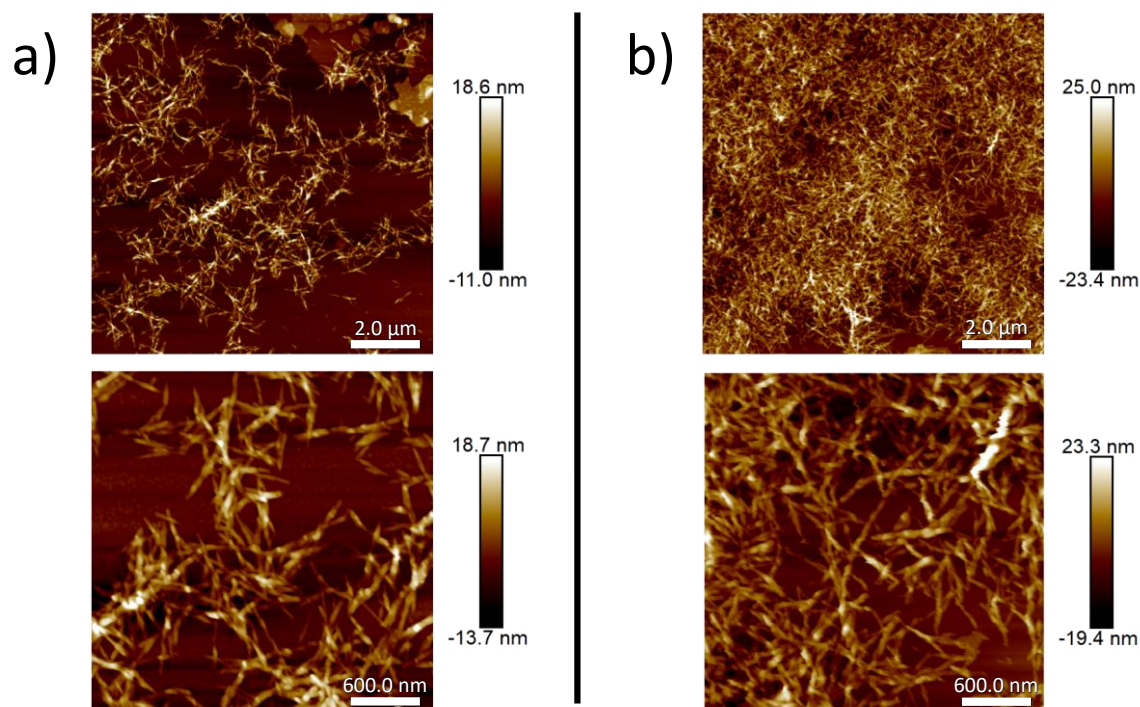


Figura 23.- Imágenes de AFM en modo sensor de altura de a) los CNC antes del tratamiento con el DES (CNC-OSO₃H) y b) los CNC después de 3 horas de funcionalización con el DES CNC-3h.

En la Figura 23 se puede observar que los CNC-3h exhiben una mayor densidad de muestra en la misma escala de observación en comparación con CNC-SOO₃H. Esto podría atribuirse a la presencia de interacciones de atracción más intensas entre los cristales de celulosa, debido a la incorporación del grupo funcional -COOH y establecimiento de enlaces hidrógeno entre ellos.

A través de las imágenes obtenidas de nanocristales individuales (Figura 24), se pudo establecer que las dimensiones de los CNC-3h son aproximadamente de 207 nm de largo, mientras que las dimensiones de CNC-SOO₃H corresponden a 208 nm de largo aproximadamente. A partir de estos resultados se puede concluir que la funcionalización con DES compuesto de OxAcDi/ChCl no modifica la morfología de los CNC, ya que las dimensiones se mantienen constantes, y apunta a que la presencia de grupos carboxílicos debido a la funcionalización de la CNC fue superficial, es decir, no ocurrió hidrólisis de la celulosa en los nanocristales y por lo tanto no hubo pérdida de cristalinidad, como se discutirá en la sección de análisis por XRD.

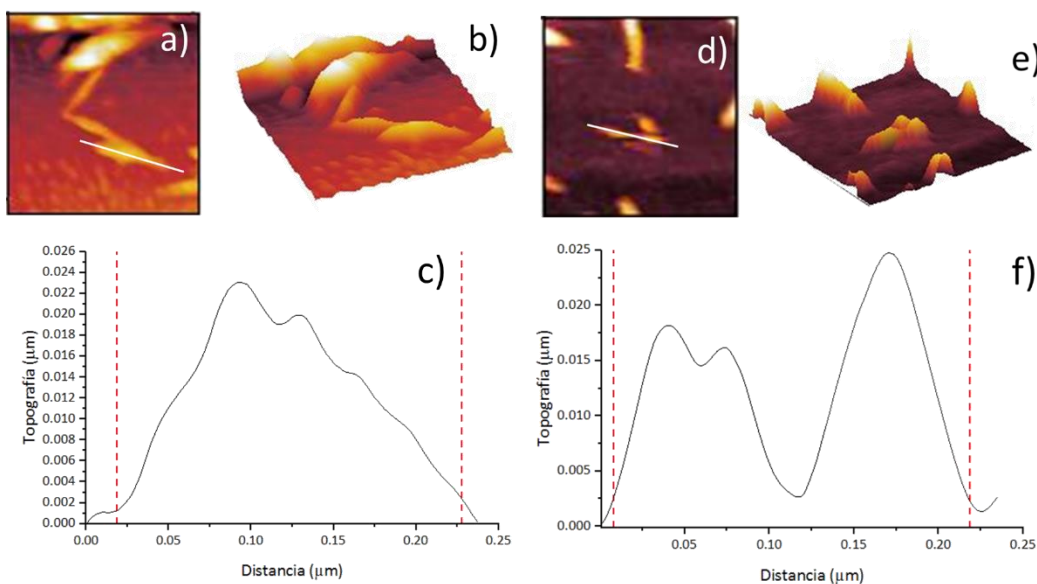


Figura 24.- a) Imagen AFM de un nanocristal de celulosa (CNC-SOO₃H) en dos dimensiones con una longitud de 208 nm. b) Imagen tridimensional del CNC mostrado en la imagen a. c) Perfil de altura de la línea dibujada en a y su longitud. d) Imagen AFM de un nanocristal de celulosa (CNC-3h) en dos dimensiones con una longitud de 207 nm. e) Imagen tridimensional del CNC mostrado en la imagen d. f) Perfil de altura de la línea dibujada en d y su longitud.

7.1.4 Difracción de Rayos X (XRD)

Debido a la naturaleza cristalina de la celulosa, las muestras se estudiaron por medio de difracción de rayos X de polvos. Para esto se analizaron las muestras CNC-SOO₃H y CNC-3h para explorar las características de la estructura cristalina de los CNC después de someterlos a un proceso de funcionalización a 60°C. Como se muestra en los patrones de XRD que se presentan en la Figura 25,

ambos difractogramas muestran la presencia de un pico a 22.4° y otro pico menos intenso a 34.6° los cuales son característicos de la α -celulosa y corresponden a los planos cristalográficos (002) y (004), respectivamente.³¹

A partir de los difractogramas de rayos X se obtuvo un índice de cristalinidad del 83% para la muestra de CNC-SOO₃H y del 80% para CNC-3h. Estos resultados indican que el proceso de funcionalización no tiene un impacto significativo en la cristalinidad de los CNC, incluso después de 3 horas de funcionalización.

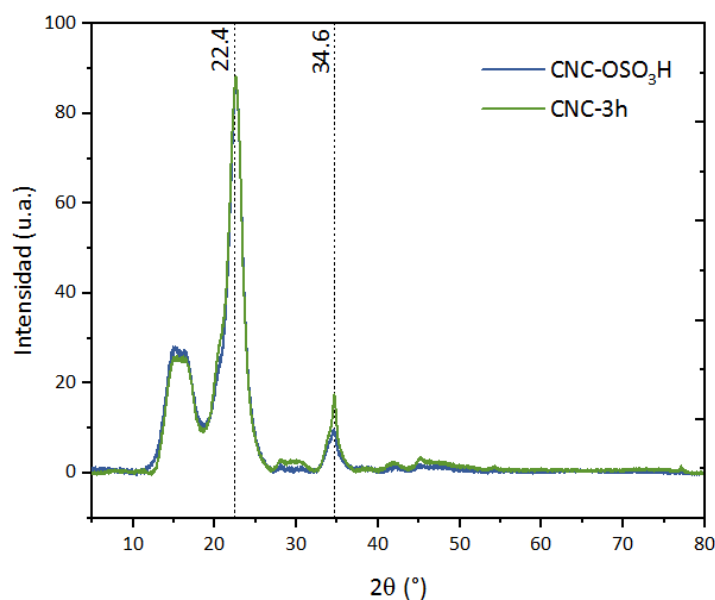


Figura 25.- Espectro XRD de las muestras de CNC secos, se muestran los CNC comercial (CNC-OSO₃H) y de los CNC carboxilados a las 3 horas de reacción con el DES.

7.2 Hidrogeles de CNC

7.2.1 Pruebas de retención con agua

- (1) Para evaluar la capacidad de retención de agua de los CNC y verificar la concentración de CNC que da lugar a la formación de hidrogeles, se llevó a cabo una prueba (Figura 26a) en la que se añadieron cantidades conocidas de agua a una masa fija de CNC. Se observó que para ambas muestras CNC-OSO₃H y CNC-3h liofilizados, los CNC no eran capaces de retener más del 70% de su peso en agua. Además, se observó una dispersión deficiente de los CNC en esta técnica, añadiendo agua por goteo, ya que no se lograba una distribución homogénea en el medio acuoso. Por otra parte, en el caso de los CNC-3h liofilizados, se observaron

grandes aglomeraciones que dificultaban una dispersión homogénea de los CNC en el medio acuoso.

- (2) Con el fin de analizar con mayor detalle el comportamiento de aglomeración de los CNC-3h liofilizados, se prepararon las muestras mostradas en la Figura 26b. Se observó que la muestra CNC-3h presentaba una apariencia turbia en comparación con la muestra de CNC-OSO₃H a la misma concentración (1% en peso). Además, después de dejar los viales en reposo durante 20 minutos, se observó que los CNC-3h precipitaban en grandes aglomerados. Se intentó dispersar la muestra utilizando vórtex durante 5 minutos y una sonicación durante 20 minutos, pero no se logró una dispersión efectiva.
- (3) Para mejorar la dispersión de los CNC, se optó por mantener los CNC en estado húmedo después de la funcionalización. Para lograr esto, los CNC se dispersaron en una cantidad suficiente de etanol para cubrirlos, manteniéndolos a una temperatura de 4°C. Utilizando este método, se llevaron a cabo pruebas de retención de agua donde se logró obtener un hidrogel homogéneo con una concentración de hasta el 15% en peso de CNC en agua, como se muestra en la Figura 26c. Con este enfoque las muestras descritas en los métodos fueron dispersadas fácilmente. Además, se observó que la muestra presenta una resistencia al flujo al alcanzar una concentración mínima del 2% de CNC.

