

4º curso - Grado en Física

Departamento de Física de la Materia Condensada

Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.

Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (CSIC-Universidad de Zaragoza)

# Trabajo Fin de Grado

---

## Hidrogeles estructurados para aplicaciones biomédicas

---

Autora

Claudia Tejero Gracia

Directores

Dr. Carlos Sánchez Somolinos

Dr. Jesús del Barrio Lasheras



# ÍNDICE

01.	Introducción y objetivos	1
02.	Materiales y técnicas experimentales	7
2.1.	Preparación de muestras	
2.2.	Ensayos de reología	
2.3.	Ensayos de hinchamiento	
2.4.	Ensayos de compresión	
03.	Resultados	13
3.1.	Discusión del método de dispersión de laponita	
3.1.1.	Curvas de flujo	
3.2.	Ensayos de hinchamiento	
3.3.	Ensayos de compresión	
3.3.1.	Módulo de Young	
3.3.2.	Ensayos de fatiga	
04.	Resumen y conclusiones	22
05.	Bibliografía	23

## 01. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Un gel es un sistema coloidal en donde la fase continua es un sólido y la fase discontinua es un líquido. Cuando la fase líquida del gel es agua se trata de un hidrogel. Típicamente la fase continua de un hidrogel es una red tridimensional de cadenas semiflexibles unidas entre sí por enlaces covalentes (también pueden ser enlaces no covalentes) que tiene la capacidad de alojar una gran cantidad de agua. Este tipo de materiales ha encontrado múltiples aplicaciones en campos tan diversos como la producción de alimentos, la ingeniería de tejidos o la preparación de dispositivos blandos.<sup>[1]</sup>

Existe una amplia variedad de métodos de preparación de hidrogeles, que dan lugar a materiales con propiedades muy diferentes, en función de la aplicación que se busque en cada caso.<sup>[2]</sup> Así, las aplicaciones biomédicas de hidrogeles, como pueden ser la administración de medicamentos, la cura de heridas o los implantes quirúrgicos, requieren características muy exigentes que deben poder ser ajustadas a voluntad, desde las propiedades mecánicas hasta las condiciones de degradación.<sup>[3]</sup>

Si se pretende simular tejidos vivos, los hidrogeles deben tener propiedades mecánicas (como el módulo de Young) similares a este tejido. En la figura 1, se representa el módulo de Young de una serie de tejidos representativos que muestra la diferencia que existe entre ellos.

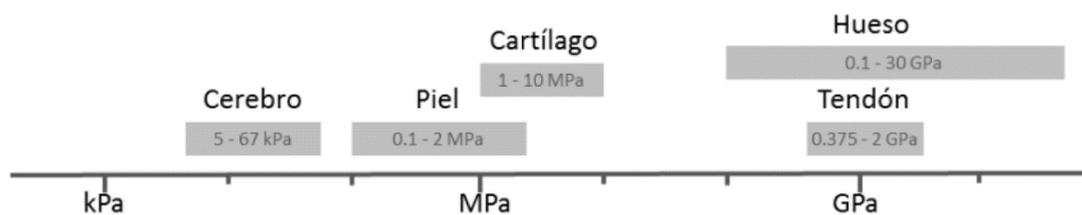


Figura 1: Módulos de Young en distintos tejidos del cuerpo humano.

Los hidrogeles poliméricos, por lo general, son materiales blandos y no soportan una gran deformación. Esto se debe principalmente, al hecho de que este tipo de materiales dista mucho de estar formado por redes poliméricas totalmente conectadas, sino que contienen diferentes tipos de inhomogeneidades, como cadenas sueltas o bucles.<sup>[4]</sup>

Como respuesta a las escasas propiedades mecánicas de los geles habituales, se han desarrollado los llamados hidrogeles robustos (*tough hydrogels* en inglés), entre estos hidrogeles destacan aquellos basados en un polímero que tiene grupos hidrófobos, con reticulación dual (DN), con red interpenetrada (DC) o los nanocompuestos (NC).<sup>[1][5]</sup>

De las distintas posibilidades, nos resultan más interesantes los hidrogeles nanocompuestos por sus aplicaciones potenciales relacionadas con sus excelentes propiedades electrónicas, térmicas o mecánicas en comparación con sus homólogos sin nanopartículas.<sup>[1]</sup> Este tipo de hidrogeles se preparan por interacción de un polímero orgánico con un material que se presente en forma de nanopartículas, como por ejemplo nanoarcillas. Entre las nanoarcillas empleadas en la preparación de estos sistemas, cabe destacar la laponita, que permite obtener materiales muy variados en cuanto a sus propiedades mecánicas, químicas y estructurales, junto con su forma, tamaño, masa, biodegradabilidad y biocompatibilidad.<sup>[6][7]</sup>

Las partículas de laponita, un silicato de litio, sodio y magnesio hidratado, tienen forma de disco y unas dimensiones de unos 10 Å de espesor y 250 Å de diámetro. Estos discos tienen las caras cargadas negativamente y los cantos positivamente. En estado sólido, los discos se presentan apilados, pero la interacción con moléculas de agua, permite que se muevan y que, debido a la interacción electrostática entre ellos, se forme una estructura denominada "castillo de naipes" (ver figura 2).<sup>[8][9]</sup>

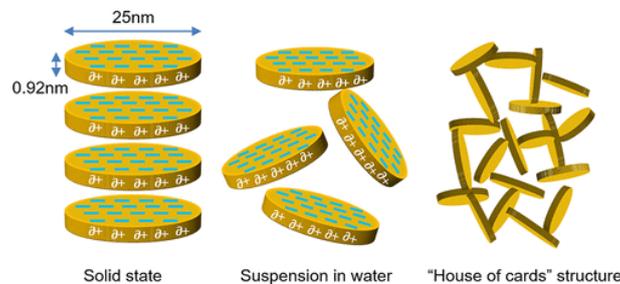


Figura 2: Estructura y dimensiones de los discos de laponita, dispersión en agua y formación de la estructura tipo "castillo de naipes".<sup>[8]</sup>

Los hidrogeles nanocompuestos a base de laponita, son de especial importancia por sus extraordinarias propiedades mecánicas, gran transparencia, altos ratios de hinchamiento, y rápida respuesta a estímulos externos. La mayoría de estas propiedades se atribuyen a su red estructural orgánica (polímero) - inorgánica (arcilla), resultado de emplear las plaquetas (discos) de laponita como agentes multifuncionales de entrecruzamiento. Sin embargo, a pesar de sus propiedades únicas, el comportamiento mecánico de estos hidrogeles dista de ser satisfactorio. Los nanodiscos de laponita previenen la localización del esfuerzo cuando una fuerza externa es aplicada, de manera que el hidrogel resultante puede estirarse en gran medida sin romperse. Por el contrario, siguen teniendo un bajo módulo, lo que limita sus aplicaciones cuando se requieren esfuerzos de carga. La compatibilidad entre las nanopartículas y la matriz del polímero podría determinar en gran medida las propiedades mecánicas de los geles NC. En consecuencia, la clave para conseguir hidrogeles nanocompuestos es resolver los problemas de compatibilidad entre los nanomateriales inorgánicos y la matriz de polímero.<sup>[10][11][12]</sup>

A su vez, uno de los principales campos de investigación con hidrogeles nanocompuestos, es el desarrollo de los llamados hidrogeles inteligentes, que pueden alterar de forma significativa su volumen u otras propiedades ante un estímulo externo como luz, temperatura, pH, o campos magnéticos/eléctricos. Gracias a sus remarcables propiedades estímulo-sensibles, los hidrogeles inteligentes son ampliamente utilizados en aplicaciones como sensores inteligentes, andamiajes en ingeniería de tejidos, cartílago artificial o administración de medicamentos, donde son necesarios sistemas con propiedades mecánicas robustas.<sup>[1][13]</sup>

Como polímero orgánico para la preparación de hidrogeles nanocompuestos, en este trabajo vamos a considerar un derivado del polietilenglicol (PEG) que es un conocido polímero no-tóxico, biocompatible y que ha sido empleado en numerosas aplicaciones farmacéuticas. Este polímero se caracteriza por su gran solubilidad en agua. Además, el PEG puede incorporarse a la superficie de nanopartículas, lo que disminuye su agregación y potencia la solubilidad en agua de medicamentos.<sup>[14]</sup>

Por ejemplo, el fluconazol es un potente agente antifúngico de amplio espectro usado para el tratamiento de infecciones provocadas por hongos, tanto sistémicas como superficiales, cuya correcta administración local, biodisponibilidad y eficacia terapéutica se ve mermada por su baja solubilidad en agua. En un trabajo reciente se describe cómo la formación de nanopartículas de fluconazol en presencia de moléculas de PEG aumenta la solubilidad del fármaco, mejorando su actividad antifúngica.<sup>[14]</sup>

