

# SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGEL CON APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA

Navarro Arias, Diana Karime (1), Tavares Negrete, Jorge Alfonso (2), Quintero Ortega, Iraís Amaranta (3)

1 [Ingeniería Química Sustentable, Universidad de Guanajuato] | [navarroad2015@licifug.ugto.mx]

2 [Ingeniería Biomédica, Universidad de Guanajuato] | [tavaresnj2013@licifug.ugto.mx]

3 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [iraisq@fisica.ugto.mx]

## Resumen

En la actualidad es de gran interés en el área de ingeniería tisular la fabricación de andamios poliméricos que provean sustento a células durante la reparación y regeneración de un tejido; para esto se han desarrollado diversos biomateriales, los cuales buscan mimetizar las propiedades del tejido de interés, para promover la migración y proliferación celular. En este trabajo se sintetizaron hidrogeles base quitosano entrecruzado con colágeno tipo I mediante la reacción de Schiff utilizando almidón dialdehído (DAS) como entrecruzante. El almidón fue modificado previamente mediante una oxidación en medio ácido con peryodato obteniendo un grado de modificación del 74%. Los hidrogeles fueron caracterizados mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), además, los biomateriales fueron sometidos a pruebas de hinchamiento y degradación y se determinó el grado de entrecruzamiento de los diferentes polímeros obtenidos mediante un ensayo de ninhidrina.

## Abstract

Nowadays, it is of great interest in the field of tissue engineering the manufacturing of polymeric scaffolds which can provide sustenance to the cells during the repair and regeneration of any tissue; diverse biomaterials have been developed for this reason, these materials are supposed to mimic the properties of the tissue of interest to promote the migration and cellular proliferation. In this work, chitosan based hydrogels were synthesized, crosslinked with collagen type I via a Schiff reaction using dialdehyde starch (DAS) as crosslinking agent. The starch was previously modified by an oxidation in acid medium using periodate, obtaining a percentage of modification of 74%. The hydrogels were characterized with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR); besides, essays of degradation and swelling were made. The crosslinking index was determinate with a ninhydrin essay.

## Palabras Clave

Biomateriales; Cartílago; Hidrogel; Biocompatible; Entrecruzamiento.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de los biomateriales, los hidrogeles pueden ser utilizados para diversas aplicaciones del área de la biomédica como sistemas de liberación de fármacos, cargadores de células y como andamios para ingeniería de tejidos [1]. Los tratamientos actuales para atacar trastornos musculoesqueléticos como lo son la rehabilitación o cirugía no han tenido éxito debido a que estas enfermedades son crónico degenerativas [2]; por lo cual, se propone el diseño de materiales biocompatibles y biodegradables que presenten propiedades bioquímicas, estructurales y mecánicas similares a las del tejido dañado y promuevan la regeneración de este.

El objetivo de este trabajo es realizar la modificación del almidón para producir almidón dialdehído (DAS) con un porcentaje de modificación superior al 60%, para posteriormente preparar hidrogeles base quitosano y colágeno utilizando DAS como entrecruzante. Finalmente se caracterizará tanto del almidón modificado como los hidrogeles y se realizará una comparación que evidencie el efecto que causa en las propiedades de los materiales la cantidad de entrecruzante presente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

El quitosano de peso molecular medio y grado de acetilación del 85% (Lot# SLBH7118V), el peryodato de sodio (Lot# MKBW4508V), el almidón de maíz (Lot# MKBW7231V) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El colágeno fue extraído de tendón de cola de rata. Todos los reactivos utilizados durante este trabajo fueron de grado analítico.

### Métodos

#### *Preparación de almidón dialdehído*

La modificación del almidón se llevó a cabo por oxidación en medio ácido con peryodato siguiendo el protocolo previamente descrito por Zuo et al [3] realizando algunas modificaciones con el fin de obtener un porcentaje de modificación mayor. Se disolvieron 3 g de peryodato de sodio en 26 mL de ácido clorhídrico 0.6M. A esta solución se agregaron 2.01 g de almidón para formar una emulsión al 8%. La emulsión fue puesta en baño María a 37°C durante 4 horas con agitación constante. Finalmente, el sólido obtenido fue filtrado y se realizaron lavados con agua destilada y acetona con el fin de remover iones de yodo que queden en la solución. El sólido filtrado fue secado en un horno al vacío durante 12 horas a 40°C. Debido a que el peryodato de sodio es fotosensible, toda la reacción se llevó a cabo en la obscuridad.