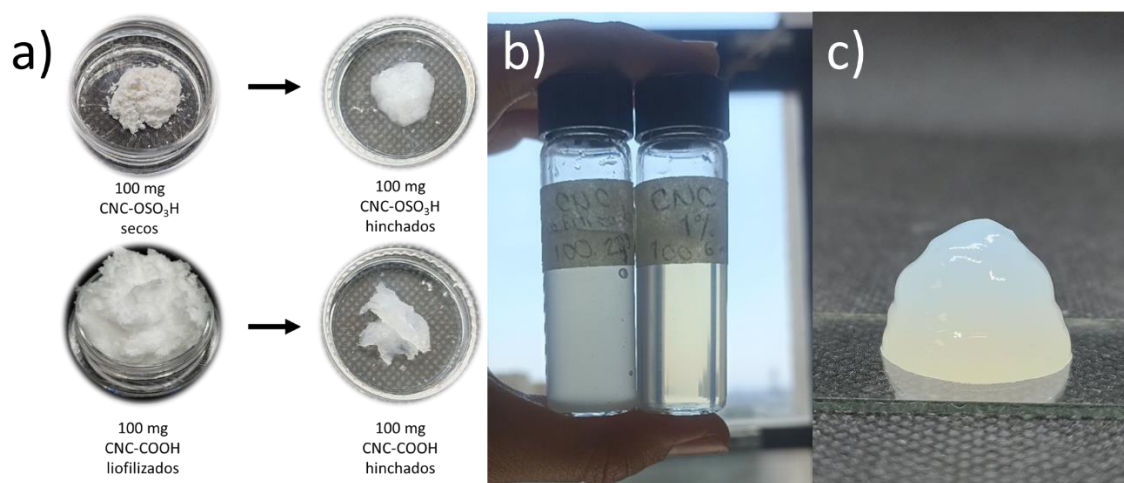


Figura 26.- a) Pruebas de retención de agua. b) Soluciones de CNC al 1% en peso de CNC, CNC-3h liofilizada (izquierda), CNC comercial (derecha). c) Hidrogel de CNC-3h húmeda al 15% de CNC.

7.2.2 Pruebas de retención con DMEM

Una vez determinada la estrategia óptima para la hidratación de la celulosa y formación de hidrogeles en agua, se realizaron pruebas similares usando DMEM, ya que este medio de cultivo

contiene sales y aminoácidos que podrían influir en los fenómenos de adsorción de agua en la superficie de la CNC.

Las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal (Figura 27) revelan que el espesor de los hidrogeles hidratados con DMEM es superior al hidrogel hidratado con agua, siendo el espesor de 260 μm para CNC-DMEM-sSFB, 255 μm para CNC-DMEM-cSFB y de 130 μm para CNC-H₂O. Adicionalmente, en las imágenes para CNC-DMEM-cSFB se puede identificar una mayor densidad de agregados en comparación con CNC-DMEM-sSFB y CNC-H₂O. A partir de estas observaciones en los hidrogeles, se pudo demostrar que los CNC mostraban interacciones de atracción más fuertes al estar en contacto con el DMEM. Esto se evidencia con la presencia de agregados más grandes en CNC-DMEM-cSFB, así como por las diferencias observadas en el espesor de las muestras, siendo este último del doble en comparación con la muestra hidratada en agua. Además, se notó que la adición del suero fetal bovino (SFB) tuvo un impacto en el tamaño de los agregados en comparación con la muestra que no contenía SFB.

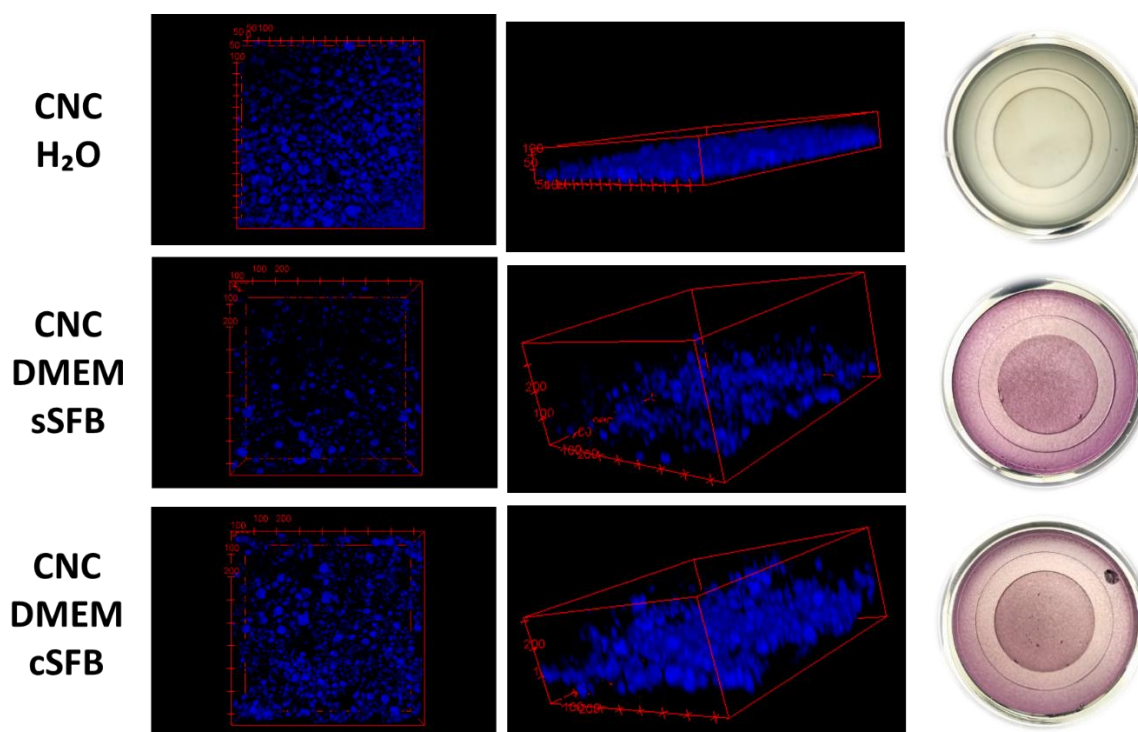


Figura 27.- Microscopía confocal de un hidrogel de CNC-3h, teñida con blanco de calcoflúor a una concentración de 2 wt% respecto a diferentes medios y se dejó incubar por 48 h a 37°C. a) CNC-H₂O b) CNC-DMEM-sSFB, c) CNC-DMEM-cSFB.

La morfología de los aerogeles, resultantes de la liofilización de los hidrogeles anteriormente observados por microscopía confocal, fue evaluada mediante SEM. Las micrografías obtenidas

(Figura 28) permiten observar la estructura microscópica y porosidades presentes en las muestras de CNC luego de ser liofilizadas. La muestra CNC-H₂O (Figura 28a) muestra superficies más planas y agregados uniformemente distribuidos en toda la superficie. En cambio, las muestras con DMEM (Figura 28b y Figura 28c) presentan una morfología similar entre ellas, con microestructuras fibrosas separadas por macroporos de aproximadamente 50 μm de diámetro. Estos hallazgos proporcionan una comprensión más profunda de la estructura de estos materiales cuando interactúan con diferentes fluidos.

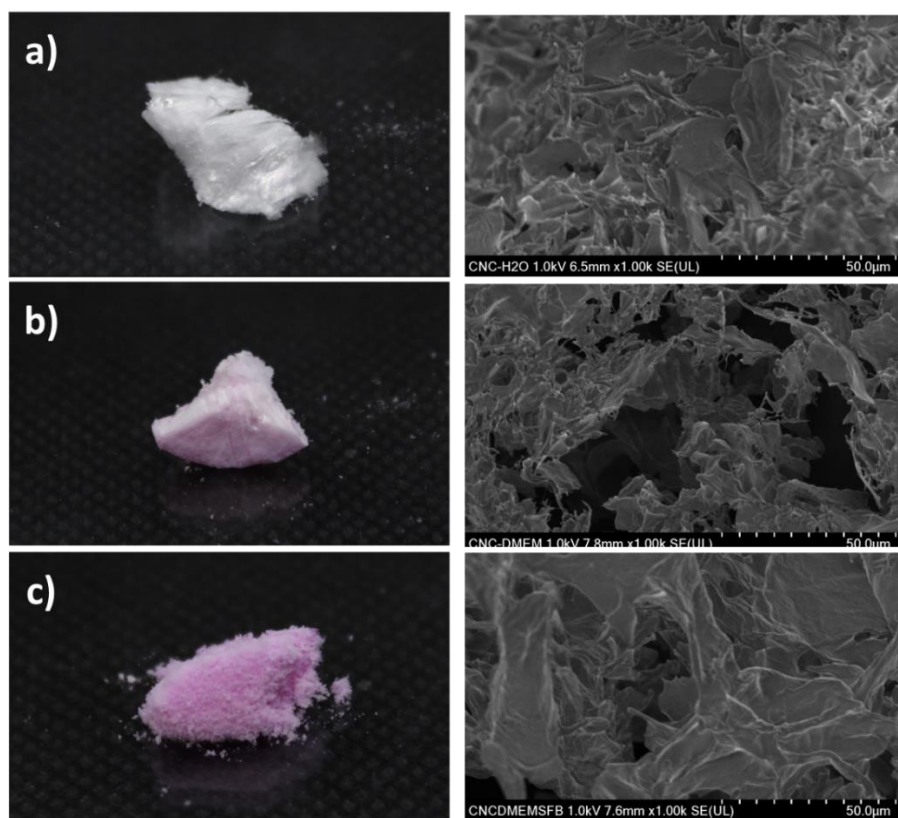


Figura 28.- Microscopía electrónica de barrido de un hidrogel de CNC al 2 wt% respecto a diferentes medios, se dejó incubar por 48 h y se liofilizó. a) CNC-H₂O, b) CNC-DMEM-sSFB, c) CNC-DMEM-cSFB.

7.2.3 Reología

Para poder comprender y analizar las propiedades mecánicas y de flujo del hidrogel de CNC-3h al 2% en peso y a una temperatura de 37°C, se llevaron a cabo estudios de reología. Estos estudios abordan dos aspectos fundamentales: la zona lineal viscoelástica en barridos de deformación, que corresponde a la región en la cual los módulos elástico y viscoso no se ven afectados por la deformación aplicada; y el comportamiento viscoelástico en barridos de frecuencia, que se refiere a las características de los módulos elástico y viscoso del hidrogel.

El módulo elástico se relaciona con la rigidez del material y su capacidad para recuperar su forma original después de una deformación, mientras que el módulo viscoso se refiere a la resistencia de un material a fluir o deformarse continuamente bajo la influencia de una fuerza aplicada.

Las muestras que presentaron un comportamiento macroscópico consistente con un hidrogel fueron analizadas por medio de análisis reológicos detallados a 37°C. En la Figura 29 se presenta el barrido de deformación para ambas muestras, los resultados indican que la zona lineal viscoelástica, para CNC-AGUA se localiza entre 15% y 100% de deformación, mientras que para la CNC-DMEM se localiza en deformaciones menores al 7%. La información obtenida mediante los barridos de deformación se utilizó en los posteriores análisis de barrido de frecuencia, donde se usó una deformación de 20% y 1% para las soluciones CNC-AGUA y CNC-DMEM respectivamente.

En la Figura 30 se observan el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') en un barrido de frecuencia, con el cual es posible estudiar el comportamiento viscoelástico de ambas soluciones. En la Figura 11a la solución CNC-AGUA exhibe un cruce de ambos módulos, donde existe un cambio de comportamiento predominantemente viscoso a predominantemente elástico a frecuencias mayores a 10 rad/s. Por otro lado, la Figura 30b muestra que la solución CNC-DMEM posee un comportamiento mayormente elástico desde frecuencias bajas (menores a 0.01 rad/s) hasta frecuencias altas (mayores a 100 rad/s), sin embargo, el barrido de frecuencia muestra una tendencia a un cruce de los módulos G' y G'' en tiempos muy largos (existe un comportamiento viscoelástico). Esto indica que en la solución CNC-DMEM no existe un comportamiento reológico típico de un hidrogel, ya que en un hidrogel los módulos elástico y viscoso se mantienen paralelos siendo el módulo elástico mayor.