Además, los materiales basados en PEG pueden ser potencialmente usados como matrices biomecánicas en medicina regenerativa e implantes de ingeniería de fluidos, incluyendo el reemplazamiento de discos intervertebrales.<sup>[15][16]</sup>

La estrategia utilizada para generar polímeros que contengan PEG en su estructura parte de la sustitución de los grupos OH terminales por un grupo polimerizable como puede ser el grupo acrilato. Como resultado de esta sustitución, se obtiene polietilenglicol diacrilato (PEGDA), un macrómero con extremos reactivos. Este producto ha sido empleado ampliamente en la fabricación de hidrogeles por su síntesis sencilla y su disponibilidad comercial. PEGDA es un fluido de baja viscosidad que es difícil de usar para aplicaciones de polimerización in situ, como la reparación de defectos en segmentos de huesos largos.<sup>[17]</sup>

De este modo, con el fin de obtener un polímero basado en el PEG, se puede llevar a cabo la reacción del diacrilato (PEGDA) con 2,2'-(etilenedioxi)dietanotiol (EDDET), que es un compuesto de bajo peso molecular con dos grupos terminales tiol ampliamente usado como reticulante de cadenas para crear estructuras biocompatibles.<sup>[18]</sup>

En este trabajo se sintetizará un polímero llamado Tiol-Acrilato, como resultado de la reacción entre moléculas de PEGDA y de EDDET en presencia de trietilamina (TEA) como catalizador. Esta reacción, se denomina "adición de Michael" y dará lugar a que ambos monómeros se unan mediante enlaces covalentes a través de los grupos tiol y acrilato. En la polimerización se emplea un defecto de ditiol de forma que queden grupos acrilato terminales sin reaccionar. Este aspecto es importante ya que los grupos acrilato son fundamentales para la reticulación del sistema, dando lugar a la red del hidrogel (ver figura 3).

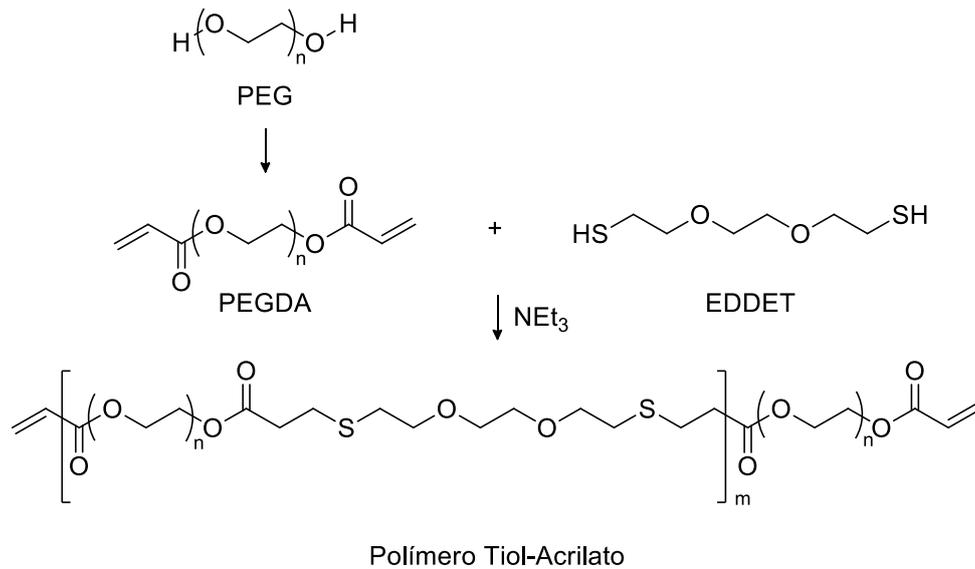


Figura 3: Síntesis del polímero Tiol-Acrilato mediante adición de Michael.

Con el fin de entrecruzar el sistema en una segunda etapa, durante la preparación del polímero se añade un fotoiniciador (IRGacure 2959), que no interacciona con las moléculas mientras no es sometido a radiación UV. Una vez expuesto a esta radiación, las cadenas se entrecruzarán (dobles enlaces) mediante polimerización radicalaria (ver figura 4) formando el hidrogel (ver figura 5).

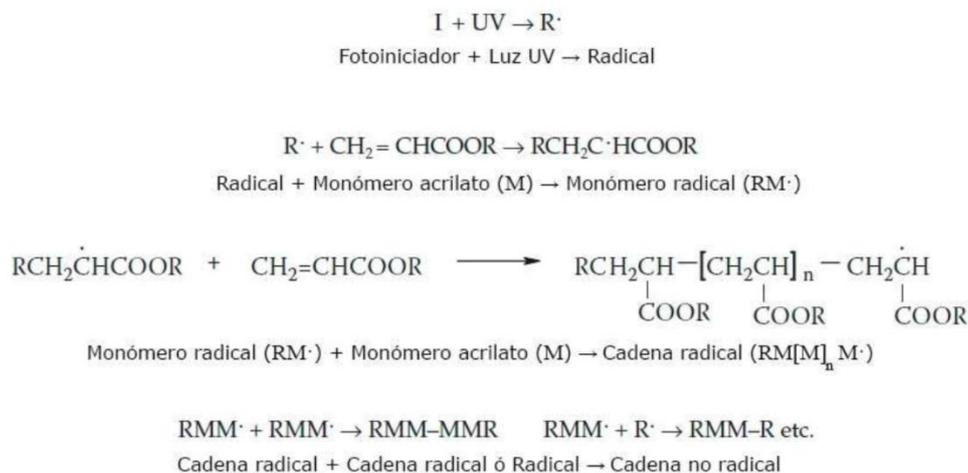


Figura 4: Esquema de la fotopolimerización radicalaria en cadena para el caso de monómeros de acrilato. Adaptado de [Green, 2010].<sup>[19]</sup>

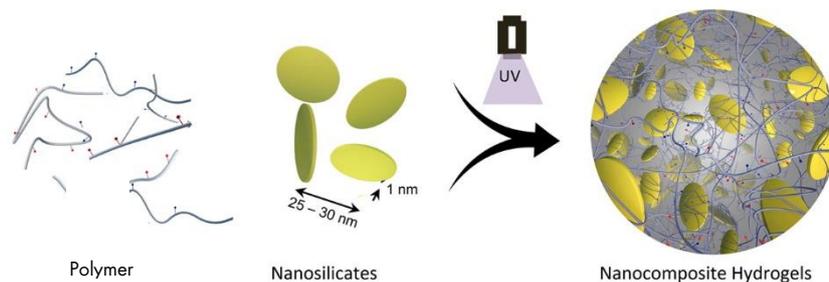


Figura 5: Esquema general que representa la formación de un hidrogel nanocompuesto en el que el polímero reactivo Tiol-Acrilato se mezcla con laponita y después se reticula. Adaptado de <sup>[12]</sup>

Así, la fotopolimerización de Tiol-Acrilato puede proceder por una combinación de la reacción de adición de Michael de Tiol-Acrilato y una polimerización radicalaria que pueden potenciar sus propiedades químicas y mecánicas.<sup>[20]</sup>

Como consecuencia, los hidrogeles formados por fotopolimerización de Tiol-Acrilato se están estudiando por su gran potencial en los ámbitos de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.<sup>[20]</sup>

Según M. Lin, para estas aplicaciones, es fundamental entender y predecir las propiedades mecánicas del hidrogel como función de las condiciones de síntesis. La mecánica de los hidrogeles formados por fotopolimerización de Tiol-Acrilato está determinada por muchos factores, como la intensidad de la luz, el peso molecular, la estequiometría, las funcionalidades de los monómeros, las propiedades químicas y la concentración de los iniciadores.

Comprender los efectos de estas variables en la cinética de la reacción y la mecánica del hidrogel se consigue, generalmente, a través de exhaustivos estudios experimentales, aunque en este momento, el campo de desarrollo se abre a la realización de modelos teóricos sobre los procesos de fotopolimerización con los que predecir estos efectos.<sup>[20]</sup>

Trabajos anteriores realizados en el grupo de investigación han permitido demostrar que es posible preparar un hidrogel nanocompuesto a partir del polímero Tiol-Acrilato y de laponita.<sup>[21]</sup>

## Objetivos

Este Trabajo Fin de Grado tiene como objetivo la preparación de hidrogeles robustos con posibles aplicaciones biomédicas, compuestos por un polímero Tiol-Acrilato con cadenas de PEG reticulado y de laponita como nanoarcilla.

