



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

ELABORACIÓN DE ANDAMIOS ELECTROHILADOS
A BASE DE COLÁGENA MARINA Y ÁCIDO
HIALURÓNICO CON POTENCIAL APLICACIÓN EN
LA INGENIERÍA TISULAR

Tesis que presenta

JOSÉ LUIS QUIJANO MENDOZA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS (MATERIALES
POLIMÉRICOS)

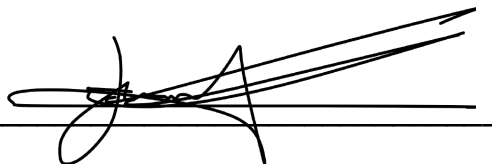
Mérida, Yucatán, México

2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: José Luis Quijano Mendoza

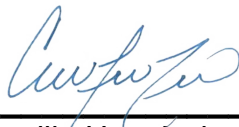
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **José Luis Quijano Mendoza** titulado “**Elaboración de andamios electrohilados a base de colágena marina y ácido hialurónico con potencial aplicación en la ingeniería tisular**”, fue realizado en la Unidad de Materiales, en la línea de investigación Materiales para Medicina Regenerativa, en los laboratorios de Biomateriales, Química y Química Macromolecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes** y la codirección del **Dr. Fernando Hernández Sánchez**, pertenecientes al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 03 de octubre de 2023

Agradecimientos

Al CONAHCYT por la beca otorgada para la realización de esta investigación, 1099872.

Al proyecto Ciencia de Frontera 2019, FORDECYT/PRONACES, 6660.

Al laboratorio de Biomateriales, laboratorio de Química y laboratorio de Química Macromolecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. por permitirme el uso de sus instalaciones.

A mi directora de tesis, la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, así como por su confianza, apoyo y enseñanzas durante el desarrollo de esta investigación.

A mi codirector de tesis, el Dr. Fernando Hernández Sánchez por brindarme las facilidades para el uso del equipo de electrohilado, así como por su apoyo y tiempo durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del comité tutorial: Dr. José Manuel Cervantes Uc, Dr. Cristian Andrés Acevedo Gutiérrez (Universidad Técnica Federico Santa María), Dra. María Ortencia González Díaz y Dra. Perla Elvia García Casillas (CIQA) por sus observaciones y aportaciones para mejorar este trabajo.

A la Q.I. Rossana Vargas Faride por las facilidades para realizar la liofilización en el laboratorio de Química Macromolecular. Al Dr. Wilberth Antonio Herrera Kao por su apoyo con las caracterizaciones de FTIR-ATR, DSC y TGA. A la Dra. Georgina Estrada Tapia y a la M.C. Lucila Aurelia Sánchez Cach por las facilidades para realizar el ensayo de Bradford y la electroforesis SDS-PAGE en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de CICY. Al Dr. Hugo Joel Carrillo Escalante por su orientación, mentoría y apoyo durante el electrohilado y el entrecruzamiento. A la Dra. Hortencia Maldonado Textle (CIQA) por el apoyo técnico brindado. Al Dr. David Mauricio Giraldo Gómez (Facultad de Medicina, UNAM) por el ácido hialurónico utilizado en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Vanessa, Cielo, Noemí, Jaime, Maritza, José Miguel, Antonio, Tania y Luis Édgar por su apoyo, consejos y enseñanzas.

A mis padres, José Luis y Emma, y a mis hermanos Juan José, Addy y Emma por estar para mí y apoyarme siempre.

Dedicatoria

A mis padres y mis hermanos, por siempre creer en mí y darme palabras de aliento cuando más lo necesitaba.

índice

Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VIII
Resumen	X
Abstract	XI
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	2
1.1. Ingeniería tisular	2
1.2. Andamios	2
1.3. Colágena	3
1.4. Ácido hialurónico	6
1.5. Electrohilado	7
1.6. Andamios a base de CLG y AH	9
Hipótesis	10
Objetivos	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Capítulo 2. Metodología	11
2.1. Materiales	11
2.2. Extracción de CLG marina	11
2.3. Caracterización fisicoquímica de la CLG extraída a partir de escamas de pez	15
2.4. Análisis proteicos de la CLG extraída a partir de escamas de pez	17
2.5. Fabricación de andamios electrohilados a base de CLG marina y AH, entrecruzados con glutaraldehído	19
2.6. Caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados	21
Capítulo 3. Resultados y Discusión	24
3.1. Extracción de CLG marina	24
3.2. Rendimiento y pureza de la CLG extraída a partir de escamas de pez	27
3.3. Propiedades fisicoquímicas de la CLG extraída a partir de escamas de pez	30
3.4. Fabricación de andamios electrohilados a base de CLG marina y AH, entrecruzados con glutaraldehído	35
3.5. Propiedades fisicoquímicas de los andamios entrecruzados	38
Conclusiones	50
Perspectivas	51

Referencias	52
Anexo A. Efecto del solvente en el electrohilado	58
Anexo B. Parámetros de electrohilado.....	62
Anexo C. Efecto del entrecruzante en el electrohilado	64
Anexo D. Efecto de la fuente de AH	69

Índice de tablas

Tabla 1.1 Subfamilias de la colágena	5
Tabla 3.1 Porcentaje de rendimiento para escamas de <i>Lutjanus campechanus</i>	27
Tabla 3.2 Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo de la colágena obtenida de escamas	31
Tabla 3.3 Procesos degradativos de la CLG extraída de escamas de <i>Lutjanus campechanus</i>	33
Tabla 3.4 Parámetros de electrohilado durante la elaboración de andamios a base de CLG marina y AH	36
Tabla 3.5 Parámetros de electrohilado durante la elaboración de andamios a base de CLG marina	36
Tabla 3.6 Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo de los andamios electrohilados	41
Tabla 3.7 Temperaturas máximas de degradación para los andamios	44
Tabla 3.8 Porcentaje de pérdida de masa para los andamios	44
Tabla 3.9 Absorbancia a 570 nm de las muestras durante el ensayo de ninhidrina	49
Tabla A.1. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo del andamio CLG-TFE	60
Tabla B.1. Estandarización del electrohilado para el andamio CLG	62
Tabla B.2. Estandarización del electrohilado para el andamio CLG-AH	62
Tabla C.1. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo del andamio CLG-EDC-NHS	65
Tabla C.2. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo del andamio CLG-AH-EDC-NHS	67
Tabla D.1. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo del andamio CLG-AH gallo	70

Índice de figuras

Figura 1.1 Triada de la ingeniería tisular	2
Figura 1.2 Estructura de la colágena	4
Figura 1.3 Estructura del ácido hialurónico	7
Figura 1.4 Diagrama esquemático de un equipo de electrohilado en montaje horizontal	8
Figura 2.1 Escamas de <i>Lutjanus campechanus</i>	12
Figura 2.2 Licuado de escamas	12
Figura 2.3 Descalcificación de escamas	13
Figura 2.4 Pepsinización	13
Figura 2.5 Liofilización	14
Figura 2.6 Espectrómetro de infrarrojo marca Thermo Scientific modelo Nicolet 8700	16
Figura 2.7 Analizador termogravimétrico marca Perkin Elmer modelo TGA 8000	16
Figura 2.8 Calorímetro diferencial de barrido marca Perkin Elmer modelo DSC 7	17
Figura 2.9 Lector de placas multimodal marca BioTek modelo Cytation 3	18
Figura 2.10 Cámara de electroforesis marca Bio-Rad modelo Mini Protean 3 Cell	19
Figura 2.11 Máquina de electrohilado marca TONGLI modelo TL 01	20
Figura 2.12 Regulador de flujo marca New Era Pump Systems modelo NE-1000	20
Figura 2.13 Microscopio de transmitancia marca Labomed modelo TCM 400 acoplado a una cámara digital marca Labomed modelo iVu 5000	22
Figura 3.1 Escamas lavadas	24
Figura 3.2 Escamas descalcificadas	25
Figura 3.3 Botón obtenido en la centrifugación a 1200 rpm	25
Figura 3.4 Botón obtenido durante la centrifugación a 6000 rpm	26
Figura 3.5 Colágena dializada y liofilizada	26
Figura 3.6 Curva patrón utilizando BSA como proteína de referencia	28
Figura 3.7 Perfil electroforético	29
Figura 3.8 Espectro infrarrojo de colágena obtenida de escamas de <i>Lutjanus campechanus</i>	31
Figura 3.9 TGA y DTGA de la colágena obtenida de escamas de <i>Lutjanus campechanus</i>	33
Figura 3.10 Termograma de DSC de la colágena obtenida de escamas de <i>Lutjanus campechanus</i>	34
Figura 3.11 Estructura macroscópica de los andamios electrohilados	37
Figura 3.12 Andamios sometidos a un tratamiento entrecruzante con GTA	38

Figura 3.13 Agregados fibrilares electrohilados	39
Figura 3.14 Relación entre los diámetros promedio de las fibras electrohiladas y el tipo de solución utilizada	40
Figura 3.15 Espectro infrarrojo de los andamios electrohilados	41
Figura 3.16 TGA y DTGA de los andamios electrohilados	43
Figura 3.17 Termograma de DSC para los andamios electrohilados	46
Figura 3.18 Termograma de DSC para los andamios entrecruzados	47
Figura 3.19 Solución de ninhidrina	48
Figura 3.20 índice de entrecruzamiento por ensayo de ninhidrina de los andamios	48
Figura A.1. Estructuras macro y microscópicas del andamio CLG-TFE	59
Figura A.2. Espectro infrarrojo del andamio CLG-TFE	59
Figura C.1. Macroestructura del andamio CLG-EDC-NHS	64
Figura C.2. Espectro infrarrojo del andamio CLG-EDC-NHS	65
Figura C.3. Macroestructura del andamio CLG-AH-EDC-NHS	66
Figura C.4. Espectro infrarrojo del andamio CLG-AH-EDC-NHS	67
Figura D.1. Estructuras macro y microscópicas del andamio CLG-AH gallo	69
Figura D.2. Espectro infrarrojo del andamio CLG-AH gallo	70

Resumen

Los andamios a base de colágena (CLG) y ácido hialurónico (AH) son un recurso valioso y ampliamente utilizado en la ingeniería de tejidos blandos. Sin embargo, en la literatura se reportan pocos trabajos en los que se utilicen en conjunto dichos polímeros para promover la regeneración tisular, pese a que estos materiales se encuentran ampliamente distribuidos en la matriz extracelular (MEC) de diversos organismos. En este sentido, en el presente trabajo se extrajo CLG de las escamas de huachinango (*Lutjanus campechanus*). Posteriormente, ésta junto con AH comercial se emplearon como materia prima para elaborar un andamio electrohilado, el cual fue sometido a un entrecruzamiento con glutaraldehído (GTA) con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas, y evaluar su potencial aplicación en la ingeniería tisular.