#### *Cuantificación de grado de modificación del DAS*

Con la finalidad de conocer el porcentaje de modificación del almidón, se realizó una cuantificación de grupos aldehído presentes en la molécula, para esto se disolvieron 0.2 g de DAS en 10 mL de NaOH 0.25M y se colocó la solución a baño María a 70°C durante 2 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se enfrió la solución café rojiza y se agregaron 15 mL de ácido sulfúrico con agitación constante hasta obtener una solución amarillo pálido. Se agregaron 0.2 g de carbón activado, se continuó agitando durante 2 minutos y se filtró obteniendo una solución transparente. A esta solución se agregaron 4 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.1M. Una vez obtenido el volumen de titulación, se realiza el cálculo utilizando la siguiente expresión:

$$\%CHO = \frac{[C_1 V_1 + C_2 V_2 - 2(C_3 V_3)] \times 161}{m \times 1000} \times 100\%$$

Donde  $C_1 = 0.25$ ,  $V_1 = 10$  mL,  $C_2 = 0.1$ ,  $C_3 = 0.125$ ,  $V_3 = 15$  mL,  $m$  es la masa de DAS, 161 es la masa molecular relativa promedio de la unidad de glucosa del DAS y  $V_2$  es el volumen de NaOH necesario para terminar la titulación.

### Preparación de hidrogeles

Se preparó una solución de colágeno al 2% (p/v) en ácido acético 1%(v/v) manteniendo agitación constante hasta su completa disolución. Se añadió una solución de quitosano 2% (p/v) en ácido acético 1% de tal manera que se tuviera una relación 2:1 para un volumen total de solución de 4 mL. Se preparó una solución de DAS el 2% en agua destilada colocando a baño María a 90°C durante una hora con agitación constante [4].

Se prepararon diferentes hidrogeles variando el volumen de entrecruzante en cada uno con el fin de observar el efecto que tienen el grado de entrecruzamiento en las propiedades de hinchamiento y degradación del biomaterial. La composición de los hidrogeles preparados se muestra en la Tabla 1.

Antes de agregar el entrecruzante se ajustó el pH de la mezcla a 7.4 y se mantuvo a una temperatura de 4°C. Después de agregar la solución de entrecruzante, se dejó gelificar en el horno a 37°C durante 2 horas y posteriormente se almacenaron los hidrogeles en refrigeración.

**Tabla 1. Composición de los hidrogeles preparados.**

Hidrogel	Volumen colágeno/quitosano (mL)	Volumen DAS (mL)
Control	4	0.0
H1	4	0.5
H2	4	1.0
H3	4	1.5

### Espectroscopía

Se obtuvieron los espectros de los hidrogeles, así como del almidón modificado, el colágeno y el quitosano con el fin de comparar las señales que se observan utilizando el equipo Nicolet iS5 de Thermo Fisher Scientific con un blanco de KBr, utilizando la técnica de reflectancia difusa. Las muestras fueron secadas previamente en un horno al vacío a 40°C durante 12 horas.

### infrarroja (FTIR)

### Ensayo de hinchamiento

Para esta prueba fue necesario secar una muestra de cada uno de los hidrogeles en un horno al vacío durante 12 horas. El material seco fue pesado y se sumergió en PBS (pH 7.4) manteniendo agitación constante a 10 rpm y una temperatura de 37°C. El peso de los hidrogeles fue monitoreado a diferentes intervalos de tiempo durante 5 días.

### Ensayo de degradación en colagenasa

Se preparó una solución de tris 0.05M ajustando el pH 7.4 con HCl. Utilizando esta solución como solvente, se preparó una solución de EDTA 0.005M y una de CaCl<sub>2</sub> 0.005M. En la solución de EDTA se disolvió colagenasa para formar una solución 0.010mg/mL. Se preparó una solución final mezclando el mismo volumen de solución de colagenasa y de CaCl<sub>2</sub>. Los hidrogeles fueron secados previamente y se añadió 1 mL de solución final por cada 10 mg de hidrogel seco, se colocó en agitación constante a 10 rpm y a 37°C monitoreando el peso del material cada determinado tiempo durante 5 días.