Barridos de deformación del hidrogel en agua y DMEM

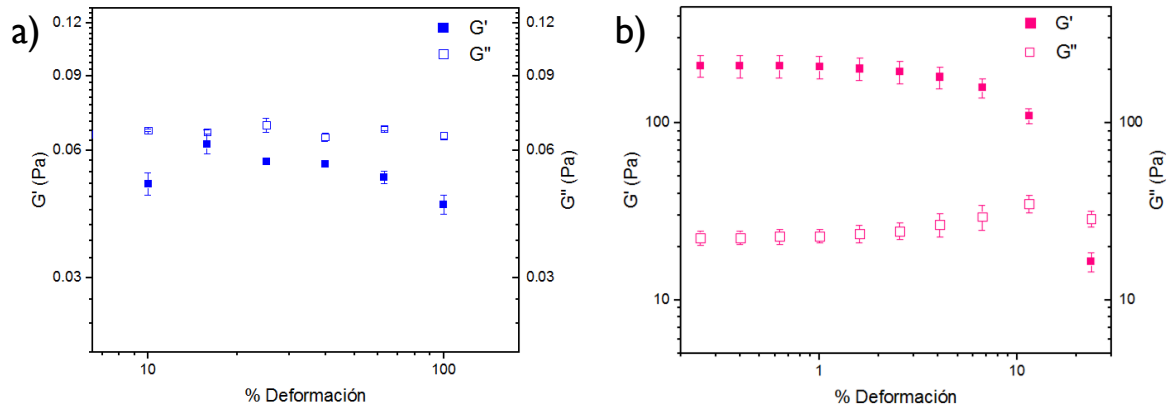


Figura 29.- Barridos de deformación de a) CNC-AGUA y b) CNC-DMEM

El estudio comparativo entre CNC-AGUA y CNC-DMEM demuestra que el DMEM produce una solución mayormente elástica en un amplio rango de frecuencias (0.01- 100 rad/s), por lo que el DMEM además de brindar nutrientes a las células también promueve un ambiente dinámico con cambios estructurales en la organización de los CNC. En este escenario las sales y proteínas presentes en el DMEM generan interacciones que permiten tener una solución con un comportamiento mayormente elástico en un mayor rango de frecuencias en comparación con el agua.

Barridos de frecuencia del hidrogel en agua y DMEM

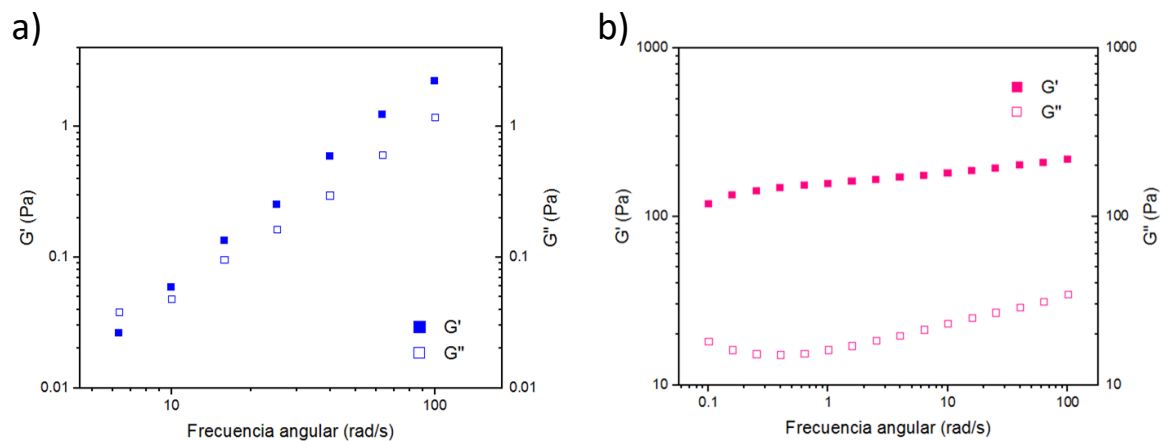


Figura 30.- Barridos de frecuencia de a) CNC-AGUA y b) CNC-DMEM

Haciendo un estudio comparativo con el Matrigel según lo reportado por X se puede demostrar que tanto el hidrogel de CNC como el Matrigel, mantienen un comportamiento mayormente elástico en frecuencias de 0 hasta 10 rad/s, sin embargo, el Matrigel mantiene esta tendencia mientras que el

hidrogel de CNC genera una tendencia al cruce para frecuencias superiores a los 100 rad/s. Aunque, es importante destacar que los resultados del Matrigel fueron generados a 2°C, y este estudio se llevó a cabo a 37 °C.⁸¹

7.3 Cultivo celular en 3D

7.3.1 Ensayo de MTT

En esta etapa de la investigación, se optó por llevar a cabo un estudio exhaustivo para evaluar el potencial efecto toxicológico, de los CNC funcionalizados en dos tipos de células: los fibroblastos de ratón (3T3-L1) y las células de colon (HT-29). Para ello se realizaron pruebas de viabilidad celular utilizando diferentes concentraciones de grupos -COOH en la superficie de los CNC que van desde 0 mmol/Kg (CNC-OSO₃H) hasta los 375 mmol/Kg (CNC-3h), estas mediciones se llevaron a cabo mediante el ensayo de MTT. El objetivo de este enfoque es investigar cómo las diferentes concentraciones de grupos -COOH pueden influir en la respuesta celular, específicamente en términos de mantener su viabilidad al estar en contacto directo con estos grupos. Es importante mencionar que a estas concentraciones los CNC dispersados de manera homogénea en el medio se encuentran de manera individual como coloides estabilizados por los grupos carboxilos en su superficie.

La viabilidad de las células HT-29 en función de los CNC, medida mediante el ensayo de MTT, se ilustra en la Figura 31. Cuando la concentración de los CNC aumentó de 0.25 a 4 mg/mL, la viabilidad celular en CNC-OSO₃H se mantuvo entre 87.2% ± 6.2 y 90.89% ± 4.07. Sin embargo, a medida que incrementa la cantidad de grupos -COOH presentes en las muestras de CNC (hasta un máximo de 375 mmol/Kg) a una concentración de 4 mg de CNC sobre mL, la viabilidad celular fue del 84.77% ± 3.98 para CNC-1h, 99.39% ± 7.18 para CNC-2h y 92.32% ± 10.4 para CNC-3h.

La viabilidad de las células 3T3-L1 en función de los CNC se ilustra en la Figura 32. Se puede observar que en concentraciones de 4 mg/mL de CNC la viabilidad celular se mantiene por encima del 80% en todas las muestras. Se puede observar también que existe un aumento en la viabilidad celular de las muestras CNC-2h y CNC-3h conforme aumenta la concentración de CNC, esto puede deberse a aglomeraciones que se presentaron al utilizar CNC liofilizada para este ensayo.

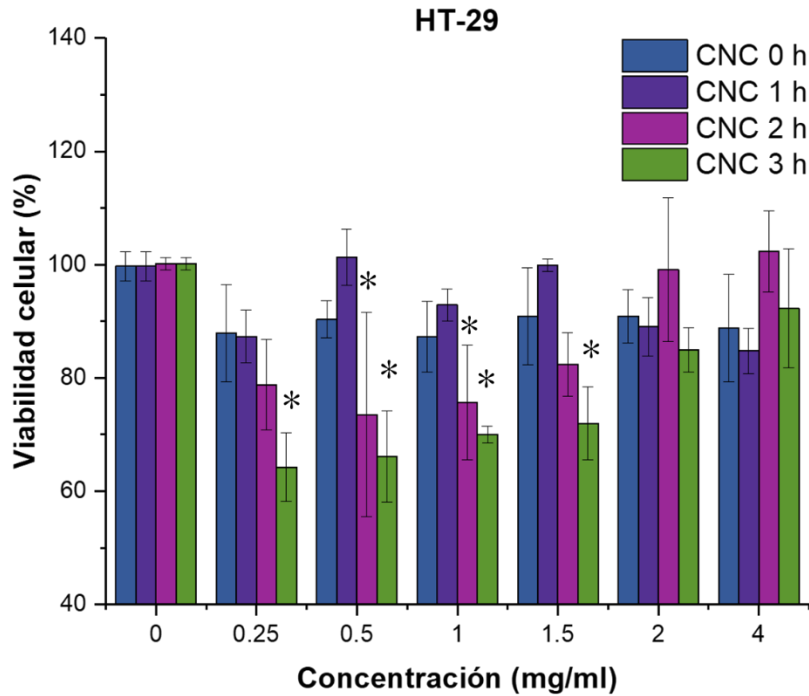


Figura 31.- Ensayo de MTT para evaluar la toxicidad del material de los CNC funcionalizados a diferentes horas y a diferentes concentraciones en células de colon (HT-29) después de 24 h de incubación. El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA-two way, con el Software GraphPad Prism; en donde * $p < 0.05$, indicando que es significativamente diferente respecto al control. Además, se presenta una diferencia significativa entre medias de CNC 3h (4, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL) y entre las medias de CNC 2h (4, 2, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL).

Otros trabajos que utilizaron andamios para cultivar la línea celular HT-29, *Cacicedo et al., 2016*, informaron una disminución de la viabilidad celular del 95 al 53% en sus andamios de celulosa bacteriana con concentraciones de doxorrubicina por debajo de los $500 \mu\text{M}$ ⁸². Por otro lado, el estudio de *Tentor et al., 2017* reportaron viabilidades celulares por encima del 90% para sus andamios de quitosano con nanopartículas de oro (AuNP), sin embargo, en sus andamios que no contenían AuNP, las viabilidades celulares fueron significativamente más bajas, oscilando entre el 57 y el 67% con concentraciones de hidrogel por debajo de $1000 \mu\text{g/mL}$ ⁸³. Haciendo una comparación con este trabajo cabe resaltar que los CNC presentan menos toxicidad para HT-29 que aquellos con quitosano o aquellos en contacto con la doxorrubicina, a pesar de que se utilizaron concentraciones mayores.

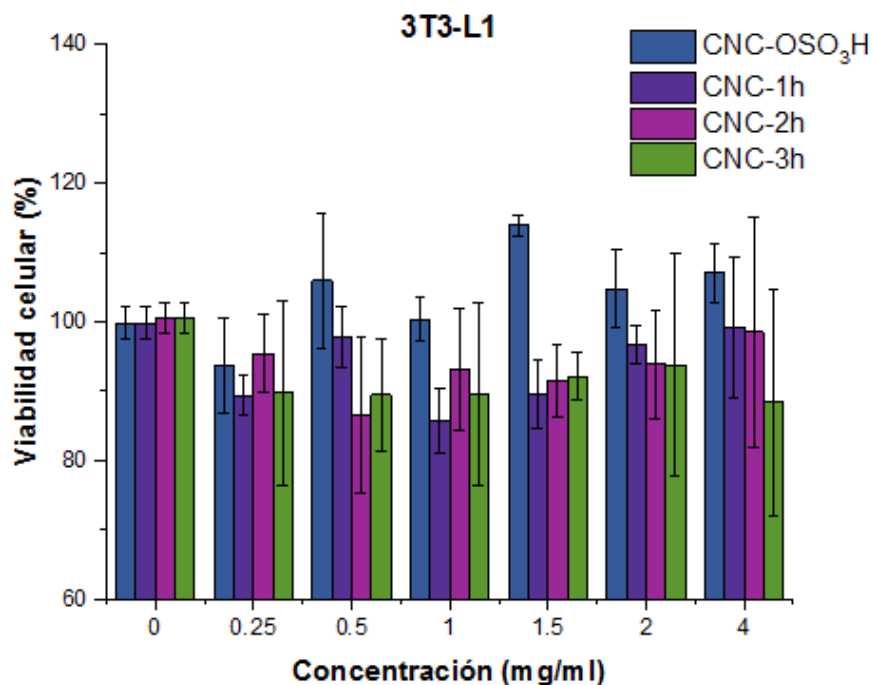


Figura 32.- Ensayo de MTT para evaluar la toxicidad del material de los CNC funcionalizados a diferentes horas y a diferentes concentraciones en fibroblastos (3T3-L1) después de 24 h de incubación. El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA-two way, con el Software GraphPad Prism; en donde no se mostraron diferencias significativas respecto al control. Además, se demostró que existe una diferencia significativa entre las medias de CNC-0h y CNC-1h a una concentración de 1.5 mg/LI.