La extracción de CLG se llevó a cabo mediante una hidrólisis enzimática en un medio ácido. La proteína obtenida se caracterizó fisicoquímicamente mediante la espectroscopia FTIR-ATR, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Adicionalmente, se realizaron análisis proteicos mediante la técnica de Bradford y electroforesis SDS-PAGE.

Los andamios de CLG extraída y AH se fabricaron mediante electrohilado y posteriormente fueron entrecruzados con vapores de GTA durante 1 h. Los andamios obtenidos se caracterizaron de manera fisicoquímica a través de la microscopía óptica (MO), espectroscopia FTIR-ATR, DSC, TGA y ensayo de ninhidrina.

Mediante los resultados de la espectroscopia FTIR-ATR y la electroforesis SDS-PAGE, se pudo corroborar que la CLG obtenida durante el proceso de extracción empleado, es una variedad de CLG tipo I. Por otro lado, gracias al DSC se observó que esta proteína cuenta con una temperatura de desnaturalización cercana a 80 °C, mientras que el TGA arrojó la presencia de 2 procesos pirolíticos de degradación y una masa residual de 26.5%.

Con respecto a los andamios, se encontró que el tratamiento entrecruzante genera cambios en la estructura química, a la vez que otorga estabilidad térmica. Esto se determinó con los resultados obtenidos del FTIR-ATR y del TGA. Por otro lado, la presencia del AH incrementa el diámetro de fibra, así como el porcentaje de entrecruzamiento. Sin embargo, no modifica las propiedades térmicas del andamio ya que éste cuenta con una temperatura de desnaturalización superior a la temperatura fisiológica. Debido a todo esto, estos andamios tienen una potencial aplicación en la ingeniería tisular.

Abstract

Scaffolds made of collagen (CLG and hyaluronic acid (AH) are a valuable resource which have been widely used in soft tissue engineering. However, there are few researches where both polymers are used together to promote tissue regeneration, even though these materials are widely distributed in the extracellular matrix (MEC) of diverse organisms. In the present work, CLG was extracted from red snapper's (*Lutjanus campechanus*) scales. Subsequently, it was used along with commercial hyaluronic acid (AH) as raw material to elaborate an electrospun scaffold, which was exposed to a crosslinking treatment with glutaraldehyde (GTA) in order to improve its physicochemical properties, so its potential application in tissue engineering could be evaluated.

CLG extraction was carried out with an enzymatic hydrolysis in an acidic environment. The resultant protein was characterized with physicochemical techniques such as FTIR-ATR spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA). Additionally, protein analysis was conducted through protein quantification with Bradford method and SDS-PAGE electrophoresis.

Scaffolds from red snapper's CLG and commercial AH were made with electrospinning technique and then, were successfully crosslinked with GTA vapor for 1 h. These structures were characterized using optical microscopy (MO), FTIR-ATR spectroscopy, DSC, TGA and ninhydrin assay.

Based on the results of FTIR-ATR spectroscopy and SDS-PAGE electrophoresis, it was confirmed that the CLG obtained during the proposed extraction process is a form of CLG type I. In addition, DSC highlight that this protein has a denaturation temperature closed to 80 °C, while TGA exhibits the presence of two pyrolytic degradation processes.

In respect of the scaffolds, it was found that the crosslinking treatment causes changes in the chemical structure, while simultaneously gives thermal stability. This was determined by the results obtained from FTIR-ATR and TGA. On the other hand, AH addition increases fiber diameter and crosslinking percentage. However, this polymer does not modify the scaffold thermal properties because it has a denaturation temperature above the physiological temperature. Consequently, these scaffolds have a potential application for tissue engineering.

Introducción

En la actualidad, la ingeniería tisular representa una alternativa prometedora en la reconstrucción de órganos y tejidos, ya que es una disciplina que se enfoca en diseñar estructuras biológicas funcionales para sustituir, reparar o regenerar tejidos y órganos dañados tales como cartílago, hueso, válvulas cardíacas, nervios, músculo y la piel, entre otros [1, 2], todo ello a través de la aplicación de tres elementos básicos, también conocidos como la triada de la ingeniería de tejidos: las células, las moléculas bioactivas y los andamios [3, 4].

En el campo de la ingeniería de tejidos, se han utilizado componentes como la colágena (CLG) y el ácido hialurónico (AH), los cuales destacan por sus propiedades fisicoquímicas, por su participación en la formación de distintas estructuras de la matriz extracelular (MEC), así como por sus propiedades viscoelásticas, alta capacidad de retención de agua, biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo cual les permite tener funciones biológicas únicas [5-7].

En la literatura se han reportado distintas técnicas para elaborar andamios a base de CLG y AH [5, 8, 9]. Entre ellas destaca el electrohilado, debido a que es un método de fabricación que ha demostrado ser eficaz para producir andamios con dimensiones macroscópicas controladas [10, 11]. No obstante, las estructuras producidas mediante CLG y AH carecen de las propiedades mecánicas adecuadas para el cultivo y proliferación celular. Por consiguiente, para optimizar dichas propiedades es necesario el uso de agentes químicos conocidos como entrecruzantes, entre los que destacan el hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, mejor conocido como EDC [12] y el glutaraldehído (GTA) [13]. El GTA es un entrecruzante común para la CLG y el AH, capaz de modificar los grupos laterales de ambos polímeros para volverlos reactivos [14] y así mejorar su estabilidad y resistencia a la humedad ambiental.

Bajo este panorama, el presente trabajo se enfoca en producir estructuras entrecruzadas de CLG marina/AH utilizando la técnica de electrohilado, para posteriormente emplearlas como andamios con posible aplicación en la ingeniería tisular.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. Ingeniería tisular

La ingeniería tisular, comúnmente denominada ingeniería de tejidos, es un campo interdisciplinario que utiliza los principios de la ingeniería y de las ciencias biológicas para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular [15]. El objetivo principal de esta disciplina es generar construcciones *in vitro* de tejido vivo que sean morfológica y funcionalmente similares al tejido nativo [16].

Los pilares fundamentales de la ingeniería tisular, también conocidos como la triada de la ingeniería de tejidos (Figura 1.4) son las células, las moléculas bioactivas y los andamios. Estos elementos se utilizan en conjunto para elaborar productos, tales como órganos y tejidos para mejorar la salud y calidad de vida humanas [3].

Sin embargo, los andamios pueden tener diversas aplicaciones, por lo que es imprescindible tomar en cuenta la relevancia fisiológica en cada caso, es decir, la característica correspondiente al funcionamiento biológico normal o sano de un tejido [16].

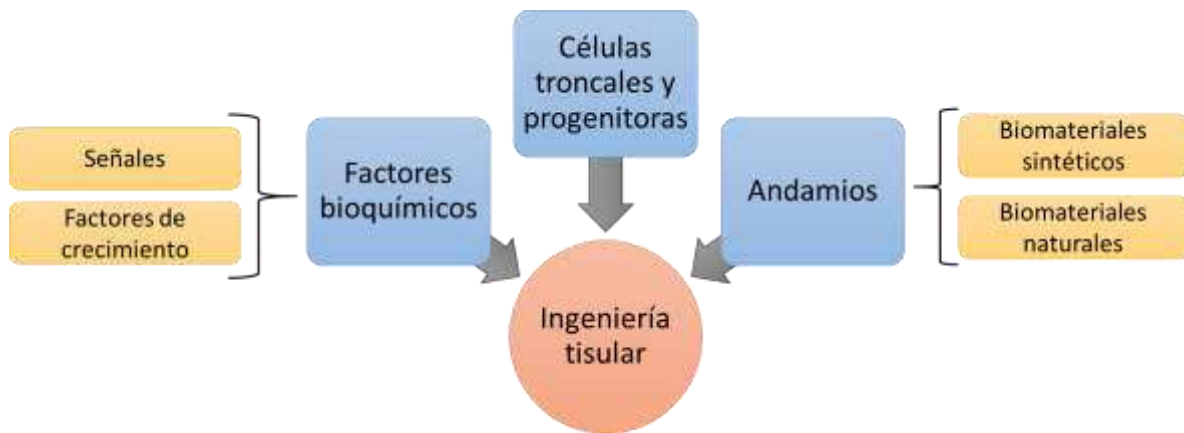


Figura 1.1. Triada de la ingeniería tisular [17].