El trabajo se ha llevado a cabo en dos partes, en primer lugar, preparación de hidrogeles nanocompuestos con una estructura híbrida orgánica-inorgánica, para seguidamente estudiar sus propiedades, su procesado y su comportamiento en condiciones fisiológicas relevantes.

La primera parte supone llevar a cabo un proceso de optimización para conseguir un método de preparación sencillo, escalable y reproducible. Con el proceso óptimo se han preparado hidrogeles con distintas concentraciones de laponita, que, como se discute más adelante, resulta ser uno de los factores más influyentes en las propiedades de los materiales obtenidos.

Las propiedades relevantes que se van a determinar para valorar la utilidad de los hidrogeles preparados serán sus propiedades mecánicas y capacidad de hinchamiento en función de la concentración de laponita y de la temperatura.

## 02. MATERIALES Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

### 2.1. Preparación de muestras de hidrogeles nanocompuestos

#### 1º etapa:

Esta primera etapa consiste en la síntesis del polímero Tiol:Acrilato a partir del EDDET (de peso atómico 182.3 Da) y del PEGDA (de peso atómico aproximado 700 Da, número de unidades promedio  $n=12-13$ ).

Además, se añade el catalizador trietilamina (TEA), de manera que su concentración en la formulación inicial sea de 0.8%, y el fotoiniciador, cuyo nombre comercial es IRGacure 2959, con una concentración en la formulación de 2%. Todos los compuestos químicos empleados han sido de la marca Sigma-Aldrich.

Para sintetizar el polímero, el protocolo a seguir es el siguiente: En un bote color topacio se introduce el ditiole EDDET (3.45 g, 18.9 mmol) y el diacrilato PEGDA (16.55 g, 23.6 mmol). A esta mezcla se adiciona el catalizador trietilamina (0.16 g, 1.6 mmol) y el fotoiniciador IRGacure 2959 (0.4 g, 1.8 mmol). Por último, la mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas.

La estequiometría EDDET:PEGDA se fijó en una proporción 1:1.25 ya que en trabajos previos del grupo se observó que era la composición más apropiada para alcanzar grados de polimerización relativamente altos y un gran número de grupos terminales acrilato sin reaccionar. El peso molecular reportado del T:A para la estequiometría 1:1.25 es 9600 Da.<sup>[21]</sup>

Los componentes de la mezcla se pesaron con una balanza Mettler Toledo Classic AB204-5, y fueron introducidos en un bote color topacio, para evitar la fotopolimerización indeseada por exposición a la luz ambiente. A continuación, se dejó agitando la mezcla resultante en un agitador magnético VWR VMS-C7 (sin aumentar la temperatura para evitar que el PEGDA se degrade) durante 48 horas, intervalo suficiente para que tuviera lugar la síntesis completa del polímero, al conocerse que la adición de Michael de tioles a dobles enlaces es muy eficiente.<sup>[18]</sup> Además, en las condiciones empleadas para la reacción, se ha comprobado en el pasado que la conversión es muy alta.

#### 2º etapa:

Tras las 48 horas correspondientes a la adición de Michael, se incorpora agua Milli-Q al polímero, y se deja mezclar en un sistema de rodillos Lan Technics MX-T6-S durante 24 horas, obteniendo una disolución homogénea con una concentración del 60% de T:A.

### 3ª etapa:

Consiste en la preparación de una dispersión de laponita (utilizamos laponita XLG suministrada por *BYK Additives Ltd*) en agua Milli-Q con concentración superior a la requerida en el hidrogel final. La dispersión de la laponita en agua, a la que llamaremos hidrogel de laponita, se realizó por dos métodos diferentes:

#### a) Mezclador de vórtice

Con una espátula se espolvorea gradualmente la laponita en agua. Tras cada adición (unos pocos miligramos cada vez para evitar la formación de grumos difíciles de dispersar), se agita la mezcla con ayuda de la espátula para su correcta dispersión. Conforme se incrementa la concentración de laponita en agua, se aprecia un aumento notable de la viscosidad que dificulta la obtención de una dispersión homogénea tras cada adición. A partir de un 2.5 - 3.0% en peso de laponita, la mezcla es tan viscosa que la dispersión manual es claramente insuficiente y se hace uso de un mezclador de vórtice (en este caso *VELP Scientifica Classic*) para dispersarla.

#### b) Mezcladora + vórtice

Se vierte la laponita sobre agua en agitación a ritmo constante, de tal manera que la adición (1.8 gramos de laponita en 23.2 mL de agua) se completa en un periodo de unos 40-60 segundos. Como sistema de agitación se emplea una mezcladora Variable Speed Laboratory Blender Waring. La dispersión se mantiene en agitación hasta que gelifica (este tiempo depende de la concentración, pero no supera en ningún caso los 5 minutos). A continuación, la mezcla se transfiere a un bote ámbar y se somete a 10 minutos de agitación con el mezclador de vórtice.

### 4ª etapa:

Se añade la solución de T:A a la laponita previamente dispersada en agua. Ambos materiales se someten a un periodo de agitación con el mezclador de vórtice hasta que queda una mezcla homogénea a la que llamaremos precursor, este contendrá un 10% de polímero y un porcentaje de laponita variable dentro del rango 0% - 6%.

### 5ª etapa:

Se centrifuga el precursor para eliminar las burbujas. Las muestras se sometieron a 3500 RPM durante 30 minutos en una centrifugadora Unicen 21. Este paso es imprescindible para conseguir hidrogeles sin burbujas en su matriz.

### 6ª etapa:

Consiste en el proceso de fotopolimerización o "curado", para ello, se somete el precursor a luz ultravioleta con una lámpara OmniCure Series 2000, a una intensidad de 10 mW/cm<sup>2</sup> con longitudes de onda de 320 - 390 nm durante 5 minutos, dando lugar al hidrogel. Esta última etapa sólo se realizará cuando sea necesario obtener una red reticulada de forma covalente, como en los ensayos de hinchamiento o compresión. En el caso de los ensayos de reología, se emplea el precursor obtenido en la etapa 5.

## 2.2. Ensayos de reología

Los materiales fueron preparados siguiendo el proceso experimental descrito en el apartado 2.1, excluyendo la última etapa de fotopolimerización, es decir, los ensayos de reología se realizaron con los precursores, al pretender caracterizar el estado fluido del gel, antes de la etapa de reticulación.

Para el ensayo de reología se seleccionó una geometría de medida de tipo cono-plato compuesta por un plato inferior fijo y un cono superior que rota a velocidad controlada (ver figura 6). La muestra queda confinada al espacio entre el cono y el plato y es sometida a un esfuerzo de cizalladura controlado. La medida se realiza rotando el cono superior, el cual impulsa el gel precursor situado en la ranura o espacio entre el cono superior y el plato inferior. Se asume que el flujo es homogéneo y la velocidad de cizalla constante en cualquier punto de la muestra.

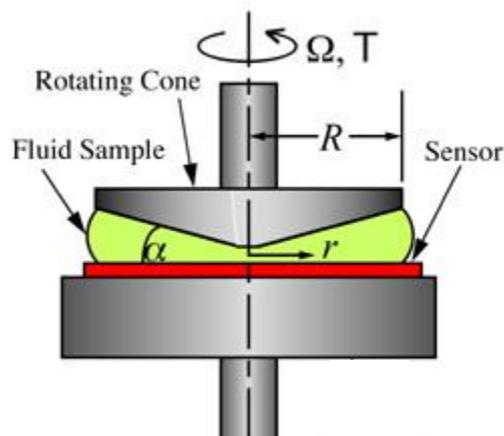


Figura 6: Geometría cono-plato del reómetro.<sup>[22]</sup>

La caracterización procedió con un reómetro HAAKE RheoStress 1 (Cono superior de 35 mm de diámetro y 1 grado de inclinación, código C35/1) (ver Figura 7). Además, el ensayo se efectuó a una temperatura de 25 °C para minimizar la evaporación del agua de la muestra.

Así, la muestra se sometió a un esfuerzo cortante constante (velocidad de cizalladura de 100 s<sup>-1</sup>) para homogeneizar la muestra. Seguidamente, se mantuvo la muestra sin cizallar, de manera estática, para que se recuperase la estructura del gel durante 5 min. Una vez normalizada, la medida consistió en aumentar la velocidad de cizalladura a un ritmo constante para luego reducirla al mismo ritmo.



Figura 7: Plato (abajo) y cono (arriba) de reómetro HAAKE RheoStress 1 empleado en los ensayos de reología.