Otros trabajos donde se reportaron viabilidades celulares para la línea celular 3T3-L1 en andamios de quitosano con otros compuestos como ácido gálico⁸⁴, urea⁸⁵ y ácido succínico⁸⁵, reportaron viabilidades de 60-75% ; alrededor del 70% y del cerca del 90%, respectivamente. Realizando una comparación con estas investigaciones en células 3T3-L1, los CNC se perfilan como una elección más favorable como andamio para cultivo celular que el quitosano, ya que, las células fueron expuestas a concentraciones más altas de hidrogel de CNC y su viabilidad celular resultó ser superior.

Estos ensayos indicaron que los CNC liofilizados en concentraciones que oscilan entre 0.25 y 4 mg/mL presentan una toxicidad mínima para las células HT-29 y 3T3-L1. Es importante mencionar que la dilución de los CNC con grupos -COOH en DMEM generó niveles de pH ácidos, alrededor de 4, lo cual resulta no ser un medio adecuado para el cultivo celular. Esto se evidenció mediante un cambio de color en el indicador rojo fenol presente en el DMEM. (Figura 33) Para resolver esta situación fue necesario hacer 3 lavados con 1 mL de PBS por cada 40 mg de CNC antes de dispersarlos en DMEM.

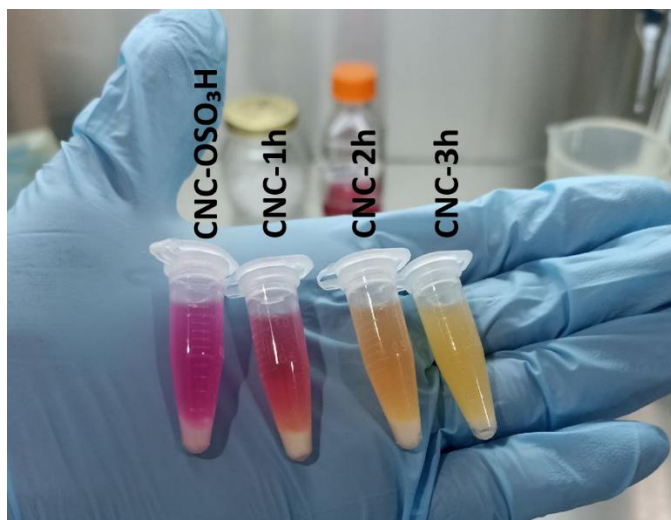


Figura 33.- Reacción de las muestras de CNC con el DMEM antes de los lavados con PBS.

En resumen, se puede concluir que la presencia de grupos -COOH en la superficie de los CNC no tienen un impacto significativo en la viabilidad celular, ya que los CNC liofilizados en las concentraciones mencionadas resultaron ser poco tóxicos para las células estudiadas.

7.3.2 Ensayo de viabilidad celular por reducción de resazurina

El propósito de este ensayo consistió en investigar la actividad metabólica de las células cuando se encuentran expuestas a concentraciones más elevadas de CNC en forma de hidrogel al 2% en peso, con la particularidad de que en este caso las células 3T3-L1 y HT-29 estarán completamente inmersas en estos materiales. Estas líneas celulares corresponden a células que dan lugar a tejidos conectivo y no conectivo, respectivamente. Este estudio comparativo permitirá analizar el comportamiento de ambas en células en presencia de los CNC, debido a la tendencia del tejido conectivo de adherirse a la matriz extracelular circundante, para poder migrar, hacer homeóstasis y sobrevivir, a diferencia del tejido no conectivo. Donde se espera que los CNC desempeñen un papel preponderante en la adhesión celular influenciada por los grupos -COOH .

Se evaluó la actividad metabólica de HT-29 y 3T3-L1 mediante el ensayo de Azul Alamar (reducción de resazurina). Se optó por una concentración de CNC al 2% en peso debido a resultados previos en las pruebas de retención de agua y reología que demostraron que esta concentración mínima mantiene las propiedades de un hidrogel macroscópico y predominantemente elástico a grandes frecuencias, respectivamente. Esta evaluación metabólica se correlaciona con la proliferación de las células.

Las células de colon HT-29 se incubaron en hidrogeles de CNC por 48 horas. Los efectos de este soporte en las células se pueden observar en la Figura 34. Se observa que el hidrogel de CNC almacena el 87.8% de células metabólicamente activas del 100% de las células inicialmente presentes en el pozo. Para CNC-2h este porcentaje fue de 95.45% de células y alcanzó 100% en el caso de CNC-3h. Estos resultados se lograron retirando completamente el hidrogel del pozo y trasladándolo en uno nuevo y estéril antes de la adición de la resazurina para su medición, esto evitó la lectura de las células que quedaron adheridas a la superficie del pozo.

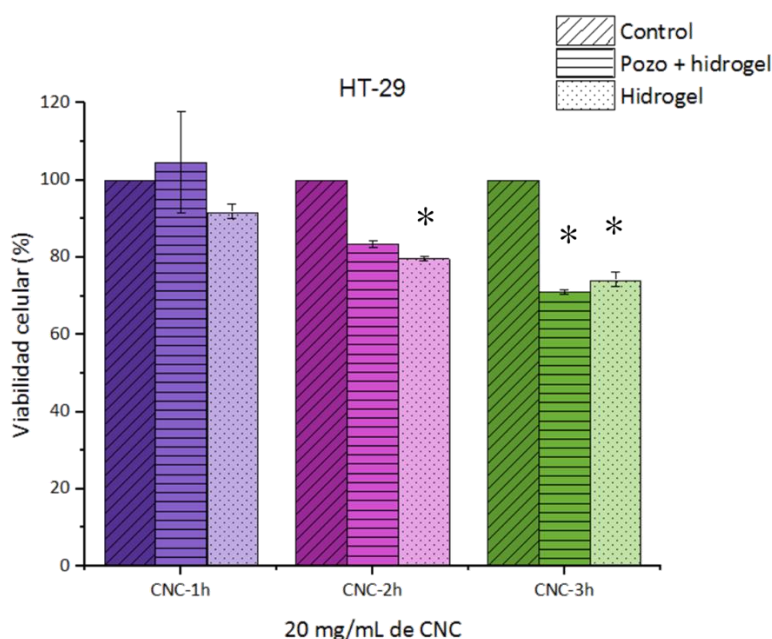


Figura 34.- Ensayo Azul Alamar utilizando resazurina para evaluar la actividad metabólica de las células de colon HT-29 en contacto con 20 mg/mL de CNC funcionalizados a diferentes tiempos. El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA-two way, con el Software GraphPad Prism; en donde * $p < 0.05$ que demuestra que se mostraron diferencias significativas respecto al control. Además, se demostró que existe una diferencia significativa entre las medias de los pozos en CNC-1h y CNC-3h.

Los resultados obtenidos en otros estudios indican que, en el caso de andamios de quitosano y pectina utilizados para el cultivo de células HT-29, se han reportado viabilidades del 67% por *Tentor et al., 2017*. Sin embargo, la incorporación de nanopartículas de oro a estos andamios permitió que se alcanzaran valores del 90%⁸³. Por otra parte, *Bombaldi de Souza et al., 2017* reporta viabilidades celulares de HT-29 por encima del 100% en este tipo de hidrogeles con concentraciones de hasta 50 mg/mL⁸⁶. Estos resultados indican que los andamios de CNC presentan una opción prometedora para el cultivo de células HT-29, ya que los resultados obtenidos son congruentes con lo que reporta *Bombaldi de Souza et al., 2017*; en este trabajo las tasas de viabilidad celular se mantienen por encima del 75%, incluso en concentraciones de 40 mg/mL.

Los resultados de la influencia de los CNC al 2% en los fibroblastos 3T3-L1 se pueden apreciar en la Figura 35, donde se evidencia que las tasas de viabilidad celular se encuentran por encima del 75% para los tres tipos de CNC. Además, el hidrogel de CNC es capaz de retener un alto porcentaje de las células presentes en los pozos de cultivo, siendo un 97.42% para CNC-1h, 98.62% para CNC-2h y 94.60% para CNC-3h.

En este sentido, Strätz *et al.*, 2020 observaron que un hidrogel compuesto de sulfatos de celulosa oxidada resultaron tóxicos cuando se alcanzaron concentraciones mayores a 0.5 mg/mL para fibroblastos 3T3-L1⁸⁷. Por otro lado, Peschel *et al.* 2010, informaron que los porcentajes de viabilidad fueron superiores al 90% cuando los fibroblastos se cultivaron en celulosa sulfatada (1 mg/mL), y también reportan viabilidades superiores al 85% en presencia de 1 mg/mL de celulosa carboximetilada⁸⁸. La viabilidad celular de 3T3-L1 ya ha sido estudiada en otros trabajos en presencia de compuestos de celulosa mostrando toxicidades por debajo del 15%, en este trabajo eso no fue la excepción, aún manteniendo la concentración de los CNC de hasta 20 mg/mL.

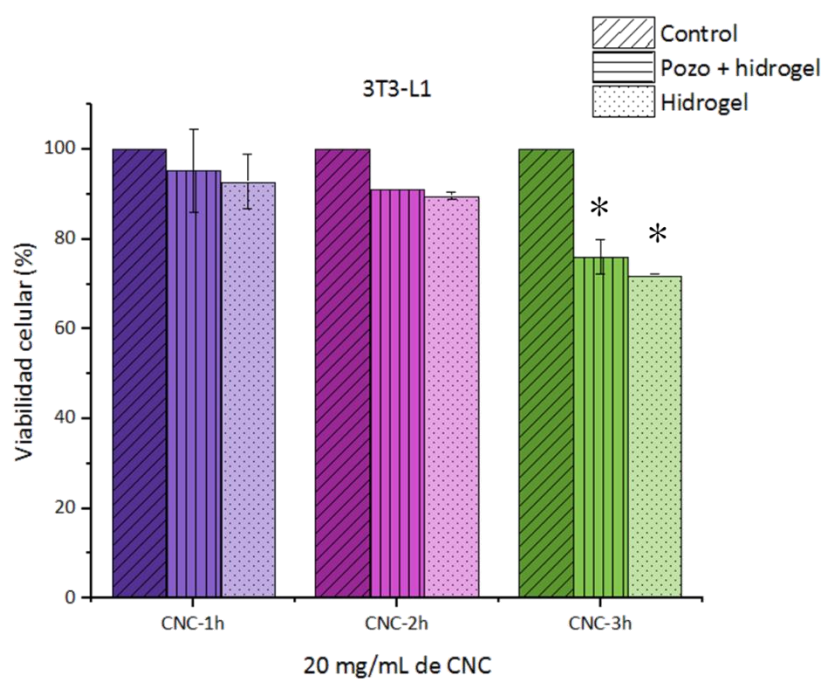


Figura 35.- Ensayo Azul Alamar utilizando resazurina para evaluar la actividad metabólica de fibroblastos 3T3-L1 en contacto con 20 mg/mL de CNC funcionalizados a diferentes tiempos. El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA-two way, con el Software GraphPad Prism; en donde * $p < 0.05$ que demuestra que se mostraron diferencias significativas respecto al control. Además, se demostró que existe una diferencia significativa entre las medias de los pozos en CNC-1h y CNC-3h, también en los hidrogeles entre CNC 3h con CNC 1h y CNC2h

En resumen, se puede concluir que los valores de viabilidad celular de ambos tipos de células, que está directamente relacionado con la actividad metabólica, demuestran que el hidrogel de CNC en una concentración de 20 mg/mL se mantienen por encima del 70 % para HT-29 y por encima del 75% para 3T3-L1, siendo esto una señal de que el hidrogel no presenta toxicidades significativas. Además, cabe destacar que se consiguió estudiar el % de viabilidad celular dentro de los hidrogeles de CNC y que estos se mantuvieron por encima del 87.8% para HT-29 y por encima de 94.6% para 3T3-L1. Lo cual demuestra que el hidrogel retiene a la mayoría de las células cultivadas inicialmente.