### Cuantificación de grado de entrecruzamiento

Para determinar el grado de entrecruzamiento de cada uno de los hidrogeles se realizó un ensayo de ninhidrina para determinación de grupos amino libres siguiendo un protocolo previamente descrito [5]. Para esto se preparó una solución acuosa de ácido cítrico 0.1M y se agregó NaOH para formar citrato de sodio hasta un pH de 7.4. A esta solución se agregó ninhidrina para formar una solución al 2% (p/v).

Los hidrogeles fueron secados previamente y el material seco fue colocado en tubos eppendorf, al cual se agregó la solución de ninhidrina (2 mL de solución por cada 15 mg de material seco). Las muestras se colocaron en baño María a 95°C durante 25 minutos y finalmente se midió la absorbancia a 567 nm. Para determinar el porcentaje de entrecruzamiento se utilizó la expresión siguiente:

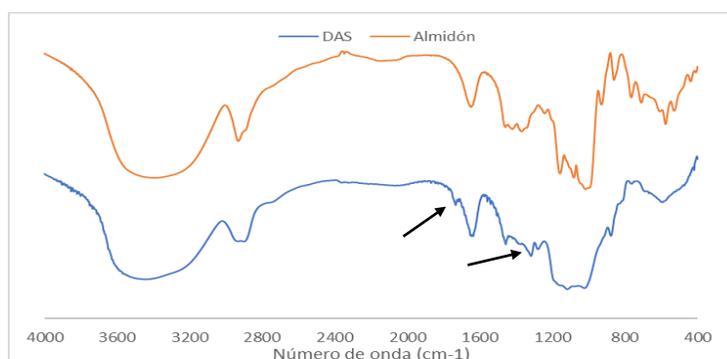
$$CI = \frac{[NH_2]_0 - [NH_2]_x}{[NH_2]_0}$$

Donde CI es el índice de entrecruzamiento (Crosslinking Index),  $[NH_2]_0$  es la absorbancia del material no entrecruzado o control y  $[NH_2]_x$  es la absorbancia de los hidrogeles entrecruzados ( $x=0.5, 1.0, 1.5$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Preparación de almidón dialdehído

Siguiendo el protocolo se llevó a cabo la reacción con almidón obteniendo un grado de modificación del 74%. La modificación ocurre mediante una oxidación ácida provocando el rompimiento del enlace C-C entre los carbonos C2 y C3 de los monómeros que conforman las cadenas del almidón permitiendo la formación de los grupos aldehído. Se obtuvo el espectro IR del DAS y del almidón (Figura 1) para realizar una comparación e identificar las bandas correspondientes a los grupos aldehído. En el espectro del DAS se resaltan dos picos importantes, en  $1720\text{ cm}^{-1}$  se observa la señal correspondiente a la vibración del enlace C=O y en  $1310\text{ cm}^{-1}$  la señal que proporciona la vibración del enlace sencillo C-O, además de los picos que están también presentes en el espectro del almidón como la señal que indica la presencia de puentes de hidrogeno centrada en  $3310\text{ cm}^{-1}$  y la de la vibración de los enlaces C-H en  $2930\text{ cm}^{-1}$ .



### Caracterización de hidrogeles

#### Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

Se obtuvo el espectro IR de los hidrogeles y se realizó una comparación con el espectro del colágeno y quitosano utilizados para la fabricación de los hidrogeles ubicando las señales características (Figura 2). Las señales con las que es posible confirmar que ocurrió el entrecruzamiento entre los polímeros son la señal que corresponde a el enlace C=N a  $1600\text{ cm}^{-1}$  y en  $1060\text{ cm}^{-1}$  las señales de los enlaces C-N y H-N. Además, en el espectro del hidrogel ya no observa la señal en  $1720\text{ cm}^{-1}$  que se observaba en el espectro del DAS. Estos resultados indican que la síntesis de los hidrogeles mediante una reacción de Schiff fue exitosa.