### 2.3. Ensayos de hinchamiento

Los hidrogeles son polímeros entrecruzados que no se disuelven en agua, sin embargo, pueden absorberla e hincharse, aunque este hinchamiento puede ser reversible cuando los débiles enlaces formados con el agua se liberan al evaporarse la misma.<sup>[23]</sup> En este trabajo, estudiamos el hinchamiento de los hidrogeles sumergidos en una solución tampón de fosfato (PBS, pH=7.4) para simular condiciones fisiológicas, así como su variación en función de la temperatura.

Los hidrogeles fueron preparados siguiendo el proceso experimental descrito en el apartado 2.1, incluyendo la última etapa de fotopolimerización. Los precursores se dejaron reposar al menos 24 horas antes de ser curados, al haberse observado que la laponita requiere de un cierto tiempo para la ordenación y construcción completa de la red iónica, pudiéndose observar un gel más consistente al haber transcurrido este intervalo de tiempo.

Para proceder con la etapa de fotopolimerización o curado, los precursores se introdujeron en moldes cilíndricos de aproximadamente 4 mm de altura y 6 mm de diámetro fabricados con cintas kapton de manera manual (ver figura 8. Izquierda). La configuración de estos moldes combinaba tensión en dos direcciones opuestas, evitando esfuerzos sobre el precursor y, por tanto, permitiendo que tras ser curados se desmoldaran fácilmente. Los moldes de kapton se introdujeron a su vez en otro molde de polidimetilsiloxano (PDMS) que les proporcionaba mayor estabilidad. Una vez preparados, se colocó una lámina de vidrio sobre los mismos para ejercer una ligera presión sobre el material, disminuyendo la aparición de burbujas y mejorando el acabado de los discos de hidrogel. Por último, siguiendo las pautas de la 6ª etapa experimental, los hidrogeles fueron irradiados con luz ultravioleta, dando lugar a la fotopolimerización del material.

Una vez curados, los discos de hidrogel fueron desmoldados con cuidado, eliminando en la medida de lo posible sus rebabas (ver figura 8. Centro). Estas rebabas son problemáticas ya que, si no son eliminadas, se desprenden posteriormente durante el estudio de hinchamiento, llevándonos a subestimar el incremento de masa de los hidrogeles.

El procedimiento a seguir para medir el hinchamiento fue el habitual de la literatura.<sup>[24]</sup> Se realizó una primera medida del peso de los hidrogeles justo después de su reticulación y a continuación, fueron introducidos en botes individuales en los que fueron sumergidos por completo en PBS. Transcurridas una serie de horas, los hidrogeles se secaron cuidadosamente en su parte exterior con papel Kimtech y se pesaron de nuevo. Tras ser pesados, fueron devueltos a su recipiente correspondiente con PBS. El proceso fue repetido hasta que el incremento de masa alcanzó la saturación.

Como ya hemos comentado en la introducción, el objetivo de este trabajo es orientar la creación de los hidrogeles a las aplicaciones biomédicas, por tanto, los ensayos de hinchamiento, se realizarán en condiciones fisiológicas, a 37 °C y sumergidos en PBS, al cual se añadió un antibiótico (Pen/Strep 1%) y un fungicida (FZ 0.1%) para evitar la aparición de hongos y bacterias a lo largo de los días de duración del ensayo (ver figura 8. Derecha).

Por otro lado, para realizar el ensayo a la temperatura requerida utilizamos una estufa calefactora Shel Lab IR2424 CO<sub>2</sub> Incubator programada a 37 °C. En caso de necesitar otras temperaturas, se empleó una placa calefactora (Stuart digital hotplate SD160).



Figura 8: Izquierda: Moldes de kapton. Centro: Cilindros de hidrogel una vez curados. Derecha: Botes que contienen los cilindros de hidrogel sumergidos en PBS.

## 2.4. Ensayos de compresión

Las medidas de compresión se realizaron en un INSTRON 5548 MicroTester (programa Bluehill) con una célula de carga de 5 N (ver figura 9. Izquierda). El plato de compresión se escogió de aluminio por ser un buen conductor térmico (ver figura 9. Derecha). El ensayo se realizó manteniendo las condiciones previas de los hidrogeles, a 37 °C y sumergidos en PBS.

De este modo, cada muestra fue colocada individualmente en la plataforma del dispositivo, que disponía de condiciones fisiológicas. En ella, su diámetro y altura fueron medidos manualmente para, a continuación, ser sometida a la medida de compresión.

El procedimiento consistió en un primer proceso de normalización con el objetivo de homogeneizar las muestras en la medida de lo posible. En este, se comprimía el hidrogel a 0.6 mm/min hasta alcanzar un 3% de deformación, seguido de 3 minutos de reposo. Posteriormente, en una segunda etapa, el hidrogel se deformaba a 1 mm/min hasta alcanzar la rotura.



Figura 9: Izquierda: Utillaje de compresión. Derecha: Plato de compresión presionando el hidrogel sumergido en PBS a 37 °C.

## 03. RESULTADOS

### 3.1. Discusión del método de dispersión de laponita

La laponita XLG es una arcilla tipo esmectita sintética que se usa habitualmente como regulador de las propiedades reológicas en muchas aplicaciones comerciales como, por ejemplo, productos de la higiene personal, pinturas o esmaltes. En ensayos preliminares en el laboratorio se observó que la dispersión de laponita en agua por encima del 3% en peso resulta en mezclas de una alta viscosidad. Este hecho dificulta la preparación de formulaciones con un porcentaje en peso de laponita mayor del 3% y que se precisan para este trabajo. Así, se decidió explorar dos métodos para facilitar la dispersión de laponita en agua.

La dispersión de laponita en agua, presenta diferentes dificultades dependiendo del método utilizado:

En el caso del mezclador de vórtice, o vórtex, la dispersión final apenas contiene burbujas, es homogénea y carece de turbiedad. Sin embargo, el proceso es largo, al consistir en sucesivas adiciones con espátula, seguidas del tiempo de agitación necesario para quedar la mezcla homogénea. De este modo, se requieren en torno a 3 horas para elaborar una muestra de 15 g de las concentraciones superiores de laponita (~7%).

Por otro lado, empleando la mezcladora, la dispersión final contiene una cantidad importante de burbujas y es más turbia que en el primer caso, esto indicaría una peor dispersión de la laponita. Este hecho se puede corregir sometiendo el material a la agitación final con el mezclador de vórtice, lo que proporciona una mezcla que dispersa la luz en menor medida. Conforme la muestra se agita, el volumen y su transparencia aumentan hasta apreciarse similares a las muestras del otro método, indicando una mejor dispersión. El material final tiene consistencia de gel, consecuencia de la formación de la red tridimensional de nanoarcilla o "castillo de naipes" mencionado en la introducción. De este modo, se requieren menos de 20 minutos para elaborar una muestra de 25 g de las concentraciones superiores de laponita (~7%).

Las diferencias mencionadas se incrementan conforme aumenta la concentración deseada de laponita en la disolución final. Esto se debe a que, al llegar a una concentración de (~3.7%) de laponita en agua, se alcanza el punto crítico de gelificación a partir del cual la viscosidad del hidrogel de laponita aumenta drásticamente.

Como hemos podido comprobar, la dispersión de laponita no es un proceso fácil. Es conocido dentro del campo de investigación que la laponita XLG forma geles físicos muy consistentes en medio acuoso.<sup>[25]</sup>

La dificultad mencionada, se ve solventada gracias a la centrifugación de las muestras (5ª etapa del apartado 2.1). Esta nos permite efectuar la dispersión de laponita mediante un método sencillo y cómodo (mezcladora + vórtex), evitando uno de los mayores problemas del precursor que es la existencia de burbujas en su matriz. En la medida en que los hidrogeles contienen burbujas, se introduce un error en las propiedades mecánicas evaluadas en los diferentes ensayos.

Para valorar la calidad de la dispersión de laponita en las formulaciones del precursor (laponita + polímero Tiol:Acrilato), se decidió realizar un ensayo de reología con los precursores comparando los materiales obtenidos por ambos métodos.

Ya que las diferencias entre un método y otro se incrementan conforme aumenta la concentración de laponita, para estos ensayos se partió de precursores con una concentración del 6% de laponita, siendo esta la más elevada de las propuestas para este trabajo y, por tanto, la más problemática.

### 3.1.1. Curvas de viscosidad

El ensayo de reología tuvo como objetivo determinar y comparar la viscosidad en función de la velocidad de cizalladura de las formulaciones obtenidas del método vórtex con las del método mezcladora + vórtex.