7.3.3 Morfología celular en hidrogeles mediante microscopía confocal

Se utilizó el microscopio confocal como una técnica de observación para analizar áreas de interés que incluyeran a los fibroblastos 3T3-L1 cultivados en un hidrogel de CNC-3h al 2%. Las imágenes se obtuvieron de un formato en z-Stack esto permitió el análisis en diferentes planos en un rango de 100 μm en la dirección z.

En la Figura 36 se presentan cinco canales diferentes; (1) campo claro, donde se aprecia una imagen inicial de la muestra; (2) blanco de calcoflúor, donde se muestra la fluorescencia emitida por los CNC teñidos que fueron excitados con una longitud de onda de 365 nm; (3) yoduro de propidio; donde se muestra la fluorescencia emitida por el ADN de los fibroblastos 3T3-L1 que fue excitado a 535 nm; (4) CNC-3T3-L1, que muestra las imágenes superpuestas de los canales (2) y (3); (5) Campo claro-3T3-L1, que muestra las imágenes superpuestas de los canales (1) y (3).

En la Figura 36, se presentan cinco planos diferentes, dispuestos en orden de superior a inferior. El plano d) corresponde a la capa que está en contacto directo con la superficie de la caja de cultivo. En este plano, se pueden observar los fibroblastos con su morfología característica cuando están adheridos a la superficie de la caja en la que se están cultivando, la cual corresponde a una morfología fusiforme.

En a), b) y c) se pueden ver tres células marcadas individualmente en el canal de yoduro de propidio en las cuales su núcleo presenta una morfología circular y de menor tamaño a diferencia de aquellas adheridas a la superficie. En el canal correspondiente a Campo claro-3T3-L1 se pueden observar las células completas superpuesta a la imagen de campo claro, que presenta una morfología diferente a aquellas con morfología fusiforme. El cambio en la morfología de las células se debe al crecimiento tridimensional que están experimentando al estar inmersas en el hidrogel de CNC, esto significa que

los nanocrisales de celulosa brindan el soporte suficiente para que estas puedan mantenerse dentro de él.

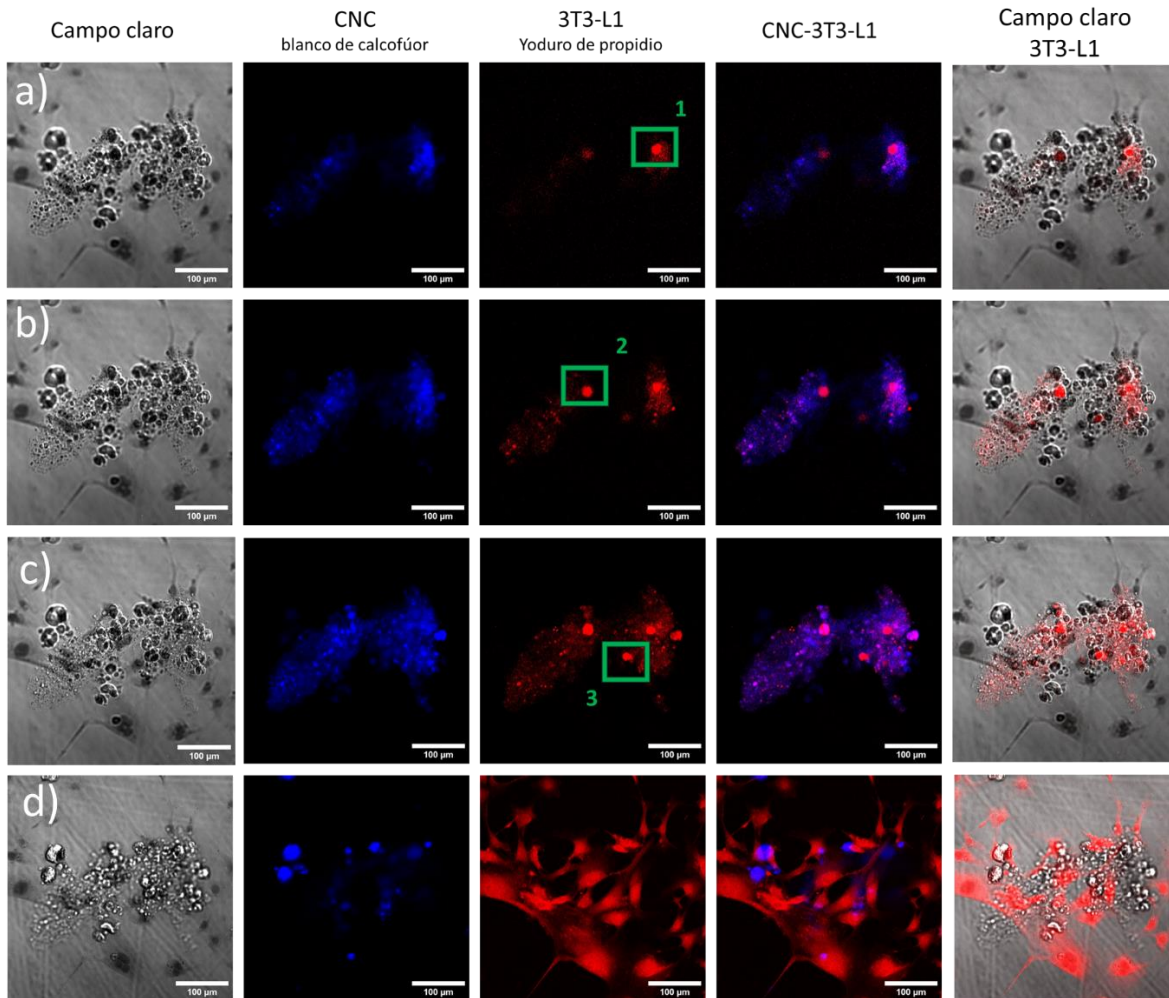


Figura 36.- Imágenes obtenidas por el microscopio confocal donde se tomó un z-Stack con cinco diferentes canales. En rojo fibroblastos 3T3-L1 (yoduro de propidio), en azul hidrogel de CNC-3h al 2% en peso (blanco de calcoflúor). Imágenes ordenadas de los planos superiores a los inferiores del z-Stack que corresponden con a), b), c) y d) respectivamente.

La Figura 37 y la Figura 38 muestran una construcción tridimensional de este conjunto de imágenes z-Stack. La Figura 38 muestra una vista superior al cultivo de celular, y en b), se pueden identificar las células previamente resaltadas en la Figura 36, que están rodeadas de los CNC. Por su parte, la Figura 38 proporciona una vista lateral de esta reconstrucción tridimensional, lo que ayuda a comprender el grosor de la muestra (110 μm).

Los fibroblastos que se encuentran suspendidos en la matriz del hidrogel de CNC-3h (con una concentración del 2% en peso), como se puede apreciar en la Figura 38, sufren un cambio en su estructura. Esta morfología es indicativa de un crecimiento en tres dimensiones y es el resultado de

las fuerzas de interacción física generadas entre los cristales de CNC los cuales generan un mejor soporte para las células al añadir grupos -COOH. Estas interacciones que se desarrollan dentro de la red tridimensional pueden ser de naturaleza electrostáticas, enlaces hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. El fenómeno morfológico en que las células cambian su disposición tridimensional se atribuye a la tensión cortical que ejerce el citoesqueleto submembranoso, lo que a su vez influye en la tensión superficial de la membrana celular lipídica. En geles hidratados, las fuerzas adhesivas y contráctiles dan forma al tejido en estructuras esféricas isotrópicas.⁸⁹ Cabe mencionar que no se encontraron agregados celulares en la muestra del cultivo de células.

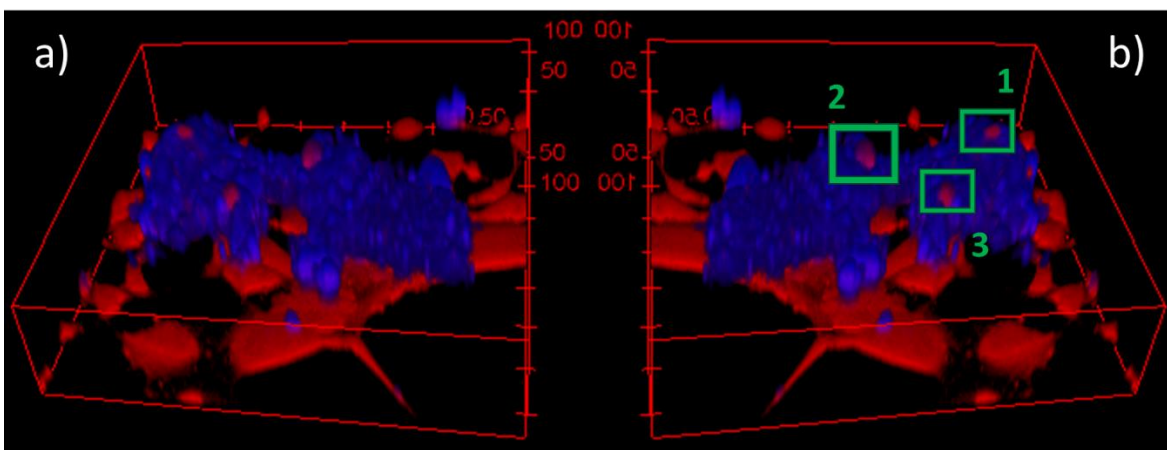


Figura 37.- Reconstrucción tridimensional. a) Vista superior. b) Imagen espejo de (a) Se remarcan las células en 3D.