1.2. Andamios

Para poder regenerar un tejido o restaurar las funciones de éste, es necesario un andamio, el cual es definido como un biomaterial tridimensional, poroso y sólido que actúa como una matriz temporal para la proliferación celular [18].

Para que un andamio sea apto para ingeniería de tejidos debe cumplir con algunos de los criterios siguientes [19]:

- La superficie debe permitir la adhesión celular y la retención de las funciones de células diferenciadas. De la misma forma, debe promover el crecimiento celular.
- El andamio debe ser biocompatible, es decir, ni el material del que está hecho ni sus productos de degradación deben provocar inflamación o toxicidad.
- El andamio debe ser biodegradable y eventualmente absorbido.
- El andamio debe poseer una porosidad capaz de permitir la adhesión celular e iniciar la regeneración de la MEC. La estructura del poro debe permitir una distribución espacial celular a través del andamio para facilitar la formación homogénea de tejido.
- El material debe tener propiedades mecánicas similares a las del tejido objetivo.

1.3. Colágena

En el cuerpo humano se encuentran diversas proteínas como la fibrina, la miosina y la actina, las cuales poseen diversas funciones biológicas. De entre ellas, destacan las colágenas (CLGs), también conocida como colágenos, por encontrarse entre las macromoléculas más complejas. Esta clase de proteínas constituye el principal componente de la MEC y, en los mamíferos, las CLGs representan aproximadamente el 30% de las proteínas; por lo tanto, son la estructura proteica más abundante en esta clase de organismos [20, 21].

Estructuralmente hablando, la CLG es un polímero semicristalino [22] que consiste en una estructura terciaria, en la cual, tres hebras paralelas de polipéptidos en posición levógira, se enrollan entre sí para formar una triple hélice dextrógira. La unidad repetitiva de este polímero sigue el patrón X-Y-Gly, donde Gly es el aminoácido glicina, mientras que X e Y pueden ser cualquier clase de aminoácido, comúnmente prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp) respectivamente [20]. En la Figura 1.5 se presenta la estructura típica de esta proteína.

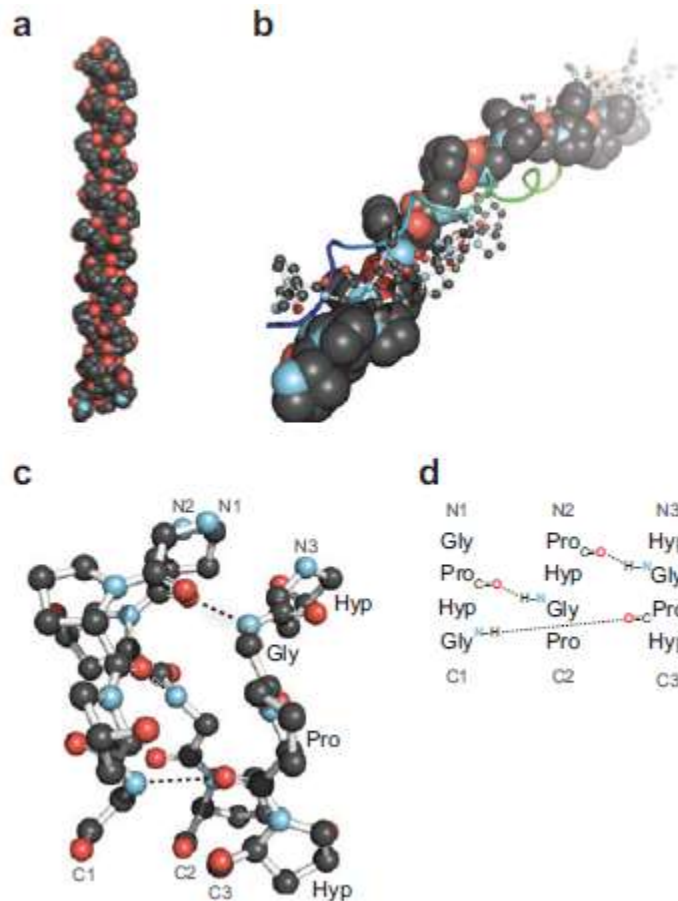


Figura 1.2. Estructura de la colágena [23]. En a) se muestra la estructura triple helicoidal de la colágena. En b) se presenta la vista hacia el eje de una triple hélice con las 3 hebras mostradas con las representaciones de modelo de espacio lleno, modelo de barras y esferas y modelo molecular de cintas. En c) se observa un segmento de la triple hélice de la colágena, resaltando la escalera de enlaces de hidrógeno intercadena. En d) se representa el escaloneo de las 3 cadenas mostradas en el apartado c.

Hasta la fecha, se han identificado 29 clases distintas de CLG, de las cuales, 28 se encuentran presentes en tejidos humanos [20]. Considerando su estructura, las CLGs pueden clasificarse en: formadoras de fibrillas, asociadas a fibrillas (FACIT, por sus siglas en inglés), filamentos granulares, fibrillas de anclaje, formadoras de redes, redes hexagonales, multiplexinas, membranales, entre otros [24]. En la tabla 1.2 se muestra la clasificación antes mencionada.

Tabla 1.1. Subfamilias de la colágena [24].

Subfamilia de CLG	Tipo de CLG
Colágenas formadoras de fibrillas	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
Colágenas asociadas a fibrillas (FACITs)	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII
Filamentos granulares	VI
Fibrillas de anclaje	VII
Colágenas formadoras de redes	IV
Redes hexagonales	VIII, X
Multiplexinas	XV, XVIII
Colágenas membranales	XIII, XVII, XXIII, XXV
Otros tipos de colágena	XXVI, XXVIII

Las CLGs formadoras de fibrillas (tipos I, II, III, V y XI) constituyen el 90% de la CLG disponible. En esta clase de CLG, la tropocolágena, que consiste en estructuras individuales de triple hélice, se congrega en fibrillas, las cuales posteriormente se aglomeran para formar fibras [20, 25].

De entre los distintos tipos de CLG, destaca la CLG tipo I por ser ampliamente utilizada debido a que es la clase de CLG más abundante en los mamíferos, comprendiendo cerca de 7 kg de tejido seco en el humano adulto. La estructura de este tipo de CLG está conformada por moléculas de tropocolágena, cada una compuesta de dos cadenas α_1 y una cadena α_2 . Esta CLG se encuentra presente en tejidos conectivos, tales como tendones, ligamentos y piel, así como en la fase orgánica del hueso. Aunado a esto, contribuye a la estabilidad mecánica de tejidos y órganos y, de igual forma, resulta crucial en la hemostasia, angiogénesis y biomineralización ósea [20, 21, 25].

Las CLGs destacan por presentar una biocompatibilidad excelente, ser biodegradables y biorenovables, así como por expresar una baja antigenicidad [25]. Dado que cuentan con una

amplia presencia en la MEC, pueden promover la formación tisular debido a su estructura molecular y señales bioquímicas, por lo cual, se encuentran involucradas en funciones biológicas críticas tales como la morfogénesis, la reparación tisular y el remodelamiento. Considerando lo antes expuesto, así como la naturaleza robusta de estas proteínas, es posible elaborar andamios porosos con aplicaciones en la ingeniería tisular, a base de este material mediante liofilización, bioimpresión 3D y electrohilado. Dichos andamios pueden modificarse o combinarse con otros materiales y proteínas tales como quitosano, alginato y AH para la regeneración de un tejido específico [20].

La CLG es principalmente obtenida de fuentes terrestres, como el ganado porcino y vacuno. Sin embargo, éstas representan un riesgo de enfermedades transmisibles al ser humano, entre las que destacan la encefalopatía espongiiforme bovina y la influenza porcina [25]. En los últimos años, las CLGs de fuentes marinas han ganado especial interés debido a que representan una alternativa más segura al no conocerse riesgos de transmisión patológica al ser humano [6]. Entre las CLGs de este tipo destacan las provenientes de peces [25], pepinos de mar [26] y medusas [6].

Fisicoquímicamente, existen diferencias entre las CLGs marinas y terrestres; por ejemplo, las primeras presentan una temperatura de desnaturalización inferior en comparación con las segundas y, por lo general, las soluciones y dispersiones producidas con éstas son menos viscosas que las generadas con sus contrapartes terrestres. Estas diferencias están asociadas con alteraciones en el contenido de hidroxiprolina y/o con la hidroxilación de la prolina presente en las colágenas marinas. Este aminoácido se encuentra en menor cantidad en éstas que en las colágenas terrestres [25].

1.4. Ácido hialurónico

El AH es un polisacárido lineal presente en todos los vertebrados, siendo uno de los componentes principales de tejidos conectivos y el glucosaminoglucano con mayor presencia en la MEC. De igual manera, se halla intracelularmente y en la matriz pericelular. Este polímero se encuentra presente en casi todos los fluidos y tejidos corporales, tales como el fluido sinovial, cordón umbilical, humor vítreo, tendones, cartílago, paredes arteriales, válvulas cardíacas y piel, en concentraciones y pesos moleculares variables entre cada tejido [27, 28].

Estructuralmente hablando, el AH consiste en unidades repetitivas disacáridas de N-acetil-D-glucosamina y D-ácido glucorónico, las cuales están unidas alternadamente mediante enlaces glucosídicos β -1,3 y β -1,4 respectivamente [29]. Cuando ambos azúcares se encuentran en

configuración β , tanto los hidroxilos como la fracción carboxilada y el carbón anomérico en el azúcar adyacente se encuentran en posiciones ecuatoriales estéricamente favorables, mientras que todos los átomos de hidrógeno ocupan las posiciones axiales menos favorables. Todo ello hace que la estructura del AH sea energéticamente estable [27]. Dicha estructura química es sustancialmente consistente, con la excepción esporádica de residuos de glucosamina desacetilada [29]. En la Figura 1.6 se muestra la estructura de este polisacárido.