Llamamos curva de viscosidad a la representación de la viscosidad frente a la velocidad de cizalla. La tixotropía característica de nuestros precursores dará lugar a curvas de viscosidad con pendiente negativa, ya que, conforme aumenta la velocidad de cizalla a la que están sometidos los mismos, disminuye su viscosidad. Esto no es así en el caso de los fluidos Newtonianos, donde la viscosidad es independiente de la velocidad de cizalla.

Siguiendo las pautas de la sección 2.3, las muestras fueron sometidas a un periodo de homogeneización para eliminar efectos asociados al confinamiento de la muestra en la geometría de medida. A continuación, el reómetro fue programado para cizallar las muestras a una velocidad de cizalla variable en el rango  $1 - 1000 \text{ s}^{-1}$ , obteniendo medidas sobre su viscosidad para cada velocidad.

En la figura 10, podemos ver representadas las curvas de viscosidad para las mezclas precursoras correspondientes a cada uno de los dos métodos de dispersión discutidos en el apartado anterior (sección 3.1).

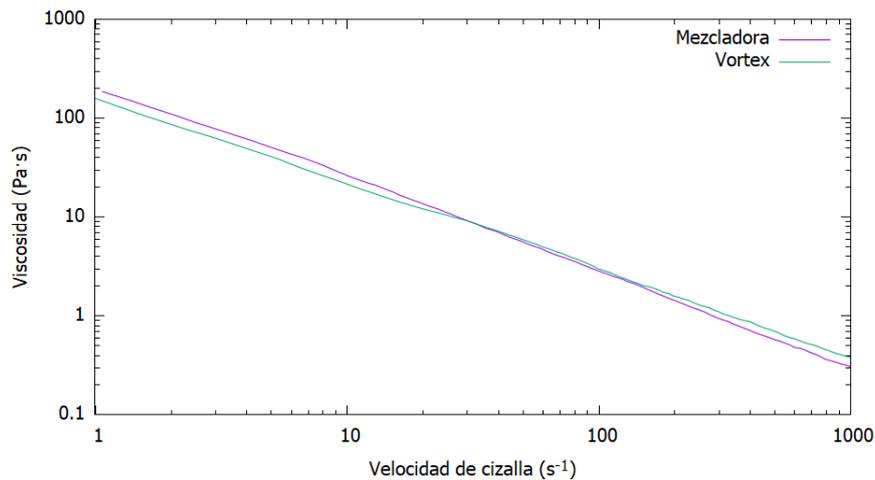


Figura 10: Curvas de flujo para precursores con un 6% de laponita.

En la figura vemos representada la evolución de la viscosidad de los dos materiales al reducir la velocidad de cizalla y podemos comprobar que ambas curvas son relativamente parecidas.

Efectivamente, el precursor es un fluido tixotrópico, al ser ambas pendientes negativas. Esto está asociado con el “desmoronamiento” de la estructura de “castillo de naipes” a velocidades de cizalla altas y la consecuente disminución de la viscosidad. Conforme la velocidad de cizalla disminuye, la estructura se recupera gradualmente y la viscosidad aumenta.

Dados los resultados, podemos concluir que ambos métodos de dispersión de laponita dan lugar a precursores de características similares. En vista a lo anterior, y ya que el método que combina pre-dispersión en mezcladora seguido de agitación en vórtex es, desde un punto de vista operacional, más sencillo, se optó por adoptar este protocolo como método de preparación de muestras general para este trabajo.

### 3.2. Ensayos de hinchamiento

En primer lugar, se realizó un ensayo de hinchamiento en PBS a 37 °C pesando a las 2, 4, 6, 24 y 96 horas. En este estudio se pretendía conocer el comportamiento de los hidrogeles al ser sumergidos en PBS, así como su dependencia con la concentración de laponita. Para ello, se realizó el ensayo con hidrogeles de 4 formulaciones distintas: Con un 0%, 2%, 4% y 6% de laponita. De este modo, se prepararon 4 discos de hidrogel de cada formulación (N=4), siguiendo las pautas indicadas en las técnicas experimentales (sección 2.1).

En la figura 11, podemos ver la masa normalizada frente al tiempo, donde las barras de error corresponden a la desviación estándar entre las distintas muestras.

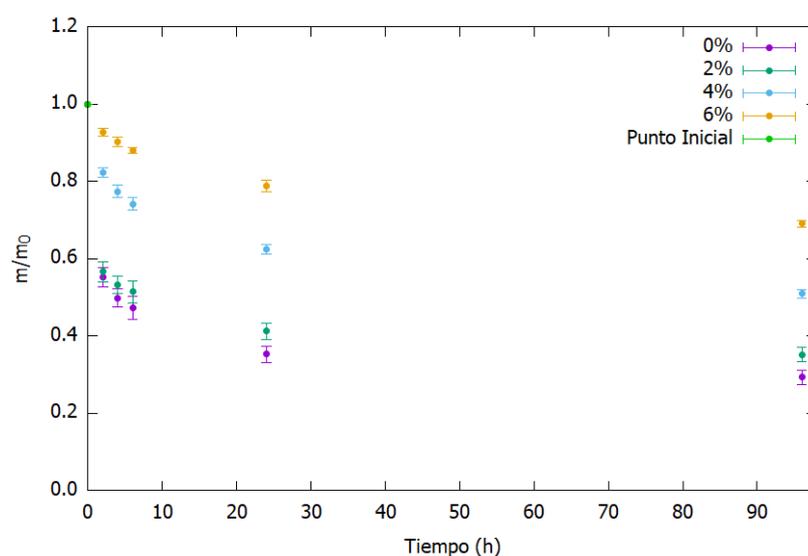


Figura 11: Ensayo de hinchamiento para formulaciones del 0%, 2%, 4% y 6% de laponita en PBS a 37 °C.

Podemos observar cómo los hidrogeles se deshinchaban con el tiempo, siendo más pronunciada la deshidratación para aquellos con un menor porcentaje de laponita. Las diferencias de hinchamiento en hidrogeles pueden ser debidas, por un lado, a la diferente presión osmótica del sistema red tridimensional/PBS y, por otro lado, a la distinta elasticidad de la red tridimensional. Mientras que, en la red de polímero, las cadenas se estiran tensionando esta red, en el hidrogel de laponita, se requiere la reorganización de los discos para deformarse, pudiendo dar lugar a una capacidad de hinchamiento diferente.

En el marco de este trabajo, se realizaron pruebas del hinchamiento de los hidrogeles en agua y, al contrario que en PBS, se hinchaban hasta llegar a triplicar su masa. Por otro lado, en otros estudios del grupo, se ha observado que los hidrogeles de Tiol:Acrilato, con base de PBS y con 0% de laponita, se hinchan al ser sumergidos en este mismo fluido, replicando el comportamiento de los de base acuosa al ser sumergidos en agua.

Además, podemos ver que la curva de hinchamiento adopta una tendencia de saturación pasadas las 24 h, siendo despreciable el incremento de masa entre las 24 h y las 96 h. De este modo, podemos confirmar la estabilidad del sistema entre las 24 h y las 96 h, siendo de gran importancia al proporcionarnos flexibilidad en la toma de medidas y en el espectro de aplicaciones. Esto concuerda con otros artículos donde se afirma que la laponita aporta una excelente estabilidad a los hidrogeles.<sup>[25] [26]</sup>

En segundo lugar, con el objetivo de caracterizar el efecto de la temperatura en la cinética de hinchamiento, se realizó un ensayo de hinchamiento a diferentes temperaturas para una composición determinada. Este experimento se llevó a cabo con la formulación del 6% de laponita en PBS a 21 °C, 37 °C y 60 °C con una estadística de N=4, siguiendo las mismas pautas de medida anteriores.

En la figura 12, podemos ver la masa normalizada frente al tiempo, donde las barras de error corresponden de nuevo a la desviación estándar entre las distintas muestras.