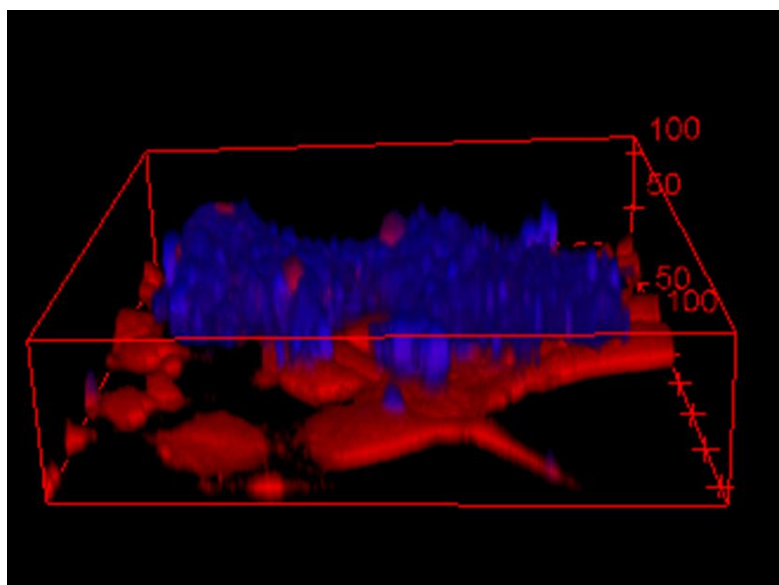


Figura 38.- Reconstrucción tridimensional vista lateral. Se aprecian las células 3T3-L1 marcadas en la Figura 37 como 1, 2 y 3.

Como se discutió anteriormente en la sección 7.3.2, los hidrogeles de CNC-COOH presentaron un contenido de células superior al 94.6% (Figura 35). Este hallazgo coincide con lo que se refleja en las imágenes obtenidas por microscopía confocal, donde las células que permanecieron adheridas al pozo (Figura 36d) mantienen la estructura fusiforme característica de un cultivo bidimensional.

7.4 Adsorción de proteínas

7.4.1 Método de Bradford

En esta sección, se exploró la interacción entre la albúmina de suero bovino (BSA) y los CNC carboxilados (CNC-3h). Según los resultados obtenidos en el apartado 7.2.2, al examinar las imágenes del microscopio confocal, se pudo notar que los CNC al estar en contacto con el DMEM tendían a formar agregados, lo que resultaba en una distribución más densa de los CNC. Además, las imágenes de SEM también revelaron cambios en la morfología de los aerogeles de CNC cuando se exponían al DMEM en comparación a cuando estaban en contacto con el agua.

La morfología del hidrogel generada por el DMEM actuará como el soporte estructural con el cual las células interactúan para adherirse, interactuar y proliferar. Además, en los ensayos de la sección 7.3.2, se evidenció que un gran porcentaje de las células vivas se encontraban inmersas en los hidrogeles, en contacto con las aglomeraciones de los CNC. Por lo tanto, se realizó un estudio para determinar si la presencia de las proteínas en el DMEM tenía alguna influencia en la formación de estas aglomeraciones, posiblemente interaccionando con los grupos -COOH de los CNC.

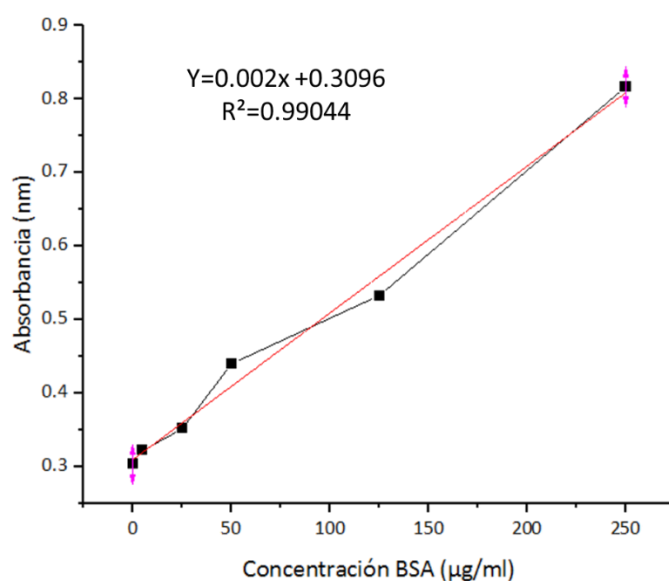


Figura 39.- Curva de calibración para concentraciones conocidas de BSA

La adsorción de la albúmina de suero bovino (BSA) fue estudiada en experimentos de adsorción midiendo la concentración libre de BSA en los CNC-3h, mediante espectroscopía UV-Vis. El cálculo de la concentración final de BSA se obtuvo mediante una curva de calibración previamente realizada (Figura 39).

La medición arrojó resultados de 263.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA presentes en la muestra de CNC, al ser 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la concentración inicial se puede argumentar que el hidrogel de CNC perdió una mínima cantidad de agua al estar incubado a 37°C por 48 horas lo que llevó a que la muestra terminara más concentrada. Por otra parte, se puede concluir también que los CNC no adsorben BSA al estar cargados negativamente, lo cual es resultado de la funcionalización con grupos carboxílicos. Lo cual es consistente con lo reportado en otros trabajos donde se estudió la unión de la BSA en cristales de celulosa cargados positiva (modificados con piridinio) y negativamente (sulfatados y carboxilados).⁹⁰ Cabe mencionar que los lavados con PBS ayudan a bajar la acidez de los CNC funcionalizados para evitar generar toxicidad en las células.

Con este estudio se pudo verificar que la presencia de aglomeraciones en los hidrogeles de CNC al estar en contacto con el DMEM no se origina directamente a la adsorción de proteínas. En su lugar, se deben a diferencias en las concentraciones de los medios acuosos utilizados el proceso de retención. Inicialmente, el hidrogel de CNC se dispersa en agua, y luego se le agrega el DMEM. Esta secuencia de pasos conduce a la formación de aglomeraciones, donde un grupo de CNC previamente hidratados en agua quedan suspendidos en la solución de proteínas y sales presentes en el DMEM. Este estudio fue de utilidad ya que demuestra que la diferencia de carga entre los andamios para cultivo celular debe ser considerada si se busca modular la adsorción de cierto tipo de proteínas.

8 Conclusiones

La esterificación de los CNC con el uso del DES de OxAcDi/ChCl se confirmó mediante espectros FTIR, identificando una banda característica alrededor de 1740 cm^{-1} . La cantidad de grupos $-\text{COOH}$ se determinó conductimétricamente con NaOH, alcanzando valores de hasta 375 mmol/Kg para la muestra de CNC-3 horas. Además, se comprobó que la morfología y cristalinidad de los CNC se mantuvieron intactas, utilizando las técnicas de AFM y XRD, respectivamente.

Los estudios sobre la formación de hidrogeles demostraron que un hidrogel de CNC al 2% mantiene sus propiedades a nivel macroscópico y es predominantemente elástico a frecuencias altas. No obstante, se observó que los CNC liofilizados tienden a formar agregados, con esto se decidió dispersar los CNC en etanol, evitando que se sequen en el proceso. También se determinó que el origen de estos agregados no dependía de las interacciones entre las proteínas presentes en el medio si no a las diferencias de concentración entre los medios utilizados por el método de formación del hidrogel.

Los estudios comparativos de material de CNC-COOH resultaron no presentar toxicidad en las células de tejido conectivo 3T3-L1 y no conectivo HT-29, incluso a una concentración de 4 mg/mL . Sin embargo, los CNC generaban niveles de pH ácido (4), que se neutralizaron con lavados de PBS. Los estudios por reducción de resazurina revelaron que la mayoría de las células iniciales permanecieron inmersas en los CNC, aproximadamente el 100% para HT-29 y 94.6% para 3T3-L1 en CNC-3h. Con una actividad metabólica menor para HT-29 que para 3T3-L1, quizás debido a que los fibroblastos, siendo tejido conectivo, favorecen la viabilidad mediante la homeostasis generada por su entramado.

El estudio de la morfología de las células 3T3-L1 después de 48 h de cultivo determinaron que los fibroblastos suspendidos en el hidrogel de CNC presentaron un cambio de morfología comparado con aquellos adheridos al pozo, esto generado por las fuerzas de interacción física entre los CNC, los cuales generan un mejor soporte para las células al añadir grupos $-\text{COOH}$.

En este trabajo, se desarrolló exitosamente un hidrogel utilizando CNC funcionalizados con grupos $-\text{COOH}$ mediante el uso de un DES compuesto de OxAcDi/ChCl. Este hidrogel exhibió propiedades químicas, físicas, mecánicas y biocompatibles que, en conjunto, proporcionaron un soporte físico para las células HT-29 y los 3T3-L1. En el caso de los fibroblastos se observó un cambio en su morfología como resultado de interacciones tridimensionales. Estos resultados respaldan la hipótesis formulada inicialmente.

9 Perspectivas

Los hidrogeles de nanocristales de celulosa son un material con gran potencial en aplicaciones para el cultivo celular. Los resultados alcanzados en este proyecto demuestran de manera concluyente que los objetivos planteados se pudieron cumplir en su totalidad. No obstante, es importante destacar que el desarrollo de este proyecto sienta las bases para futuras mejoras que pueden derivarse de los resultados obtenidos, y que existen oportunidades de mejora y optimización de algunos procedimientos. Algunos puntos por remarcar son los siguientes:

- Investigar la funcionalización de los nanocristales de celulosa en mediante reacciones con el DES OxAcDi/ChCl utilizando diferentes relaciones molares, con el fin de incrementar el número de ácidos carboxílicos por tiempo de reacción.
- Realizar pruebas de retención de agua y DMEM a diferentes relaciones volumen-volumen entre estos dos componentes, con el fin de generar mejor respuesta en los ensayos de viabilidad al ajustar un porcentaje mayor de DMEM.
- Realizar pruebas reológicas utilizando hidrogeles con porcentajes mayores de CNC con el fin de ajustar sus propiedades reológicas de los hidrogeles a las necesidades específicas de cada línea celular.
- Realizar ensayos de resazurina durante periodos de tiempo más largos, optimizando procesos para detectar cambios en la proliferación o viabilidad a largo plazo.
- Estudiar morfología celular con mayor detalle en el microscopio confocal utilizando un fluorocromo específico para teñir el citoesqueleto, esto proporcionaría información valiosa sobre el comportamiento morfológico de las células y cómo interactúan con los hidrogeles.
- Realizar ensayos de microscopía confocal utilizando hidrogeles de CNC con diferentes cantidades de grupos -COOH en su superficie, con el fin de determinar si existe alguna concentración ideal.