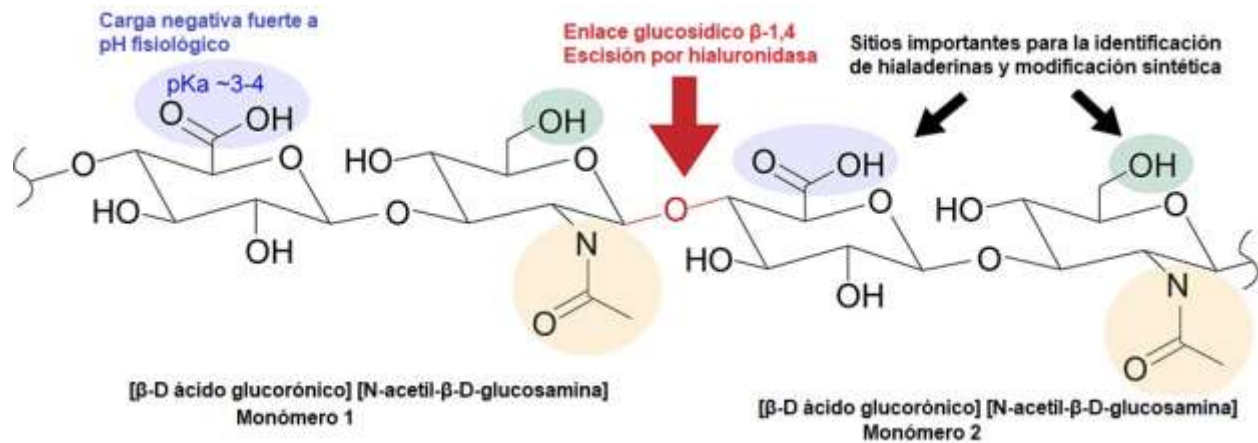


Figura 1.3. Estructura del ácido hialurónico [28].

En condiciones fisiológicas, este biopolímero toma la forma de aniones o sales de sodio, como el hialuronato sódico, altamente hidrofílicos debido a la presencia de grupos carboxilados [27, 29].

El AH destaca por exhibir una buena biocompatibilidad y ser biodegradable, así como por no inducir efectos inflamatorios, tóxicos e inmunogénicos [29]. Aunado a ello, es una pieza clave en diversas funciones biológicas ya que le otorga, tanto a células como a tejidos, diversas señales mecánicas y químicas [28]. Este biopolímero puede influir directamente, dependiendo del peso molecular, en la adhesión, proliferación, migración y organización celulares, así como en la regulación de la respuesta inflamatoria y la señalización intracelular [27].

La producción de este polisacárido está basada principalmente en el procesado de tejido animal o bien, en la síntesis de bacterias, como las del género *Streptococcus*. A pesar de las diversas fuentes de extracción, este polímero es altamente biocompatible debido a que su estructura se encuentra ampliamente preservada entre distintas especies [27].

1.5. Electrohilado

El electrohilado es una técnica simple y efectiva para fabricar fibras con una amplia gama de diámetros [30]. Este método puede ser utilizado con metales, cerámicos, polímeros naturales o

sintéticos, así como con polímeros cargados con cromóforos, nanopartículas u otra clase de agentes activos [31].

Durante el proceso de electrohilado, una solución polimérica, sostenida por su tensión superficial al final de un tubo capilar, interacciona con un campo eléctrico y, como consecuencia, se induce una carga eléctrica en la superficie del líquido. Esto provoca que la gota del líquido sea distorsionada en una estructura cónica denominada cono de Taylor. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas electrostáticas (la repulsión electrostática entre las cargas superficiales y la fuerza coulombiana ejercida por el campo eléctrico) superan a las fuerzas de tensión superficial. Debido a esto, un chorro cargado de la solución es expulsado de la punta del cono de Taylor. De igual manera, se genera un azote inestable y rápido entre la punta del capilar y el colector, por lo que el disolvente se evapora a medida que el polímero es depositado en el colector [32, 33].

Para esta técnica, es importante considerar la velocidad de flujo (o gasto) de inyección, el voltaje aplicado y la distancia aguja-colector, ya que estas variables influyen en la calidad y el diámetro de las fibras obtenidas [17]. En la Figura 1.7 se muestra un montaje típico para el electrohilado.

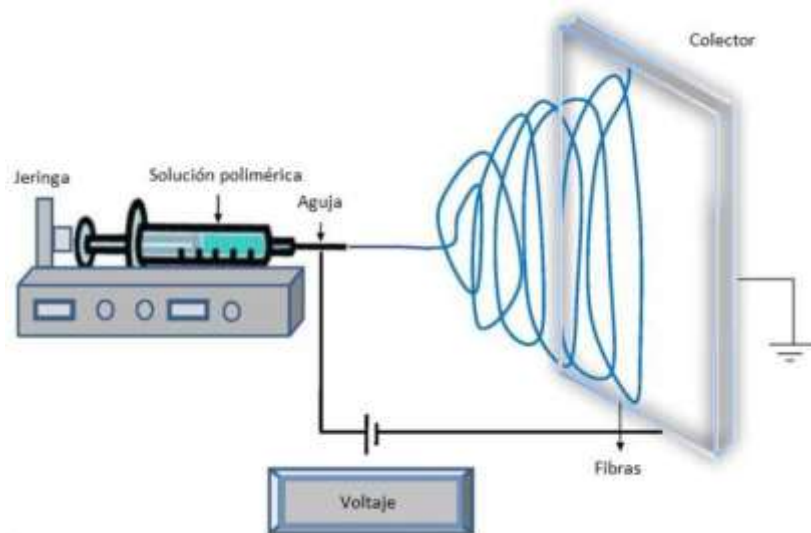


Figura 1.4. Diagrama esquemático de un equipo de electrohilado en montaje horizontal [33].

Entre las ventajas de los andamios producidos con esta técnica se encuentran la microestructura altamente porosa, con poros interconectados, una relación de área superficial/volumen relativamente grande y la maleabilidad para adoptar distintas formas [34]. Dichas características son similares a las de la MEC, por lo que estos andamios son un soporte adecuado para que las células se adhieran, migren y proliferen [11]. Incluso, se ha demostrado que las células

implantadas en este tipo de estructuras tienden a mantener su forma fenotípica y crecen orientadas cuando las fibras tienen una disposición determinada [35].

1.6. Andamios a base de CLG y AH

Desde hace unos años se han comenzado a fabricar andamios a base de CLG y AH, utilizando diversos métodos, para su uso en la ingeniería de tejidos. Por ejemplo, se ha reportado la elaboración de andamios con CLG bovina/AH, mediante liofilización, para la regeneración de cartílago. Sin embargo, debido a la falta de interconectividad entre los poros de las estructuras fabricadas, los condrocitos formaron agregados en lugar de dispersarse homogéneamente [8]. Otros estudios reportan andamios de CLG-AH para regenerar tejido adiposo [36], cultivar células mesenquimales nerviosas [37] y células del nervio ciático si se combina con policaprolactona electrohilada [38]. Incluso, se ha comprobado que, cuando el AH se mezcla con derivados de condroitina, pueden aplicarse en la reparación de tejido cerebral [39]. De igual manera, se han registrado andamios construidos con CLG y AH utilizando técnicas más modernas. Un trabajo del 2020 reportó andamios de CLG porcina/AH hechos mediante impresión 3D, con los cuales pudieron cultivar exitosamente células BJ, las cuales consisten en una línea celular inmortalizada a base de fibroblastos dérmicos provenientes de tejido prepucial [9]. De especial interés resulta un estudio donde se elaboraron andamios electrohilados a base de CLG bovina/AH, el cual demostró que los andamios poseen la capacidad para inducir la proliferación de fibroblastos prepuciales. En dicho trabajo, las variables experimentales fueron el tipo de disolvente utilizado, así como la proporción CLG/AH [5].

Hipótesis

Mediante el electrohilado y la incorporación de AH a andamios de colágena marina se pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas del material, aumentando su grado de entrecruzamiento, haciéndolo apto para su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos blandos.

Objetivos

Objetivo general

Elaborar andamios electrohilados a base de CLG marina y AH, entrecruzados con GTA, cuyas propiedades fisicoquímicas sean adecuadas para su potencial aplicación en la ingeniería tisular.

Objetivos específicos

1. Extraer CLG marina a partir de escamas de huachinango (*Lutjanus campechanus*).
2. Analizar las propiedades fisicoquímicas de la CLG extraída, utilizando las técnicas de FTIR, DSC, TGA y electroforesis SDS-PAGE.
3. Fabricar andamios electrohilados a base de CLG marina y AH, entrecruzados con GTA.
4. Analizar las propiedades fisicoquímicas de los andamios CLG-AH, mediante FTIR, microscopía óptica, DSC, TGA y ensayo de ninhidrina.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Materiales

A continuación, se reportan los reactivos utilizados tanto para la extracción de CLG marina como para la elaboración de los andamios electrohilados.