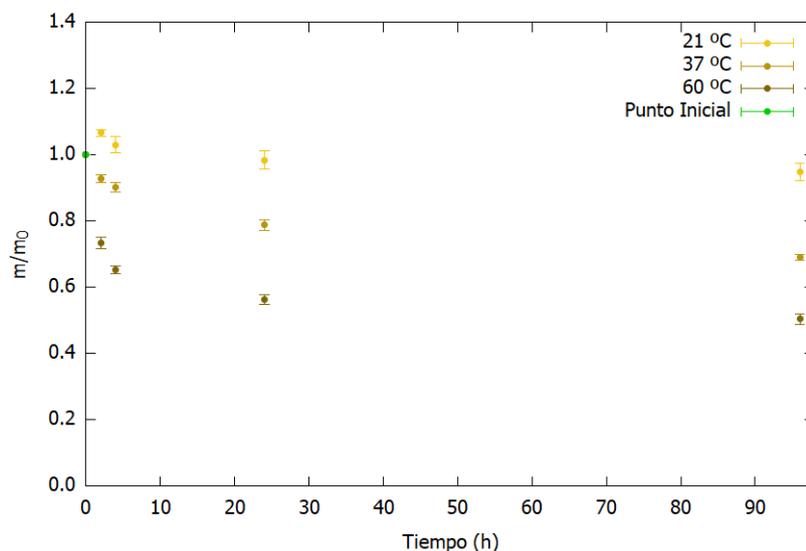


Figura 12: Ensayo de hinchamiento para la formulación del 6% de laponita en PBS a 21 °C, 37 °C y 60 °C.

Podemos observar que a 21 °C, los hidrogeles se hinchan ligeramente en las primeras horas para, a continuación, deshincharse volviendo prácticamente a su masa inicial. De este modo, la masa normalizada es prácticamente la unidad a las 24 y 96 horas, podemos decir que el hidrogel posee gran estabilidad a esta temperatura.

A su vez, comprobamos que a 60 °C los hidrogeles se deshinchán más que a 37 °C, mostrando que la temperatura tiene un efecto inverso en la capacidad de hinchamiento en equilibrio, comportamiento que concuerda con las tendencias observadas en otros artículos.<sup>[27] [29] [30]</sup> Esta evidencia muestra que el proceso es sensible a la temperatura, característica que puede ser de utilidad en algunas aplicaciones biomédicas. Como ejemplo, algunos hidrogeles pueden ser empleados como soportes de cultivo celular donde las células proliferan a 37 °C y son desprendidas de manera espontánea a 25 °C.<sup>[27]</sup>

### 3.3. Ensayos de compresión

Los ensayos de compresión consistieron en dos tipos de medidas, por un lado, la determinación del módulo de Young  $\gamma$ , por otro, la realización de ensayos de fatiga. Ambos tipos se efectuaron en condiciones fisiológicas (en PBS a 37 °C), siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.4.

#### 3.3.1. Módulo de Young

Como pudimos ver en los ensayos de hinchamiento, los hidrogeles pueden considerarse estables entre las 24 y 96 horas. De este modo, se realizaron los ensayos de compresión, que nos permitirían determinar el módulo de Young de los hidrogeles para las diferentes formulaciones, a las 24 h de haber sido curados y sumergidos en PBS.

Estos ensayos de compresión, tenían como objetivo determinar el módulo de Young de los hidrogeles en condiciones fisiológicas, así como el llamado esfuerzo a mitad, que consiste en el esfuerzo sometido a la muestra para que alcance un 50% de deformación.<sup>[30]</sup>

El módulo de Young se define como el cociente entre el esfuerzo y la deformación que aparece en el material al ser comprimido.

$$Y = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{F/S}{\Delta l/l_0}$$

Con el objetivo de determinar la dependencia del módulo de Young con la concentración de laponita, se realizó el ensayo con hidrogeles de 4 formulaciones distintas: Con un 0%, 2%, 4% y 6% de laponita. De este modo, se prepararon 5 discos de hidrogel de cada formulación (N=5), siguiendo las pautas indicadas en las técnicas experimentales (sección 2.1).

Si representamos el esfuerzo al que era sometido el disco de hidrogel frente a la deformación que sufría el mismo, podemos ver una zona lineal entre el 5% y 15% de deformación, cuya pendiente será el módulo de Young de la muestra (ver figura 13).

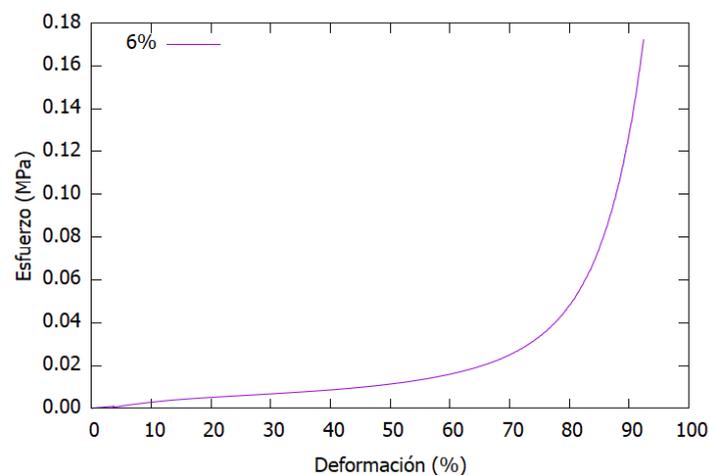


Figura 13: Ejemplo de curva de esfuerzo – deformación para un hidrogel con 6% de laponita.

De este modo, se obtuvo una curva similar con su correspondiente módulo de Young para cada una de las muestras. En la figura 14, se encuentran representados el módulo de Young y el esfuerzo a mitad para las diferentes formulaciones. Las barras de error corresponden a la desviación estándar para N=5. También se calculó el error correspondiente al ajuste lineal, pero este era despreciable en comparación con el de la desviación estándar, lo cual es lógico ya que la pendiente se ajusta de manera muy adecuada a una recta y, sin embargo, cada una de nuestras muestras, al haber sido fabricadas de manera manual, presentan inevitables inhomogeneidades.

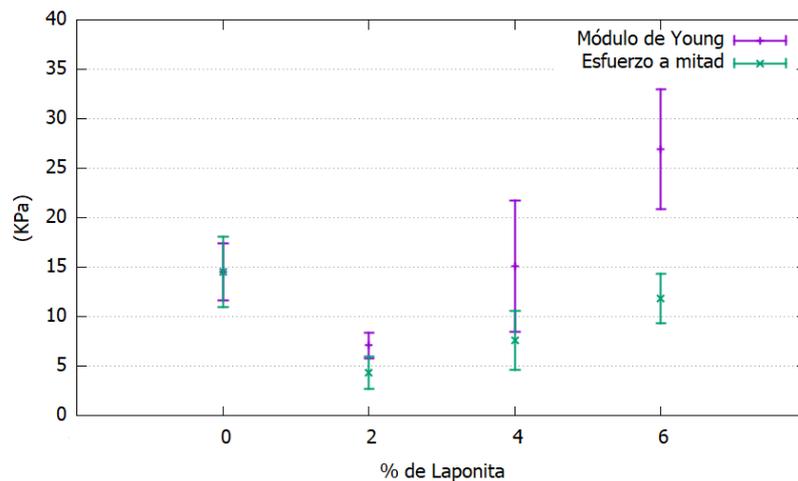


Figura 14: Módulo de Young y esfuerzo a mitad para formulaciones con 0%, 2%, 4% y 6% de laponita.

Vemos que dentro de los hidrogeles con laponita, tanto el módulo de Young como el esfuerzo a mitad aumentan con la concentración de laponita.

Cabría proponer que la razón de que la formulación con 0% de laponita tenga un módulo de Young dos veces mayor que los hidrogeles con 2%, es el drástico deshinchamiento que estos sufren, como hemos podido ver en los resultados de los ensayos de hinchamiento.

Además, para dar mayor consistencia a la supuesta estabilidad de los hidrogeles, a las 96 h, se realizaron ensayos para determinar el módulo de Young de una muestra de cada formulación y estos resultaron dentro de la incertidumbre correspondiente a aquellos medidos a las 24 h (ver figura 12). Confirmando que las propiedades mecánicas de los hidrogeles no cambian significativamente entre las 24 y 96 horas.

Los módulos de Young obtenidos se encuentran dentro del rango correspondiente a los tejidos blandos (e.g. cerebral o cardíaco).

### 3.3.3. Ensayos de fatiga

Los ensayos de fatiga se efectuaron a las 96 h, de acuerdo con la disponibilidad de las instalaciones, ya que requerían de un tiempo de medida aproximado de una hora por muestra.

El objetivo de estos ensayos era conocer la respuesta de los hidrogeles ante esfuerzos mecánicos periódicos. Así, cada muestra se sometió a 12 ciclos de compresión, de manera que en los 4 primeros se llegó hasta el 20% de deformación, en los 4 siguientes hasta el 40% y en los 4 últimos hasta el 60%. Este proceso se realizó para un disco de hidrogel de cada formulación: 0%, 2%, 4% y 6% de laaponita (ver figura 15).