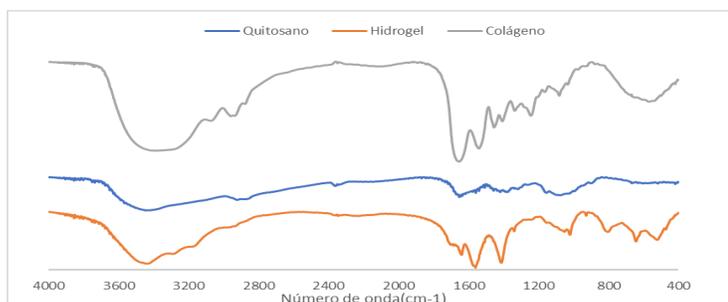
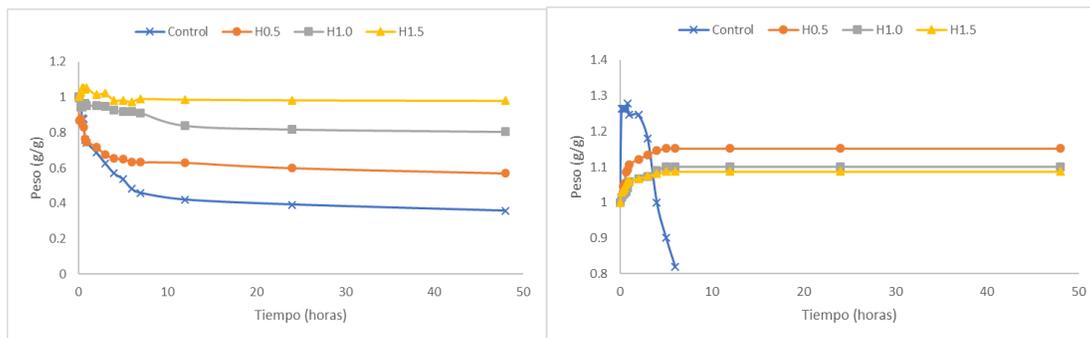


FIGURA 2: Espectro infrarrojo (FTIR) del hidrogel, el colágeno y el quitosano.

### Ensayos de degradación e hinchamiento

Durante estos ensayos se monitoreó el peso de los hidrogeles durante 5 días obteniendo los gráficos que se presentan en la Figura 3, en donde se muestra el tiempo transcurrido en horas contra la relación de los pesos del material hinchado o degradado con respecto al peso inicial o del material seco. En ambos gráficos es posible observar cambios en las primeras horas y después de las 9 horas un comportamiento constante.

En el gráfico de la prueba de degradación (izquierda) se observa que la degradación es más lenta entre más cantidad de entrecruzante se tiene en el hidrogel. Por el contrario, en el gráfico de hinchamiento (derecha) se observa que el hidrogel que tiene mayor capacidad de retener agua es el H0.5 debido a que el poro del andamio es más grande que en los otros dos hidrogeles, esto se sabe debido a que el tamaño del poro va disminuyendo conforme se aumenta la cantidad de entrecruzante.



**FIGURA 3: Resultados de los ensayos de degradación (izquierda) e hinchamiento (derecha) para cada uno de los hidrogeles preparados incluido el control.**

Para cada uno de los hidrogeles preparados se realizó la cuantificación de grado de entrecruzamiento obteniendo 41.8%, 50.4% y 55.9%  $\pm$  2.3% para los hidrogeles H0.5, H1.0 y H1.5 respectivamente.

### CONCLUSIONES

Se realizó con éxito la modificación del almidón obteniendo un porcentaje de modificación del 74%. Se logró sintetizar hidrogeles entrecruzando dos biopolímeros con diferentes cantidades de entrecruzante con lo que pudimos observar cómo esto afecta en las propiedades del biomaterial obteniendo un grado de entrecruzamiento de hasta 56%  $\pm$  2.3%.

### REFERENCIAS

- [1] Tan H., Chu, C.R., Payne, K.A. & Marra, K.G. (2009). Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 30, 2499-2506.
- [2] March LM, Bachmeir CJ. (1997). Economics of osteoarthritis. A global perspective. *Baillieres Clin Rheumatol*, 11, 817-834.
- [3] Zuo, Y., Liu, W., Xiao, J., Zhao, X., Zhu, Y., Yiqiang, W. (2017). Preparation and characterization of dialdehyde starch by one-step acid hydrolysis and oxidation. *International Journal of Biological Macromolecules* 103, 1257-1264.
- [4] Ma, X., Deng, J., Du, Y., Li, X., Fan, D., Zhu, C., Hui, J., Ma, P., Xue, W. (2014). A novel chitosan-collagen-based hydrogel for use as a dermal filler: initial in vitro and in vivo investigations. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 2749-2763.
- [5] Mendoza, B., Caulch, J. (2009). The effect of surfactants, crosslinking agents and L-cysteine on the stabilization and mechanical properties of bovine pericardium. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 7.