- Para la extracción de CLG marina

Durante la obtención de CLG se utilizaron los reactivos siguientes: Hidróxido de sodio (marca JT Baker, 98% de pureza, número de catálogo MAC-M7708-06); EDTA tetrasódico (marca Săni); EDTA disódico dihidratado (marca JT Baker, 99% de pureza, número de catálogo JTB-8993-01); ácido acético (marca Sigma Aldrich, 99% de pureza, número de catálogo A6283); pepsina (marca Sigma Aldrich, número de catálogo P7125); cloruro de sodio (marca Sal la fina) y agua destilada.

- Para la elaboración de andamios electrohilados

Para fabricar los andamios electrohilados se requirió de: ácido hialurónico de *Streptococcus equi* (marca Sigma Aldrich, peso molecular entre 1300 kDa y 2500 kDa, número de catálogo 53747); 1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol (mejor conocido como HFIP) (marca Sigma Aldrich, 99% de pureza, número de catálogo 105228); ácido fórmico (marca Sigma Aldrich, 95% de pureza, número de catálogo F0507); glutaraldehído (marca Sigma Aldrich, 25% m/v, número de catálogo G6257). De igual manera, durante la estandarización del proceso se utilizó 2,2,2-trifluoroetanol (también conocido como TFE) (marca Sigma Aldrich, 99% de pureza, número de catálogo T63002); N,N-dimetilformamida (mejor conocida como DMF) (marca Sigma Aldrich, 99.8% de pureza, número de catálogo 319937); hidróxido de sodio (marca JT Baker, 98% de pureza, número de catálogo MAC-M7708-06); etanol (96% de pureza); hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (o EDC) (marca Sigma Aldrich, número de catálogo E7750) y N-hidroxisuccinimida (o NHS) (marca Sigma Aldrich, 98% de pureza, número de catálogo 130672).

2.2. Extracción de CLG marina

Se colectaron escamas de la especie *Lutjanus campechanus* en pescaderías y congeladoras del municipio de Progreso, Yucatán, México. Posterior a la colecta, las muestras se congelaron para su preservación, previo a la extracción de CLG mediante una técnica modificada de hidrólisis enzimática [22, 40].

- Lavado

El primer paso del proceso fue el lavado de escamas. Para ello, las escamas (como las que se observan en la Figura 2.1) se licuaron en una solución de NaOH 0.1 M, a una relación escamas/solución de 1:10 (m/v), durante 3 min. Después del tiempo antes mencionado, se agitaron magnéticamente durante 48 h. Se realizaron cambios de solución cada 24 h. En la Figura 2.2 se ilustra el proceso de licuado.



Figura 2.1. Escamas de *Lutjanus campechanus*.



Figura 2.2. Licuado de escamas.

- Descalcificación

Durante este paso se eliminaron residuos minerales hallados comúnmente en las escamas, principalmente productos de calcio como la hidroxiapatita. Esto se logró agitando magnéticamente dicho tejido en una solución de EDTA tetrasódico 0.5 M, a una relación escamas/solución de 1:10 (m/v), por 72 h. Se realizaron cambios de solución cada 24 h. Posteriormente, las escamas se mantuvieron en agitación magnética en una solución de EDTA disódico dihidratado 0.25 M, a una relación escamas/solución de 1:10 (m/v), por 48 h, con cambios de solución cada 24 h. Este paso se muestra en la Figura 2.3.



Figura 2.3. Descalcificación de escamas.

- Hidrólisis

El tejido recuperado del paso anterior se suspendió en una solución de ácido acético 0.5 M con pepsina al 1% (m/v), a una relación escamas/solución de 1:10 (m/v) y se dejó en agitación magnética durante 72 h. Posteriormente, se realizó una centrifugación utilizando una centrífuga marca Centurion Scientific modelo K241 a 1200 rpm y 4 °C durante 10 min. En este proceso (ilustrado en la Figura 2.4) se conservó el sobrenadante.



Figura 2.4. Pepsinización.

- Recuperación de colágena

Para poder obtener la CLG resultante de los procedimientos anteriores, el sobrenadante obtenido en el paso previo se precipitó mediante la adición de NaCl hasta obtener una solución 1 M, la cual se mantuvo en agitación magnética durante 24 h. Pasado este tiempo, el precipitado resultante se centrifugó a 6000 rpm y 4 °C durante 10 min, con lo cual se obtuvieron botones de CLG, los cuales se sometieron a un proceso de liofilización utilizando una liofilizadora marca Labconco modelo FreeZone 4.5 (ver Figura 2.5) a -53 °C y 0.02 mBar durante 96 h.



Figura 2.5. Liofilización.

Una vez obtenida la CLG liofilizada, ésta se disolvió en una solución de ácido acético 0.5 M y se dializó para remover residuos de NaCl provenientes del precipitado, así como de los telopéptidos generados durante la pepsinización. El proceso de diálisis se llevó a cabo en una membrana

marca Spectrum modelo Spectra/Por® 3 (MWCO de 3.5 kDa), utilizando como solución dializante agua destilada. Este paso se realizó con agitación magnética durante 48 h a 4 °C, con cambios de solución dializante cada 24 h. Finalmente, la CLG dializada se liofilizó por segunda ocasión y a las condiciones antes mencionadas para dicho proceso.

Teniendo en cuenta la CLG liofilizada obtenida después de dializar, se procedió a calcular el porcentaje de rendimiento mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = 100 \left(\frac{\text{masa seca de colágena}}{\text{masa seca de escamas limpias}} \right)$$

2.3. Caracterización fisicoquímica de la CLG extraída a partir de escamas de pez

Las propiedades fisicoquímicas de la CLG marina, obtenida a partir de escamas de pez, se evaluaron mediante espectroscopia FTIR-ATR, análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

- **Espectroscopia FTIR-ATR**

Se llevó a cabo una espectroscopia FTIR-ATR para identificar la estructura química de la CLG obtenida. Durante la espectroscopia FTIR, se irradió a la muestra con luz infrarroja. Cuando la frecuencia infrarroja coincidió con la frecuencia de vibración de un enlace, se generó una absorción en el infrarrojo. Por consiguiente, fue posible obtener información acerca de la estructura molecular de la CLG gracias a la luz infrarroja absorbida.

Esta espectroscopia se efectuó mediante la técnica de reflexión total atenuada (ATR). En esta variante, el espectro infrarrojo se obtiene del sustrato en contacto con elementos de reflexión interna (IRE) como el seleniuro de zinc [41].

Esta prueba se realizó utilizando un espectrómetro de infrarrojo marca Thermo Scientific modelo Nicolet 8700 (mostrado en la Figura 2.6), en el intervalo de 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹ y 100 barridos. La muestra analizada fue una pastilla de 3 mg de CLG dializada y liofilizada.



Figura 2.6. Espectrómetro de infrarrojo marca Thermo Scientific modelo Nicolet 8700.

- Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico es una prueba que permitió monitorear tanto la velocidad de degradación de la CLG como la pérdida de masa de ésta, en función de la temperatura. Para ello, se calentó la muestra a velocidad constante, hasta alcanzar una descomposición total [42].

Esta prueba se llevó a cabo mediante un analizador termogravimétrico marca Perkin Elmer modelo TGA 8000, mostrado en la Figura 2.7. El ensayo se realizó con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, en atmósfera de nitrógeno, en el intervalo de 50 °C a 650 °C. La muestra analizada consistió en 10 mg de CLG dializada y liofilizada previamente.



Figura 2.7. Analizador termogravimétrico marca Perkin Elmer modelo TGA 8000.

- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica mediante la cual se midieron los efectos caloríficos asociados con transiciones de fase y reacciones químicas, en función de la temperatura, en un programa dinámico. El principio físico de esta técnica supone la medición del flujo de calor a través de un material sujeto a un calentamiento o enfriamiento a una velocidad constante, lo que permite identificar las temperaturas para transiciones térmicas [42].

Esta prueba se llevó a cabo mediante un calorímetro diferencial de barrido marca Perkin Elmer modelo DSC 7, representado en la Figura 2.8. El ensayo se realizó con una rampa de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno, en el intervalo de 0 °C a 300 °C. Posteriormente, la muestra pasó por un proceso de enfriamiento y finalmente, se volvió a calentar a las condiciones antes mencionadas. La muestra analizada consistió en 10 mg de CLG dializada y liofilizada previamente.



Figura 2.8. Calorímetro diferencial de barrido marca Perkin Elmer modelo DSC 7.

2.4. Análisis proteicos de la CLG extraída a partir de escamas de pez

Se realizaron distintos estudios de proteína en la CLG extraída a partir de escamas de huachinango. Esto se hizo con el fin de medir tanto el contenido proteico como el peso molecular de la muestra.

- Cuantificación de proteína mediante la técnica de Bradford

Este análisis colorimétrico permitió determinar, de manera general, el contenido de proteína total [43] presente en las muestras provenientes de las escamas de *Lutjanus campechanus*.

Durante esta técnica, la curva estándar se formó utilizando albumina de suero bovino (BSA) como proteína de referencia, considerando 6 concentraciones que varían de 0.2 a 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína. A partir del polvo obtenido de CLG, se preparó una solución de 1 mg/mL, de la cual se tomaron 5 μL y se completaron con agua destilada y reactivo de Bradford. Todas las muestras, tanto de proteína estándar como de muestra de estudio, se prepararon por triplicado.

La lectura de absorbancias se realizó a 595 nm mediante un lector de placas multimodal marca BioTek modelo Cytation 3, como el de la Figura 2.9. Una vez realizadas las lecturas; se obtuvo la concentración de las muestras de estudio a partir de la ecuación de la recta generada por la gráfica.



Figura 2.9. Lector de placas multimodal marca BioTek modelo Cytation 3.