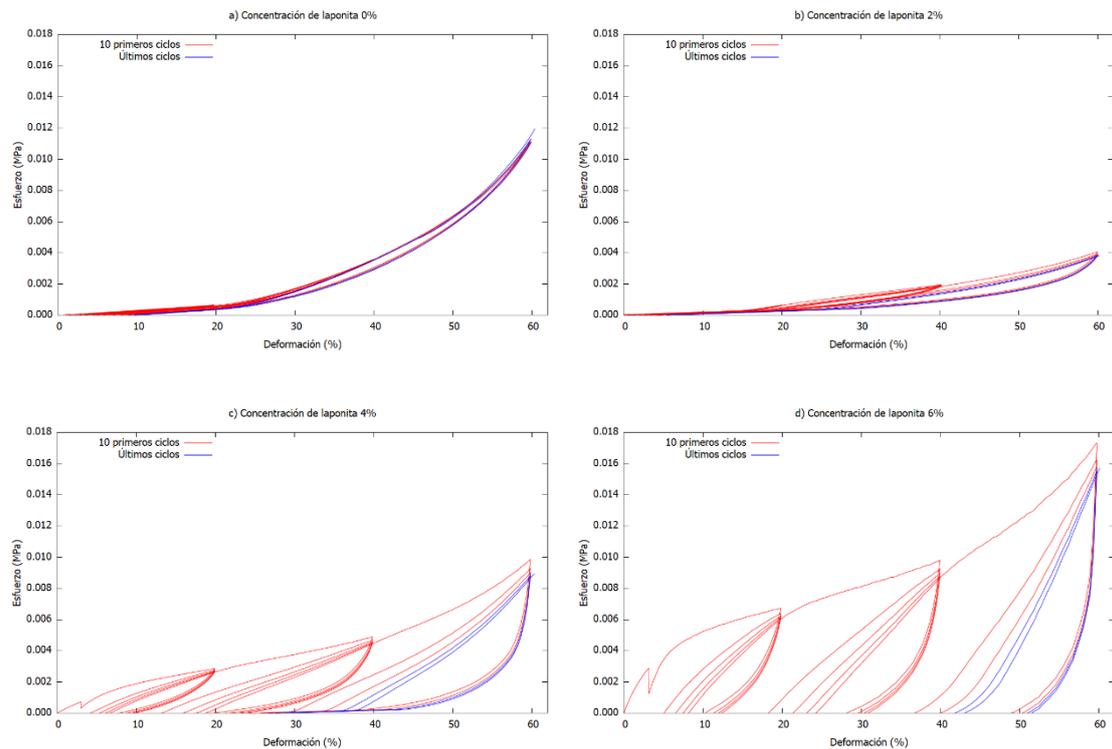


Figura 15: Curvas de esfuerzo – deformación en ensayo de fatiga con 20%, 40% y 60% de deformación para formulaciones con concentraciones de laaponita de a) 0%, b) 2%, c) 4% y d) 6%.

Vemos que para la formulación con 0% de laaponita encontramos una ausencia de deformación plástica. La curva vuelve esencialmente al origen, lo que indica que el material no se fatiga recuperando totalmente sus propiedades mecánicas. Como es bien sabido, los hidrogeles poliméricos T:A son materiales elásticos.

En cambio, cuando se añade laaponita, aparece deformación plástica, la curva de descarga no llega al mismo punto (figura 15.d.: En la formulación de 6% laaponita, el último ciclo comienza cercano al 40% de deformación y sólo se recupera hasta el 50%). Este hecho se debe a la red física que forman las nanoarcillas, esta se desmorona al sufrir la deformación y al cesar el esfuerzo se rehace en la configuración deformada oponiéndose a la recuperación elástica de la red polimérica, a este fenómeno le llamamos histéresis del material.

De este modo, podemos observar grandes diferencias en cuanto a la histéresis de cada formulación, comprobando efectivamente, que la laponita aporta viscoelasticidad a los hidrogeles.

Para cada una de las secuencias de 4 ciclos, vemos que la primera curva de carga encierra significativamente más área que las 3 últimas, es decir, el material disipa más energía cada vez que alcanza por primera vez un cierto grado de deformación (llegar a 20%, 40% o 60%). Este hecho podría indicar que el material no contó con el suficiente tiempo de reposo entre ciclo y ciclo.

Por otro lado, el área encerrada bajo la curva en un ciclo de deformación nos proporciona el valor de la densidad de energía disipada por el material en dicho ciclo. La manera de determinar cómo varía la disipación de energía con las diferentes formulaciones consiste en comparar un mismo ciclo correspondiente a cada uno de los 4 materiales. Ya que, en todos los casos, el material parece comportarse de manera similar en el penúltimo y último ciclo de cada deformación, se ha decidido calcular el promedio del área encerrada en el penúltimo y último ciclo que alcanzan la deformación de 60% para cada formulación (ciclos representados en azul en la figura 15).

En figura 16, podemos observar para las diferentes formulaciones, la densidad de energía disipada promedio entre el penúltimo y último ciclo de la deformación hasta 60%, donde el error corresponde a la desviación estándar entre ambos ciclos.

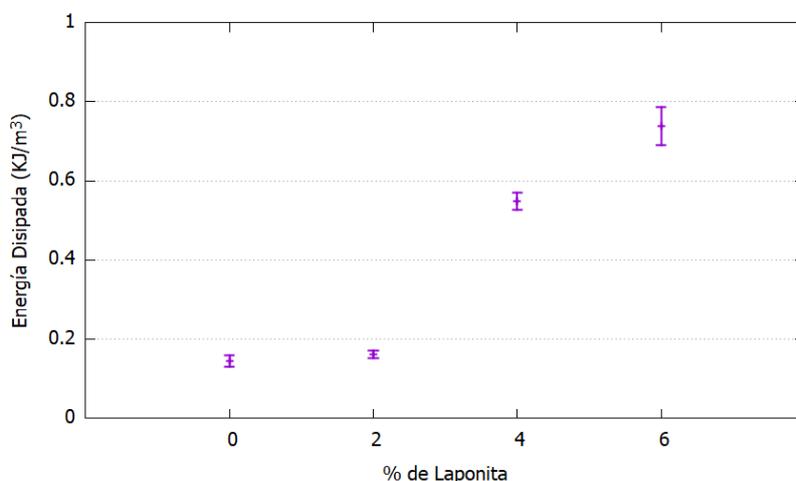


Figura 16: Energía disipada para formulaciones con concentraciones de laponita de 0%, 2%, 4% y 6%.

Podemos ver cómo la energía disipada por el hidrogel se incrementa conforme aumenta la concentración de laponita, siendo algo más de 4 veces mayor la energía disipada por el material de 6% que la del 0%. A su vez, vemos que la energía disipada por el material del 2% es muy similar a la del 0%, mientras que la del 4% está más cercana al 6%. Este hecho podría indicar un dominio de la red iónica para las concentraciones superiores (4%, 6%) respecto a la red covalente del polímero que proporciona la elasticidad al material.

## 04. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo ha sido la preparación de hidrogeles nanocompuestos basados en el polímero Tiol – Acrilato, empleando nanosilicatos (partículas de laponita) como parte inorgánica. Estos hidrogeles fueron estudiados en condiciones fisiológicas (en PBS y a 37 °C) con el objetivo de evaluar su comportamiento en condiciones relevantes para posibles aplicaciones en el área de los biomateriales.

A través de las curvas de flujo obtenidas en un ensayo de reología, se comprobó que no es necesario emplear un mezclador de vórtice para dispersar la laponita en agua, sino que esta labor se puede realizar con una mezcladora (especificada en la sección 2.1), de manera sencilla. Si bien es necesario el tratamiento final con el mezclador de vórtice durante unos minutos para que el hidrogel alcance su máxima consistencia.

El ensayo de hinchamiento con diferentes formulaciones mostró que los hidrogeles se deshinchan con el tiempo, siendo más pronunciada la deshidratación para aquellos con un menor porcentaje de laponita. La saturación del hinchamiento se alcanzó a las 24 h y se comprobó que el sistema era estable hasta al menos las 96 h. El ensayo de hinchamiento a diferentes temperaturas mostró que conforme aumenta la temperatura, disminuye el grado de hinchamiento de los hidrogeles.

Se determinó el módulo de Young y se sometió a los hidrogeles a ensayos de fatiga bajo condiciones fisiológicas y habiendo alcanzado la saturación de hinchamiento:

El módulo de Young para las diferentes formulaciones mostró estar en cierto grado relacionado con el hinchamiento del material. Por un lado, el módulo de las formulaciones con laponita aumentaba conforme se incrementaba la concentración de la nanoarcilla. Por el contrario, la formulación con 0% de laponita, al ser la que mayor deshinchamiento sufría, mostró poseer un módulo anormalmente alto debido a esta deshidratación, siendo este comparable a la formulación con un 4% de laponita. Los módulos de Young obtenidos se encuentran dentro del rango deseado para aplicaciones de materiales blandos en biomedicina e ingeniería de tejidos. A su vez, queda abierto un campo de desarrollo, al requerirse módulos más elevados para otros tejidos como son la piel o el cartílago.