Referencias bibliográficas

- (1) Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, L.; Darnell, J. *Biología Celular y Molecular*; 2004.
- (2) Plikus, M. V.; Wang, X.; Sinha, S.; Forte, E.; Thompson, S. M.; Herzog, E. L.; Driskell, R. R.; Rosenthal, N.; Biernaskie, J.; Horsley, V. Fibroblasts: Origins, Definitions, and Functions in Health and Disease. *Cell* **2021**, *184* (15), 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>.
- (3) Parry, D. A. D.; Craig, A. S. Growth and Development of Collagen Fibrils in Connective Tissue. *Ultrastruct. Connect. Tissue Matrix* **1984**, *2* (1), 34–64. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2831-5_2.
- (4) Hussey, G. S.; Dziki, J. L.; Badylak, S. F. Extracellular Matrix-Based Materials for Regenerative Medicine. *Nat. Rev. Mater.* **2018**, *3* (7), 159–173. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0023-x>.
- (5) Leppiniemi, J.; Mutahir, Z.; Dulebo, A.; Mikkonen, P.; Nuopponen, M.; Turkki, P.; Hytönen, V. P. Avidin-Conjugated Nanofibrillar Cellulose Hydrogel Functionalized with Biotinylated Fibronectin and Vitronectin Promotes 3D Culture of Fibroblasts. *Biomacromolecules* **2021**, *22* (10), 4122–4137. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00579>.
- (6) Anton, D.; Burckel, H.; Josset, E.; Noel, G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (3), 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>.
- (7) Xi, W.; Saleh, J.; Yamada, A.; Tomba, C.; Mercier, B.; Janel, S.; Dang, T.; Soleilhac, M.; Djemat, A.; Wu, H.; Romagnolo, B.; Lafont, F.; Mège, R. M.; Chen, Y.; Delacour, D. Modulation of Designer Biomimetic Matrices for Optimized Differentiated Intestinal Epithelial Cultures. *Biomaterials* **2022**, *282*, 121380. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121380>.
- (8) Willcox, M. D. P.; Phillips, B.; Ozkan, J.; Jalbert, I.; Meagher, L.; Gengenbach, T.; Holden, B.; Papas, E. Interactions of Lens Care with Silicone Hydrogel Lenses and Effect on Comfort. *Optom. Vis. Sci.* **2010**, *87* (11), 839–846. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181f3e2fc>.
- (9) Yin, F.; Lin, L.; Zhan, S. Preparation and Properties of Cellulose Nanocrystals, Gelatin, Hyaluronic Acid Composite Hydrogel as Wound Dressing. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2019**, *30* (3), 190–201. <https://doi.org/10.1080/09205063.2018.1558933>.
- (10) Alves, D. A.; Machado, D.; Melo, A.; Pereira, R. F. C.; Severino, P.; Hollanda, L. M. De; Araújo, D. R.; Lancellotti, M. Preparation of Thermosensitive Gel for Controlled Release of Levofloxacin and Their Application in the Treatment of Multidrug-Resistant Bacteria. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/9702129>.
- (11) Jung, I. Y.; Kim, J. S.; Choi, B. R.; Lee, K.; Lee, H. Hydrogel Based Biosensors for In Vitro Diagnostics of Biochemicals, Proteins, and Genes. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (12), 1–19. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601475>.

- (12) Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- (13) Saydé, T.; Hamoui, O. El; Alies, B.; Gaudin, K.; Lespes, G.; Battu, S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials* **2021**, *11* (2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/nano11020481>.
- (14) Sui, B.; Zhang, Y.; Huang, L.; Chen, Y.; Li, D.; Li, Y.; Yang, B. Fluorescent Nanofibrillar Hydrogels of Carbon Dots and Cellulose Nanocrystals and Their Biocompatibility. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (50), 18492–18499. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06198>.
- (15) Miyata, T. Preparation of Smart Soft Materials Using Molecular Complexes. *Polym. J.* **2010**, *42* (4), 277–289. <https://doi.org/10.1038/pj.2010.12>.
- (16) Curvello, R.; Raghuvanshi, V. S.; Garnier, G. Engineering Nanocellulose Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *267*, 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.002>.
- (17) Caliari, S. R.; Burdick, J. A. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. *Nat. Methods* **2016**, *13* (5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>.
- (18) Yang, Y.; Xu, L.; Wang, J.; Meng, Q.; Zhong, S.; Gao, Y.; Cui, X. Recent Advances in Polysaccharide-Based Self-Healing Hydrogels for Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *283* (January), 119161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119161>.
- (19) Zhu, J.; Marchant, R. E. Design Properties of Hydrogel Tissue-Engineering Scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* **2011**, *8* (5), 607–626. <https://doi.org/10.1586/erd.11.27>.
- (20) Moberg, T.; Sahlin, K.; Yao, K.; Geng, S.; Westman, G.; Zhou, Q.; Oksman, K.; Rigdahl, M. Rheological Properties of Nanocellulose Suspensions: Effects of Fibril/Particle Dimensions and Surface Characteristics. *Cellulose* **2017**, *24* (6), 2499–2510. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1283-0>.
- (21) Galante, R.; Pinto, T. J. A.; Colaço, R.; Serro, A. P. Sterilization of Hydrogels for Biomedical Applications: A Review. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2018**, *106* (6), 2472–2492. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34048>.
- (22) Gyles, D. A.; Castro, L. D.; Silva, J. O. C.; Ribeiro-Costa, R. M. A Review of the Designs and Prominent Biomedical Advances of Natural and Synthetic Hydrogel Formulations. *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 373–392. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.027>.
- (23) Hazur, J.; Endrizzi, N.; Schubert, D. W.; Boccaccini, A. R.; Fabry, B. Stress Relaxation Amplitude of Hydrogels Determines Migration, Proliferation, and Morphology of Cells in 3-D Culture. *Biomater. Sci.* **2022**, *10* (1), 270–280. <https://doi.org/10.1039/d1bm01089a>.
- (24) Aisenbrey, E. A.; Murphy, W. L. Synthetic Alternatives to Matrigel. *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5* (7), 539–551. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>.

- (25) Li, Y.; Khuu, N.; Gevorkian, A.; Sarjinsky, S.; Therien-Aubin, H.; Wang, Y.; Cho, S.; Kumacheva, E. Supramolecular Nanofibrillar Thermoreversible Hydrogel for Growth and Release of Cancer Spheroids. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (22), 6083–6087. <https://doi.org/10.1002/anie.201610353>.
- (26) Kargarzadeh, H.; Mariano, M.; Gopakumar, D.; Ahmad, I.; Thomas, S.; Dufresne, A.; Huang, J.; Lin, N. *Advances in Cellulose Nanomaterials*; Springer Netherlands, 2018; Vol. 25. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1723-5>.
- (27) Dufresne, A. Nanocellulose: A New Ageless Bionanomaterial. *Mater. Today* **2013**, *16* (6), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004>.
- (28) Jedvert, K.; Heinze, T. Cellulose Modification and Shaping - A Review. *J. Polym. Eng.* **2017**, *37* (9), 845–860. <https://doi.org/10.1515/polyeng-2016-0272>.
- (29) Domingues, R. M. A.; Gomes, M. E.; Reis, R. L. The Potential of Cellulose Nanocrystals in Tissue Engineering Strategies. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (7), 2327–2346. <https://doi.org/10.1021/bm500524s>.
- (30) Shan, Y.; Li, C.; Wu, Y.; Li, Q.; Liao, J. Hybrid Cellulose Nanocrystal/Alginate/Gelatin Scaffold with Improved Mechanical Properties and Guided Wound Healing. *RSC Adv.* **2019**, *9* (40), 22966–22979. <https://doi.org/10.1039/c9ra04026a>.
- (31) Huerta-Marcial, S. T.; Ruiz-Deance, A. L.; Mota-Morales, J. D. Bringing Sustainability to Macroporous Polystyrene: Cellulose Nanocrystals as Cosurfactant and Surface Modifier in Deep Eutectic Solvent-Based Emulsion Templating. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9* (45), 15109–15116. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05943>.
- (32) Habibi, Y.; Lucia, L. A.; Rojas, O. J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3479–3500.
- (33) Sadeghifar, H.; Filpponen, I.; Clarke, S. P.; Brougham, D. F.; Argyropoulos, D. S. Production of Cellulose Nanocrystals Using Hydrobromic Acid and Click Reactions on Their Surface. *J. Mater. Sci.* **2011**, *46* (22), 7344–7355. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5696-0>.
- (34) Chen, Y. W.; Lee, H. V.; Abd Hamid, S. B. Preparation and Characterization of Cellulose Crystallites via Fe(III)-, Co(II)- and Ni(II)-Assisted Dilute Sulfuric Acid Catalyzed Hydrolysis Process. *J. Nano Res.* **2016**, *41*, 96–109. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.41.96>.
- (35) Ribeiro, R. S. A.; Pohlmann, B. C.; Calado, V.; Bojorge, N.; Pereira, N. Production of Nanocellulose by Enzymatic Hydrolysis: Trends and Challenges. *Eng. Life Sci.* **2019**, *19* (4), 279–291. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800158>.
- (36) Seddiqi, H.; Oliaei, E.; Honarkar, H.; Jin, J.; Geonzon, L. C.; Bacabac, R. G.; Klein-Nulend, J. *Cellulose and Its Derivatives: Towards Biomedical Applications*; Springer Netherlands, 2021; Vol. 28. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03674-w>.
- (37) Mohd Amin, K. N.; Annamalai, P. K.; Morrow, I. C.; Martin, D. Production of Cellulose

Nanocrystals via a Scalable Mechanical Method. *RSC Adv.* **2015**, *5* (70), 57133–57140.
<https://doi.org/10.1039/c5ra06862b>.

- (38) Chang, C.; Zhang, L. Cellulose-Based Hydrogels: Present Status and Application Prospects. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84* (1), 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.023>.
- (39) De France, K. J.; Hoare, T.; Cranston, E. D. Review of Hydrogels and Aerogels Containing Nanocellulose. *Chem. Mater.* **2017**, *29* (11), 4609–4631.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b00531>.
- (40) Foster, E. J.; Moon, R. J.; Agarwal, U. P.; Bortner, M. J.; Bras, J.; Camarero-Espinosa, S.; Chan, K. J.; Clift, M. J. D.; Cranston, E. D.; Eichhorn, S. J.; Fox, D. M.; Hamad, W. Y.; Heux, L.; Jean, B.; Korey, M.; Nieh, W.; Ong, K. J.; Reid, M. S.; Renneckar, S.; Roberts, R.; Shatkin, J. A.; Simonsen, J.; Stinson-Bagby, K.; Wanasekara, N.; Youngblood, J. Current Characterization Methods for Cellulose Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (8), 2609–2679. <https://doi.org/10.1039/c6cs00895j>.
- (41) Grignon, J.; Scallan, A. M. Effect of PH and Neutral Salts upon the Swelling of Cellulose Gels. *J. Appl. Polym. Sci.* **1980**, *25* (12), 2829–2843.
<https://doi.org/10.1002/app.1980.070251215>.
- (42) Chinga-Carrasco, G.; Syverud, K. Pretreatment-Dependent Surface Chemistry of Wood Nanocellulose for PH-Sensitive Hydrogels. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *29* (3), 423–432.
<https://doi.org/10.1177/0885328214531511>.
- (43) Liu, J.; Chinga-Carrasco, G.; Cheng, F.; Xu, W.; Willför, S.; Syverud, K.; Xu, C. Hemicellulose-Reinforced Nanocellulose Hydrogels for Wound Healing Application. *Cellulose* **2016**, *23* (5), 3129–3143. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1038-3>.
- (44) Ma, X.; Zhang, Y.; Huang, J. Surface Chemical Modification of Cellulose Nanocrystals and Its Application in Biomaterials. *Pap. Biomater.* **2017**, *2* (4), 34–57.
<https://doi.org/10.26599/pbm.2017.9260026>.
- (45) Sirviö, J. A.; Visanko, M.; Liimatainen, H. Deep Eutectic Solvent System Based on Choline Chloride-Urea as a Pre-Treatment for Nanofibrillation of Wood Cellulose. *Green Chem.* **2015**, *17* (6), 3401–3406. <https://doi.org/10.1039/c5gc00398a>.
- (46) Mota-Morales, J. D.; Morales-Narváez, E. Transforming Nature into the next Generation of Bio-Based Flexible Devices: New Avenues Using Deep Eutectic Systems. *Matter* **2021**, *4* (7), 2141–2162. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.05.009>.
- (47) Wagle, D. V.; Zhao, H.; Baker, G. A. Deep Eutectic Solvents: Sustainable Media for Nanoscale and Functional Materials. *ChemInform* **2014**, *45* (41), no-no.
<https://doi.org/10.1002/chin.201441292>.
- (48) Abbott, A. P.; Barron, J. C.; Ryder, K. S.; Wilson, D. Eutectic-Based Ionic Liquids with Metal-Containing Anions and Cations. *Chem. - A Eur. J.* **2007**, *13* (22), 6495–6501.
<https://doi.org/10.1002/chem.200601738>.