- Electroforesis

El peso molecular se determinó mediante electroforesis PAGE-SDS, utilizando una cámara de electroforesis marca Bio-Rad modelo Mini-Protean 3 Cell, (mostrada en la Figura 2.10) y un marcador de peso molecular de amplio rango marca Bio-Rad modelo Prestained SDS-PAGE standards broad range, como ha sido previamente reportado [44, 45]. La electroforesis SDS-

PAGE fue desarrollada usando un gel de separación de 8% y otro concentrador del 5%. 16 μg de proteína se mezclaron con 4 μL de reactivo de Laemmli, se llevó a ebullición durante 10 min y se dejó enfriar a 25 °C, posteriormente, la mezcla se cargó en el gel y fue sometida a electroforesis con voltaje constante (120 V); al término se retiró el gel de la cámara, se tiñó en una solución de azul de comassie R-250, y finalmente se destiñó con una solución de ácido acético al 10% (v/v), metanol al 40% (v/v) y agua destilada al 50% (v/v).



Figura 2.10. Cámara de electroforesis marca Bio-Rad modelo Mini Protean 3 Cell.

2.5. Fabricación de andamios electrohilados a base de CLG marina y AH, entrecruzados con glutaraldehído

- Preparación y electrohilado de disoluciones a electrohilar

Se elaboró una solución de CLG marina y AH al 9.5% (m/v), con una relación CLG:AH de 18:1 (m/m), utilizando como disolvente una mezcla de HFIP y ácido fórmico en una proporción 9:1 (v/v) [5]. De igual manera, como control se elaboraron andamios sin AH utilizando sólo HFIP como solvente.

Esta solución de CLG y AH en HFIP, se agitó magnéticamente durante 24 h como ha sido reportado [5]. Posterior a ese tiempo, ésta se retiró del agitador magnético y se procedió a la fase de electrohilado.

El electrohilado se realizó sobre un colector plano recubierto con doble capa (una de papel aluminio y otra de parafilm). El equipo utilizado fue una máquina de electrohilado marca TONGLI modelo TL 01 (el cual se observa en la Figura 2.11) acoplado con un regulador de flujo marca

New Era Pump Systems modelo NE-1000 (mostrado en la Figura 2.12). La solución elaborada previamente fue canalizada al regulador de flujo mediante una jeringa de 10 mL.



Figura 2.11. Máquina de electrohilado marca TONGLI modelo TL 01. En la parte frontal se encuentra el regulador de voltaje, amperaje, así como los botones de arranque y de la luz.



Figura 2.12. Regulador de flujo marca New Era Pump Systems modelo NE-1000.

- Entrecruzamiento de andamios

La estabilización mecánica estructural de los andamios se logró mediante la técnica de entrecruzamiento químico. Este procedimiento se realizó utilizando GTA como agente entrecruzante [46], considerando como tiempos de exposición 0 h (considerado como control) y 1 h.

Para entrecruzar los andamios por 1 h se realizaron los siguientes pasos: primero, los andamios se colocaron en un desecador junto con un vial que contenía 10 mL de una solución de GTA al 2.5% (v/v) en agua destilada. Posteriormente, se realizó un sellado al vacío en el desecador mediante una bomba marca KNF modelo UN811 KTP y se mantuvo a una temperatura de 25 °C. Pasado el tiempo de exposición, se abrió el desecador en una campana de extracción y se retiró el vial que contenía la solución de GTA. Luego, se tapó nuevamente el desecador y se aplicó vacío mediante la bomba durante 30 min, todo esto para remover vapores residuales del entrecruzante presente en los andamios. Finalmente, dichos tapetes se lavaron por goteo con agua destilada y se dejaron secar al aire durante 18 h.

2.6. Caracterización fisicoquímica de los andamios electrohilados

La determinación de las propiedades fisicoquímicas de los andamios electrohilados se llevó a cabo mediante espectroscopia FTIR-ATR, TGA y DSC bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para CLG. Adicionalmente, se realizó el análisis por microscopía óptica para analizar el diámetro y distribución de fibra de los andamios, y el ensayo de ninhidrina para estimar el grado de entrecruzamiento.

- Microscopía óptica

Se realizó la microscopía óptica sobre muestras electrohiladas para analizar la distribución de los agregados fibrilares, el diámetro de los mismos y la ausencia de cúmulos o protuberancias a nivel estructural; todo ello con el fin de determinar si la calidad, tanto de la solución como del electrohilado, era la adecuada. Este tipo de microscopía utiliza la luz visible en conjunto con un sistema de lentes para obtener imágenes ópticas magnificadas [41].

Para este análisis, primero se electrohiló sobre un portaobjetos durante 2 min. Posteriormente, se observó la muestra con una distancia óptica de trabajo de 5.35 mm mediante un microscopio óptico marca Labomed modelo TCM 400 acoplado a una cámara digital marca Labomed modelo iVu 5000 (este montaje se aprecia en la Figura 2.13). Dicho acoplamiento permitió fotografiar las muestras a nivel microscópico. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software CapturePro v2.8.8.5.



Figura 2.13. Microscopio óptico marca Labomed modelo TCM 400 acoplado a una cámara digital marca Labomed modelo iVu 5000.

- Ensayo de ninhidrina

Esta caracterización permitió medir el grado de entrecruzamiento de los andamios. Este método es implementado para determinar los grupos amina libres en las proteínas [47]. La técnica se desarrolló de la siguiente manera [48]: primero se preparó una solución etanólica de ninhidrina al 1.5% (m/v), la cual se agitó magnéticamente hasta obtener una solución uniforme. Posteriormente, se colocaron en viales 5 mg de los andamios y se les añadió 1 mL de la solución de ninhidrina. Estos viales se calentaron en baño maría a 80 °C durante 25 min (esto provoca que los grupos amina libres reaccionen y tiñan la solución con una tonalidad azul/púrpura). Terminado este tiempo, se dejaron enfriar durante 1 h a 25 °C. Luego, se le añadió 8 mL de agua destilada a la solución obtenida. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas multimodal marca BioTek modelo Cytation 3. Se hicieron 10 repeticiones para cada muestra.

Cabe destacar que la intensidad del color depende de la cantidad de grupos amina libres para la reacción; a mayor cantidad, el color será más intenso. Por ende, a mayor valor de absorbancia, menor será el grado de entrecruzamiento de la muestra [49].

Para calcular el grado de entrecruzamiento se utilizó la siguiente fórmula [48, 49]:

$$\text{Grado de entrecruzamiento (\%)} = 100 \left[1 - \frac{Abs_{Ent}}{Abs_{No}} \right]$$

Donde Abs_{Ent} representa la absorbancia de la muestra entrecruzada y Abs_{No} la absorbancia de la muestra sin entrecruzar.

Para realizar esta prueba, se consideraron 2 controles: uno correspondiente sólo al andamio de CLG y otro para el andamio con AH, ambos sin entrecruzar.

Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1. Extracción de CLG marina

Durante el proceso de extracción de la CLG, las escamas sufrieron distintas transformaciones como consecuencia de los procesos aplicados.

El lavado permitió remover residuos tisulares y componentes no proteicos del tejido en cuestión. De igual manera, el material obtenido resultó ser inodoro y blanquecino, muy distinto a las escamas frescas y sin lavar. En la Figura 3.1 se muestra el tejido en cuestión, posterior al lavado.



Figura 3.1. Escamas lavadas.

En la Figura 3.2 se observan las escamas, posterior al proceso de descalcificación. El tejido obtenido presenta una consistencia masosa y aglutinante, contraria a la estructura laminar y consistencia rígida presentes en las escamas frescas.



Figura 3.2. Escamas descalcificadas.

En la Figura 3.3 se ilustra un botón obtenido durante la centrifugación a 1200 rpm a 4 °C durante 10 min. Cabe destacar que esta muestra llama la atención ya que, a simple vista tiene la tonalidad presente en la CLG.



Figura 3.3. Botón obtenido en la centrifugación a 1200 rpm.

En la Figura 3.4 se presenta el botón recuperado en la centrifugación a 6000 rpm a 4 °C por 40 min, mientras que en la Figura 3.5 se aprecia la CLG obtenida en la liofilización final. De aquí se observa que el polvo obtenido cuenta con la coloración blanquecina, característica de dicha proteína.

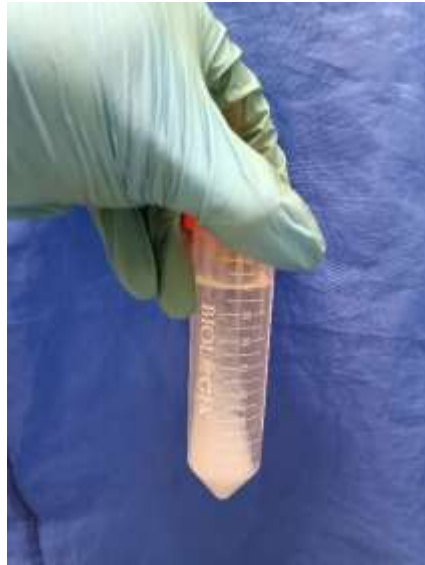


Figura 3.4. Botón obtenido durante la centrifugación a 6000 rpm.



Figura 3.5. Colágena dializada y liofilizada.

En la tabla 3.1 se presenta el porcentaje de rendimiento obtenido para las escamas de *Lutjanus campechanus*. Se observa que, posterior al tratamiento de diálisis, el rendimiento disminuye drásticamente. Esto puede deberse a que durante la diálisis se eliminaron partículas de NaCl y telopéptidos formados durante la adición de pepsina, los cuales contribuían al peso de la CLG antes de que ésta se purificara.