Por último, en los ensayos de fatiga, se pudo observar que, conforme se incrementa la concentración de laponita, aumenta la energía disipada por el hidrogel al ser sometido a deformaciones cíclicas, siendo 4 veces mayor la energía disipada por el material de 6% que la de 0%.

## 05. BIBLIOGRAFÍA

1. Y. Chen, S. Kang, J. Yu, Y. Wang, J. Zhu, Z. Hu. Tough robust dual responsive nanocomposite hydrogel as controlled drug delivery carrier of aspirin. *J. Mech. Behav. Biomed.* 92 (2019) 179-187. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2019.01.017
2. E. M. Ahmed. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* 6 (2015) 105-121. DOI:10.1016/j.jare.2013.07.006
3. M. Parlato et al. Poly(ethylene glycol) hydrogels with adaptable mechanical and degradation properties for use in biomedical applications. *Macromolecular Bioscience* 14 (2014) 687-698. DOI: 10.1002/mabi.201300418
4. M. Shibayama. Structure-mechanical property relationship of tough hydrogels. *Soft Matter* 8 (2012) 8030-8038. DOI: 10.1039/C2SM25325A
5. Y. Liu, W. He, Z. Zhang, B. P. Lee. Recent Developments in Tough Hydrogels for Biomedical Applications. *Gels* 4 (2018) 46. DOI: 10.3390/gels4020046
6. S.S. Das, Neelam, K. Hussain, S. Singh, A. Hussain, A. Faruk, M. Tebyetekerwa. Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Current Pharmaceutical Design* 25 (2019) 424. DOI: 10.2174/1381612825666190402165845
7. A. K. Gaharwar, R. K. Avery, A. Assmann, A. Paul, G. H. McKinley, A. Khademhosseini, B. D. Olsen. Shear-Thinning Nanocomposite Hydrogels for the Treatment of Hemorrhage. *ACS Nano* 8 (2014) 9833-9842. DOI: 10.1021/nn503719n
8. X. Huang, H. Shen, J. Sun, K. Lv, J. Liu, X. Dong, S. Luo. Nanoscale Laponite as a Potential Shale Inhibitor in Water-Based Drilling Fluid for Stabilization of Wellbore Stability and Mechanism Study. *ACS Applied Materials & Interfaces* 10 (2018) 33252-33259. DOI: 10.1021/acsami.8b11419
9. A. Sheikhi, S. Afewerki, R. Oklu, A. K. Gaharwar, A. Khademhosseini. Effect of ionic strength on shear-thinning nanoclay-polymer composite hydrogels. *Biomater. Sci.* 6 (2018) 2073-2083. DOI: 10.1039/C8BM00469B
10. J. Du, X. She, W. Zhu, H. Zhang, T. Deng, X. Li, J. Liu, M. Li. Tough hybrid hydrogels based on simultaneous dual in situ sol-gel technique and radical polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* 136 (2019) 47742. DOI: 10.1002/app.47742
11. C.J.Wu, A. K. Gaharwar, B. K. Chan, G. Schmidt. Mechanically Tough Pluronic F127/Laponite Nanocomposite Hydrogels from Covalently and Physically Cross-Linked Networks. *Macromolecules* 44 (2011) 8215-8224. DOI: 10.1021/ma200562k

12. J. R. Xavier, T. Thakur, P. Desai, M. K. Jaiswal, N. Sears, E. Cosgriff-Hernandez, R. Kaunas, A. K. Gaharwar. Bioactive Nanoengineered Hydrogels for Bone Tissue Engineering: A Growth-Factor-Free Approach. *ACS Nano* 9 (2015) 3109-3118. DOI: 10.1021/nn507488s
13. X-Y. Wen, Z. Liu, J. Wang, X-Y. Tang, W. Wang, X.J. Ju, R. Xie, L-Y. Chu. Nanocomposite hydrogels with optic-sonic transparency and hydroacoustic-sensitive conductivity for potential anti-scouting sonar. *Applied Materials & Interfaces* 11 (2019) 20386-20393. DOI: 10.1021/acsami.9b04463
14. A.A.H. Abdellatif, D.F.A. El-Telbany, G. Zayed et al. Hydrogel Containing PEG-Coated Fluconazole Nanoparticles with Enhanced Solubility and Antifungal Activity. *J Pharm Innov* 14 (2019) 112-122. DOI: 10.1007/s12247-018-9335-z
15. A. Golshan, J. A. Curtis, V. Lianos, S. Y. Rabbany. R. C. de Guzman. Compressive strengths of PEG gels with glycerol and bioglass particles. *Journal of Materials Research* 34 (2019). DOI: 10.1557/jmr.2019.45
16. C. W. Peak, J. Stein, K. A. Gold, A. K. Gaharwar. Nanoengineered Colloidal Inks for 3D Bioprinting. *Langmuir* 34 (2018) 917-925. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b02540
17. S. Posritong et al. A Pyk2 inhibitor incorporated into a PEGDA-gelatin hydrogel promotes osteoblast activity and mineral deposition. *Biomed. Mater* 14 (2019) 025015. DOI: 10.1088/1748-605X/aafffa
18. D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman. The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* 26 (2014) 724–744. DOI: 10.1021/cm402180t
19. [Green,2010] W. Arthur Green (2010). *Industrial Photoinitiators: A Technical Guide*. CRC Press: Taylor & Francis Group, ISBN: 978-1-4398-2745-1.
20. H. Zhu, X. Yang, G. Genin, T. Lu, F. Xu, M. Lin. The relationship between thiol-acrylate photopolymerization kinetics and hydrogel mechanics: An improved model incorporating photobleaching and thiol-Michael addition. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 88 (2018) 160-169. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2018.08.013
21. Cendoya. TFG Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias: Hidrogeles híbridos orgánico-inorgánicos para aplicaciones biomédicas.
22. <http://soft-matter.seas.harvard.edu/index.php/Rheometry>
23. O. Olatunji, A. Denloye. Production of Hydrogel Microneedles from Fish Scale Biopolymer. *J Polym Environ* 27 (2019) 1252. DOI: 10.1007/s10924-019-01426-x

24. T. Begam, A. K. Nagpal, R. Singhal. A comparative study of swelling properties of hydrogels based on poly(acrylamide-co-methyl methacrylate) containing physical and chemical crosslinks. *Journal of Applied Polymer Science* 89 (2003) 779-786. DOI: 10.1002/app.12270
25. LAPONITE Performance Additives. Technical Information B-RI 21. BYK Additives & Instruments. (Folleto commercial)
26. L. Han, Y. He, R. An, X. Wang, Y. Zhang, L. Shi, R. Ran. Mussel-inspired, robust and self-healing nanocomposite hydrogels: Effective reusable absorbents for removal both anionic and cationic dyes. *Colloids and Surfaces A* 569 (2019) 18-27. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2019.02.054
27. N. Becerra, L. M. Restrepo, B. L. López. Synthesis and Characterization of a Biocompatible Copolymer to be Used as Cell Culture Support. *Macromol. Symp.* 258 (2007) 30-37. DOI: 10.1002/masy.200751204
28. D. Saloglu, N. Kanmaz, J. Hizal Yücesoy. Humic acid embedded chitosan/poly (vinyl alcohol) pH-sensitive hydrogel: Synthesis, characterization, swelling kinetic and diffusion coefficient. *Chemical Engineering Communications* 206 (2019) 1168-1180. DOI: 10.1080/00986445.2018.1550396
29. M-R. Norouzi, L. Ghasemi-Mobarakeh, H. Gharibi, R. Meamar, F. Ajalloueiian, L. S. Chronakis. Surface modification of poly (ethylene terephthalate) fabric by soy protein isolate hydrogel for wound dressing application. *Int. J. Polym. Mater. Po.* 68 (2019) 714-722. DOI: 10.1080/00914037.2018.1493684
30. F. Sharifi, B. B. Patel, M. C. McNamara, P. J. Meis, M. N. Roghair, M. Lu, R. Montazami, D. S. Sakaguchi, N. N. Hashemi. Photo-Cross-Linked Poly(ethylene glycol) Diacrylate Hydrogels: Spherical Microparticles to Bow Tie-Shaped Microfibers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 18797-18807. DOI: 10.1021/acsami.9b05555