- (49) El Achkar, T.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Basics and Properties of Deep Eutectic Solvents: A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19* (4), 3397–3408. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>.
- (50) Abbott, A. P.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K.; Tambyrajah, V. Novel Solvent Properties of Choline Chloride/Urea Mixtures. *Chem. Commun.* **2003**, No. 1, 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>.
- (51) García, G.; Aparicio, S.; Ullah, R.; Atilhan, M. Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications. *Energy and Fuels* **2015**, *29* (4), 2616–2644. <https://doi.org/10.1021/ef5028873>.
- (52) Morrison, H. G.; Sun, C. C.; Neervannan, S. Characterization of Thermal Behavior of Deep Eutectic Solvents and Their Potential as Drug Solubilization Vehicles. *Int. J. Pharm.* **2009**, *378* (1–2), 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.039>.
- (53) Singh, B. S.; Lobo, H. R.; Shankarling, G. S. Choline Chloride Based Eutectic Solvents: Magical Catalytic System for Carbon-Carbon Bond Formation in the Rapid Synthesis of β -Hydroxy Functionalized Derivatives. *Catal. Commun.* **2012**, *24*, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2012.03.021>.
- (54) Hae, Y.; Spronsen, J. Van; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Witkamp, G.; Verpoorte, R.; Physiology, S. P.; August, N. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology. *Am. Soc. plant Biol.* **2011**, *156* (4), 1701–1705.
- (55) Abbott, A. P.; Bell, T. J.; Handa, S.; Stoddart, B. Cationic Functionalisation of Cellulose Using a Choline Based Ionic Liquid Analogue. *Green Chem.* **2006**, *8* (9), 784–786. <https://doi.org/10.1039/b605258d>.
- (56) Sirviö, J. A.; Visanko, M.; Liimatainen, H. Acidic Deep Eutectic Solvents As Hydrolytic Media for Cellulose Nanocrystal Production. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (9), 3025–3032. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00910>.
- (57) Wei, Z.; Wang, D.; Chen, Y.; Yu, D.; Ding, Q.; Li, R.; Wu, C. The H-Bond Evolution of Cellulose Nanofibrils Treated with Choline Chloride/Oxalic Acid. *Cellulose* **2022**, *29* (7), 3675–3687. <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04517-6>.
- (58) Lim, W. L.; Gunny, A. A. N.; Kasim, F. H.; Gopinath, S. C. B.; Kamaludin, N. H. I.; Arbain, D. Cellulose Nanocrystals from Bleached Rice Straw Pulp: Acidic Deep Eutectic Solvent versus Sulphuric Acid Hydrolyses. *Cellulose* **2021**, *28* (10), 6183–6199. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03914-7>.
- (59) Cao, X.; Liu, M.; Bi, W.; Lin, J.; Chen, D. D. Y. Direct Carboxylation of Cellulose in Deep Eutectic Solvent and Its Adsorption Behavior of Methylene Blue. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2022**, *4* (March), 100222. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100222>.
- (60) Dassanayake, R. S.; Dissanayake, N.; Fierro, J. S.; Abidi, N.; Quitevis, E. L.; Boggavarappu, K.; Thalangamaarachige, V. D. Characterization of Cellulose Nanocrystals by Current

Spectroscopic Techniques. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2023**, *58* (3), 180–205.
<https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1951283>.

- (61) Giessibl, F. J. Advances in Atomic Force Microscopy. *Rev. Mod. Phys.* **2003**, *75* (3), 949–983.
<https://doi.org/10.1103/RevModPhys.75.949>.
- (62) Brinkmann, A.; Chen, M.; Couillard, M.; Jakubek, Z. J.; Leng, T.; Johnston, L. J. Correlating Cellulose Nanocrystal Particle Size and Surface Area. *Langmuir* **2016**, *32* (24), 6105–6114.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01376>.
- (63) Segal, L.; Creely, J. J.; Martin, A. E.; Conrad, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text. Res. J.* **1959**, *29* (10), 786–794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>.
- (64) Christopher W., M. *Rheology: Principles, Measurements and Applications*; 1996; Vol. 86.
[https://doi.org/10.1016/s0032-5910\(96\)90008-x](https://doi.org/10.1016/s0032-5910(96)90008-x).
- (65) Alexandrescu, L.; Syverud, K.; Gatti, A.; Chinga-Carrasco, G. Cytotoxicity Tests of Cellulose Nanofibril-Based Structures. *Cellulose* **2013**, *20* (4), 1765–1775.
<https://doi.org/10.1007/s10570-013-9948-9>.
- (66) Mitchell, D. M.; Ball, J. M. Characterization of a Spontaneously Polarizing HT-29 Cell Line, HT-29/Cl.F8. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **2004**, *40* (10), 297–302.
<https://doi.org/10.1290/04100061.1>.
- (67) Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *2018* (6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>.
- (68) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, No. 65, 55–63.
[https://doi.org/DOI: 10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/DOI:10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- (69) Lin, Y. J.; Qin, Z.; Paton, C. M.; Fox, D. M.; Kong, F. Influence of Cellulose Nanocrystals (CNC) on Permeation through Intestinal Monolayer and Mucus Model in Vitro. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *263* (March), 117984. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117984>.
- (70) Hanif, Z.; Ahmed, F. R.; Shin, S. W.; Kim, Y. K.; Um, S. H. Size- and Dose-Dependent Toxicity of Cellulose Nanocrystals (CNC) on Human Fibroblasts and Colon Adenocarcinoma. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *119*, 162–165.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.018>.
- (71) Prabst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hubner, H.; Ates, G.; Vanhaeke, T.; Rogiers, V.; Rodrigues, R.; Chan, L. L.-Y.; McCulley, K. J.; Kessel, S. L.; Ivanov, D. P.; Grabowska, A. M.; Garnett, M. C.; Suganuma, N.; Molefe, N. I.; Inoue, N. *Cell Viability Assays: Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST and Resazurin*; 2017; Vol. 1601.
- (72) Alexandratou, E.; Yova, D.; Handris, P.; Kletsas, D.; Loukas, S. Human Fibroblast Alterations Induced by Low Power Laser Irradiation at the Single Cell Level Using Confocal Microscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (8), 547–552. <https://doi.org/10.1039/b110213n>.

- (73) Peretz, R.; Mamane, H.; Sterenzon, E.; Gerchman, Y. Rapid Quantification of Cellulose Nanocrystals by Calcofluor White Fluorescence Staining. *Cellulose* **2019**, *26* (2), 971–977. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2162-z>.
- (74) Riccardi, C.; Nicoletti, I. Analysis of Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (3), 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>.
- (75) Kruger, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. *Methods Mol. Biol.* **1994**, *32*, 9–15. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:9>.
- (76) Biosciences. *BCA Protein Assay Kit*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefindmkaj/<https://www.abpbio.com/wp-content/uploads/2017/12/P011.pdf>.
- (77) Martins, D.; Estevinho, B.; Rocha, F.; Dourado, F.; Gama, M. A Dry and Fully Dispersible Bacterial Cellulose Formulation as a Stabilizer for Oil-in-Water Emulsions. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *230* (July 2019), 115657. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115657>.
- (78) Beck, S.; Méthot, M.; Bouchard, J. General Procedure for Determining Cellulose Nanocrystal Sulfate Half-Ester Content by Conductometric Titration. *Cellulose* **2015**, *22* (1), 101–116. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0513-y>.
- (79) Osorio, D. A.; Lee, B. E. J.; Kwiecien, J. M.; Wang, X.; Shahid, I.; Hurley, A. L.; Cranston, E. D.; Grandfield, K. Cross-Linked Cellulose Nanocrystal Aerogels as Viable Bone Tissue Scaffolds. *Acta Biomater.* **2019**, *87*, 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.049>.
- (80) Chen, C.; Sun, W.; Wang, L.; Tajvidi, M.; Wang, J.; Gardner, D. J. Transparent Multifunctional Cellulose Nanocrystal Films Prepared Using Trivalent Metal Ion Exchange for Food Packaging. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2022**, *10* (29), 9419–9430. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01805>.
- (81) Kane, K. I. W.; Lucumi Moreno, E.; Lehr, C. M.; Hachi, S.; Dannert, R.; Sanctuary, R.; Wagner, C.; Fleming, R. M. T.; Baller, J. Determination of the Rheological Properties of Matrigel for Optimum Seeding Conditions in Microfluidic Cell Cultures. *AIP Adv.* **2018**, *8* (12). <https://doi.org/10.1063/1.5067382>.
- (82) L. Cacicedo, M.; E. León, I.; S. Gonzalez, J.; M. Porto, L.; A. Alvarez, V.; Castro, G. R. Modified Bacterial Cellulose Scaffolds for Localized Doxorubicin Release in Human Colorectal HT-29 Cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *140*, 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.007>.
- (83) Tentor, F. R.; de Oliveira, J. H.; Scariot, D. B.; Lazarin-Bidóia, D.; Bonafé, E. G.; Nakamura, C. V.; Venter, S. A. S.; Monteiro, J. P.; Muniz, E. C.; Martins, A. F. Scaffolds Based on Chitosan/Pectin Thermosensitive Hydrogels Containing Gold Nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 1186–1194. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.106>.
- (84) Thangavel, P.; Ramachandran, B.; Muthuvijayan, V. Fabrication of Chitosan/Gallic Acid 3D Microporous Scaffold for Tissue Engineering Applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2016**, *104* (4), 750–760. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33603>.

- (85) Govindaraj, P.; Raghavachari, D. Fabrication of Macroporous Soft Hydrogels of Chitosan Scaffolds by Hydrothermal Reaction and Cytotoxicity to 3T3 L1 Cells. *J. Polym. Res.* **2021**, *28* (3), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10965-021-02426-z>.
- (86) Bombaldi de Souza, F. C.; Bombaldi de Souza, R. F.; Drouin, B.; Mantovani, D.; Moraes, Â. M. Comparative Study on Complexes Formed by Chitosan and Different Polyanions: Potential of Chitosan-Pectin Biomaterials as Scaffolds in Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.187>.
- (87) Strätz, J.; Liedmann, A.; Heinze, T.; Fischer, S.; Groth, T. Effect of Sulfation Route and Subsequent Oxidation on Derivatization Degree and Biocompatibility of Cellulose Sulfates. *Macromol. Biosci.* **2020**, *20* (2). <https://doi.org/10.1002/mabi.201900403>.
- (88) Peschel, D.; Zhang, K.; Aggarwal, N.; Brendler, E.; Fischer, S.; Groth, T. Synthesis of Novel Celluloses Derivatives and Investigation of Their Mitogenic Activity in the Presence and Absence of FGF2. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (6), 2116–2125. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.032>.
- (89) Eyckmans, J.; Chen, C. S. 3D Culture Models of Tissues under Tension. *J. Cell Sci.* **2017**, *130* (1), 63–70. <https://doi.org/10.1242/jcs.198630>.
- (90) Lombardo, S.; Eyley, S.; Schütz, C.; Van Gorp, H.; Rosenfeldt, S.; Van Den Mooter, G.; Thielemans, W. Thermodynamic Study of the Interaction of Bovine Serum Albumin and Amino Acids with Cellulose Nanocrystals. *Langmuir* **2017**, *33* (22), 5473–5481. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00710>.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

"Desarrollo de geles basados en nanocristales de celulosa modificados en sistemas eutécticos profundos para el cultivo 3D de células."

que presenté para obtener el grado de -----Maestria----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente
Griselda Blanco Gtz.

Andrea Griselda Blanco Gutiérrez
No. cuenta: 522008812

(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)