Sin embargo, el rendimiento obtenido para el tejido de esta especie (1.32%) es similar al reportado para las escamas de *Hypophthalmichthys nobilis* [40] y de *Hypophthalmichthys molitrix*

[50], con 1.1% y 1.45%, respectivamente. A pesar de obtener un rendimiento relativamente bajo, es posible observar que éste se encuentra en los valores esperados para esta clase de tejidos. No obstante, la CLG obtenida en el presente trabajo es estructuralmente distinta a las CLGs provenientes de tejidos con mejores rendimientos y, por ende, puede contar con propiedades biológicas distintas. Esto se verá más a detalle en la sección 3.2 de este documento.

Tabla 3.1. Porcentaje de rendimiento para escamas de *Lutjanus campechanus*.

	Escamas limpias	CLG antes de diálisis	CLG después de diálisis
Masa (g)	736.637	40.87	9.721
% de rendimiento	-	5.55	1.32

3.2. Rendimiento y pureza de la CLG extraída a partir de escamas de pez

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante la cuantificación proteica mediante la técnica de Bradford, así como en la electroforesis para la CLG liofilizada previamente dializada.

- Estimación del rendimiento en la extracción

El cálculo de la concentración de proteína presente en las muestras de interés se realizó interpolando en la curva estándar la diferencia entre la absorbancia de la muestra proveniente de *Lutjanus campechanus* y la de la muestra blanco.

Este análisis colorimétrico permitió identificar la cantidad de proteína total presente en las muestras provenientes de las escamas de *Lutjanus campechanus*, relacionando las absorbancias de las muestras con la concentración de proteína con la que cuentan éstas. En la Figura 3.6 se presenta la curva patrón utilizando BSA como proteína de referencia. Dicha curva presenta un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9127$, lo cual indica que el método es apropiado para la cuantificación.

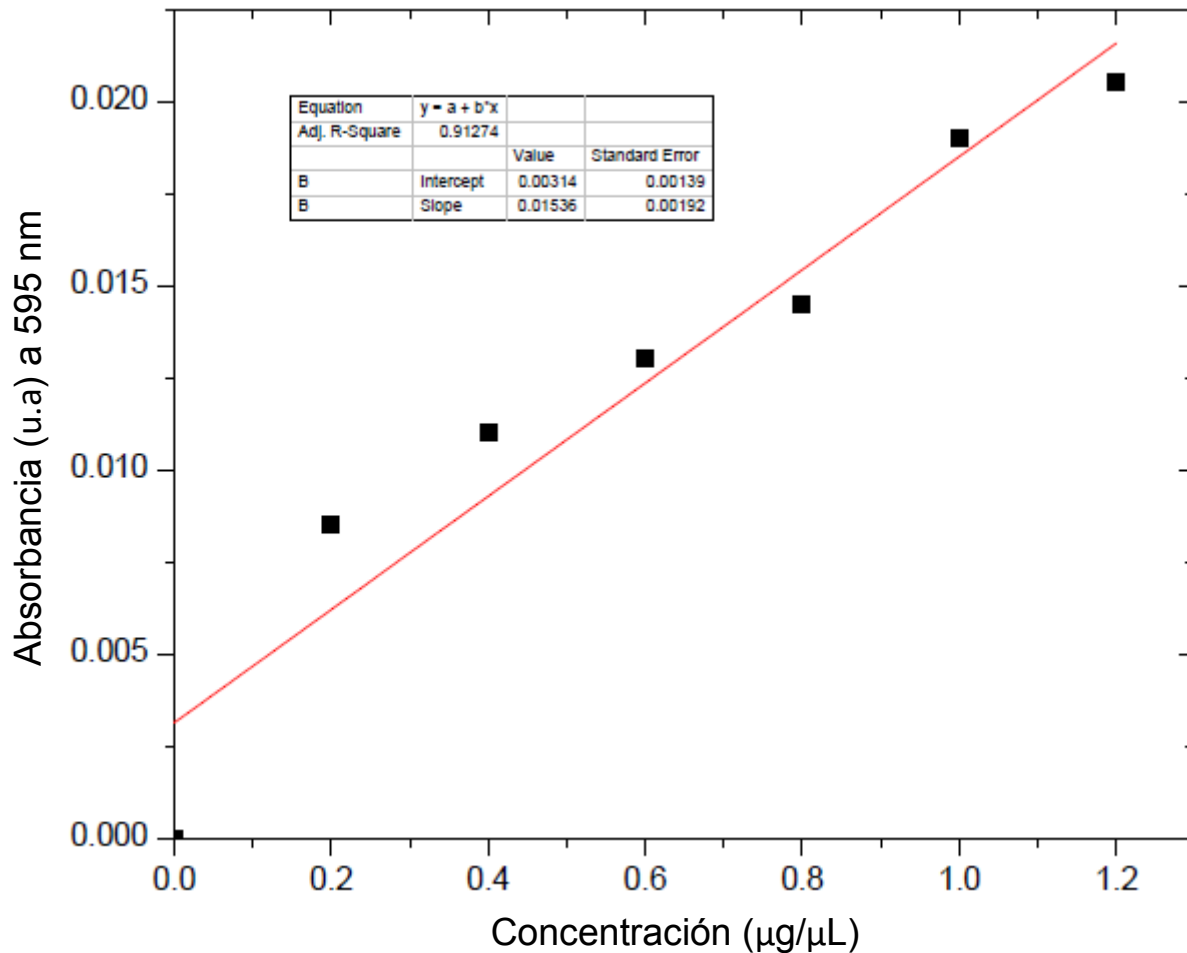


Figura 3.6. Curva patrón utilizando BSA como proteína de referencia.

Los resultados revelaron que la concentración proteica de la muestra de estudio fue de 0.68 µg/µL; a partir de lo cual se calculó un rendimiento de 13.6%. Dicho valor indica la cantidad porcentual de proteína presente en la CLG extraída mediante la metodología propuesta. Este resultado es similar al reportado para la CLG obtenida a partir de las escamas de *Cololabis saira* [43] y *Sciaenops ocellatus* [51], con 15% y 4.32%, respectivamente.

La pepsina, enzima ampliamente utilizada para extraer CLG, es capaz de escindir la proteína de sus telopéptidos. Sin embargo, en la literatura se reporta que esta digestión incompleta ocurre debido a que las moléculas de CLG, provenientes de escamas de pez, se encuentran altamente entrecruzadas mediante enlaces covalentes a través de una condensación del grupo aldehído con Lys e Hyl en la región telopéptida [51]. Por lo tanto, como es más complicado separar la CLG de sus telopéptidos si ésta se extrae de escamas, se obtiene un rendimiento proteico menor al presentado en tejidos blandos. Lo cual mejora al reprocesar las escamas no digeridas que resultan del proceso de pepsinización.

- Electroforesis

Este ensayo se realizó para determinar las estructuras terciarias presentes en la CLG extraída de escamas de *Lutjanus campechanus*. De igual manera, permitió estimar los pesos moleculares de éstas y evidenciar si el proceso utilizado para su obtención promueve degradación de la proteína y si la CLG coeluye con otras proteínas no colágenicas, lo cual nos hablaría de la pureza de la muestra.

En la Figura 3.7 se muestra el patrón electroforético de la CLG obtenida a partir de las escamas de *Lutjanus campechanus*. Se puede observar que esta proteína cuenta con 3 cadenas α , cada una con un peso molecular cercano a 101 kDa. De igual manera, la muestra analizada cuenta con unas estructuras a 125 kDa y 210 kDa. Asimismo, se nota la presencia de 2 bandas tenues entre 101 kDa y 56.2 kDa.

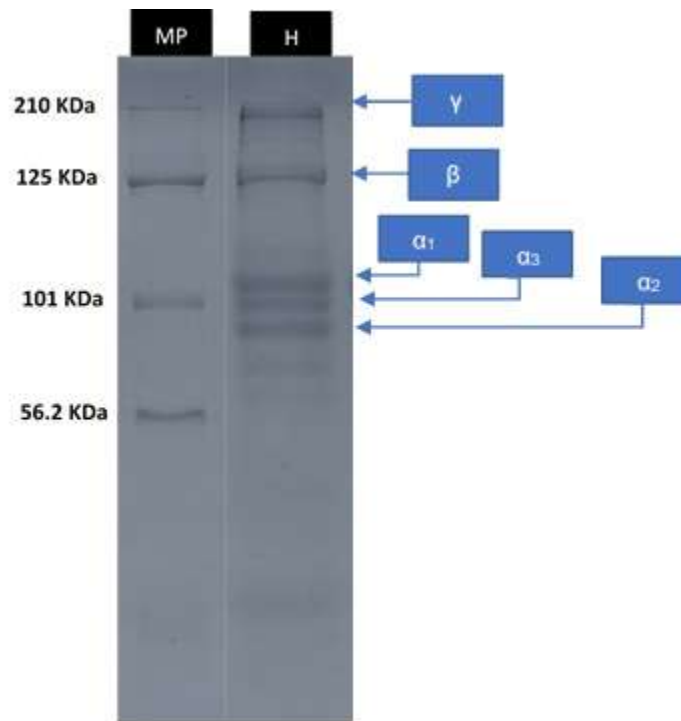


Figura 3.7. Perfil electroforético. MP corresponde al marcador de peso molecular. En H se encuentra la CLG proveniente de escamas de *Lutjanus campechanus*.

Las cadenas α pueden unirse entre sí mediante entrecruzamientos intramoleculares, dando como resultado unas estructuras denominadas β y γ . Las estructuras β corresponden a dímeros de cadenas α , mientras que las estructuras γ están conformadas por trímeros de dichas cadenas [52]. Ambas estructuras se han encontrado en CLGs extraídas de escamas de *Oreochromis*

niloticus [53], *Parupeneus heptacanthus* [54] y de *Ophiocephalus argus* [55]; así como en CLG de vejiga natatoria de *Thunnus albacares* [56]. En el caso de CLG obtenida de escamas de *Lutjanus campechanus*, dichas estructuras se observaron a 125 kDa y 210 kDa, respectivamente.

Por otro lado, algunas CLGs presentan componentes intermoleculares entrecruzados entre las cadenas α . Esto se ha observado para CLGs provenientes de escamas de *Sciaenops ocellatus* [51] y de *Oreochromis niloticus* [52]. En la CLG extraída de escamas de *Lutjanus campechanus*, estos componentes les corresponderían a las bandas tenues observadas por debajo de 101 kDa. De igual manera, se encontró que las cadenas α_1 de la CLG de huachinango mostraron pesos moleculares inferiores a los reportados en la literatura, puesto que dicho valor se registra a 116 kDa tanto para la CLG extraída de escamas de *Cololabris saira* [43] como para la de piel de *Priacanthus tayenus* [57]. No obstante, las cadenas α_2 son similares a las obtenidas de escamas de *Parupeneus heptacanthus* [54] y de *Ophiocephalus argus* [55], ya que en ambos casos dichas cadenas cuentan con un peso cercano a 97 kDa.

La presencia tanto de cadenas α de bajo peso molecular como de componentes intermoleculares puede deberse a que, durante el proceso de extracción enzimática, la CLG sufrió una ligera degradación causada por la pepsina. Sin embargo, como la pepsina sólo actuó en la región telopéptida, no se dañó la estructura general de la CLG [58].

Otro aspecto a destacar, es la aparición de 3 bandas cercanas a 101 kDa. Por lo general, la CLG tipo I está compuesta por 2 cadenas $\alpha_1(I)$ y una $\alpha_2(I)$. No obstante, se ha encontrado en peces teleósteos, como *Lutjanus campechanus*, la existencia de una cadena $\alpha_3(I)$, la cual cuenta con un peso molecular muy similar al de la cadena $\alpha_1(I)$, por lo que usualmente se traslapa con ésta durante una electroforesis [54, 55]. Debido a todo esto, es posible inferir que la CLG obtenida de escamas de *Lutjanus campechanus* corresponde a una CLG tipo I, pero conformada por el heterotrímero $\alpha_1(I)\alpha_2(I)\alpha_3(I)$, en lugar del heterotrímero conformado por 2 cadenas $\alpha_1(I)$ y 1 $\alpha_2(I)$, ampliamente distribuido, lo cual deberá ser confirmado mediante análisis confirmatorios, como la secuenciación de proteínas.

3.3 Propiedades fisicoquímicas de la CLG extraída a partir de escamas de pez

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en las pruebas de FTIR-ATR, TGA y DSC, para la CLG obtenida de escamas de pez.

- Espectroscopia FTIR-ATR

En la Figura 3.8 se presenta el espectro infrarrojo de la CLG obtenida de las escamas de *Lutjanus campechanus*. Sus picos principales se muestran en la tabla 3.2.

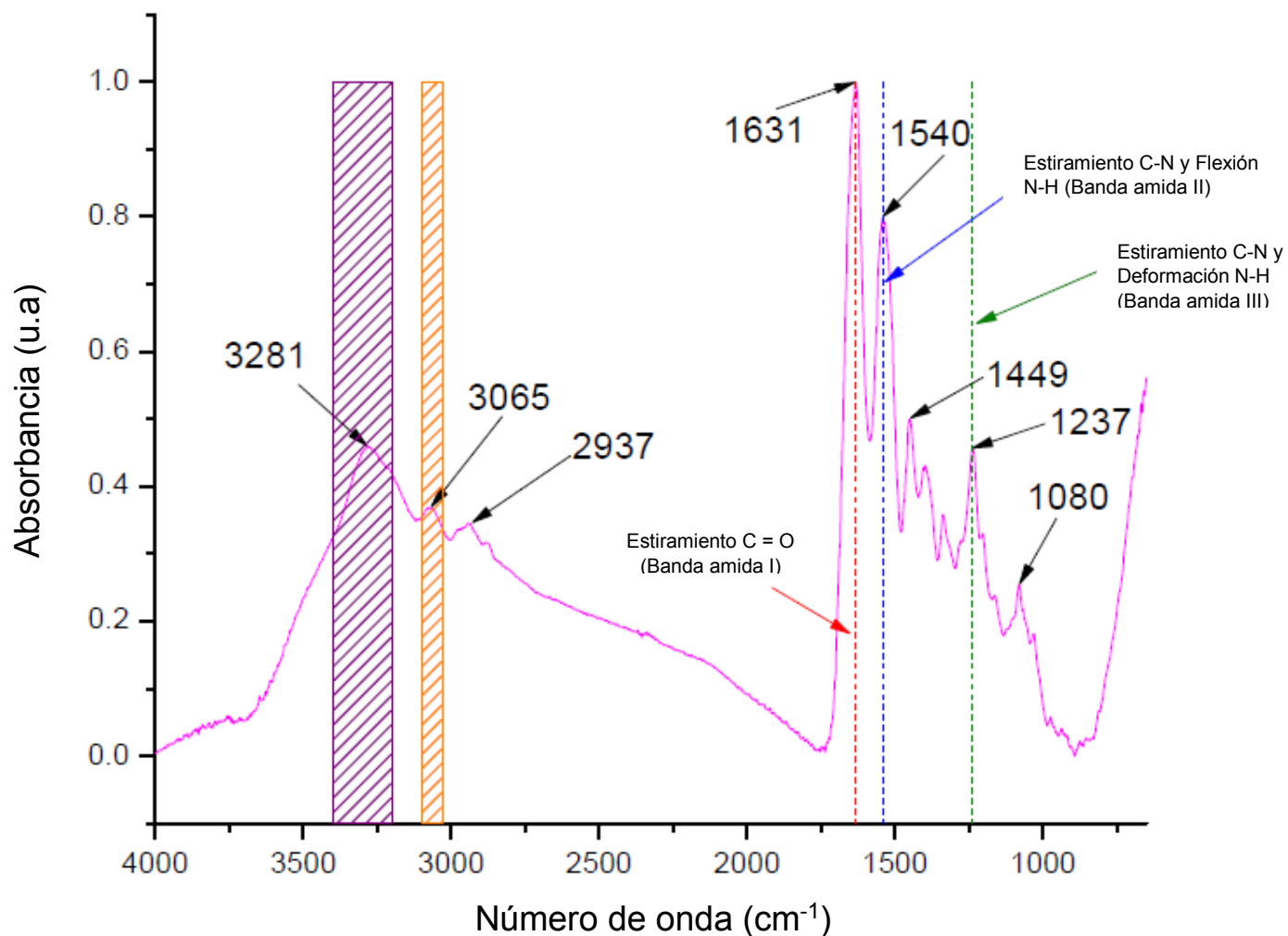


Figura 3.8. Espectro infrarrojo de colágena obtenida de escamas de *Lutjanus campechanus*.

Tabla 3.2. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo de la colágena obtenida de escamas [40, 59, 60].

Pico experimental (cm ⁻¹)	Pico reportado en la literatura (cm ⁻¹)	Tipo de enlace
3281	3310-3270	Estiramiento N-H (banda amida A)
3065	3100-3030	Estiramiento N-H (banda amida B)
2937	2935-2925	Estiramiento asimétrico de C-H
1631	1660-1630	Estiramiento C = O (banda amida I)
1540	1550-1535	Estiramiento C-N y Flexión N-H (banda amida II)

1449	1460-1440	Flexión C-H
1237	1320-1220	Estiramiento C-N y Deformación N-H (banda amida III)
1080	1060	Estiramiento C-O

Los picos de la CLG obtenida a partir de escamas de *Lutjanus campechanus* se asemeja a los picos característicos para CLGs y sus equivalentes desnaturalizados, reportados en la literatura [40, 59, 60].

Los enlaces peptídicos presentan ciertas bandas características en el espectro de absorción, las cuales se denominan amida A, B, I, II, III, IV, V, VI y VII [61]. En el caso concreto de las bandas características denominadas amidas I, II y III; se encuentran asociadas a la configuración de la CLG. El estiramiento C=O, relacionado con la banda amida I y encontrado entre 1700 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} , es un marcador sensible de la estructura secundaria del péptido. Por otro lado, el estiramiento C-N y la flexión N-H, ligados a la banda amida II y hallados entre 1600 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} , sugieren la existencia de enlaces de hidrógeno; mientras que el estiramiento C-N y la deformación N-H, relacionados con la banda amida III y ubicados entre 1320 cm^{-1} y 1220 cm^{-1} , indican que posiblemente se mantuvo intacta la triple hélice, característica de esta proteína [40].

- Análisis termogravimétrico (TGA)

Este estudio se llevó a cabo para identificar los procesos degradativos y las temperaturas máximas en donde ocurren estos fenómenos. En la Figura 3.9 se presenta el termograma, tanto de la pérdida de masa (TGA) (en color negro), como el de la primera derivada (DTGA), en color azul, de la muestra. Esta última curva se graficó para identificar de mejor manera las temperaturas de interés. En la tabla 3.3 se muestran dichas temperaturas y el porcentaje de masa perdida durante cada proceso.

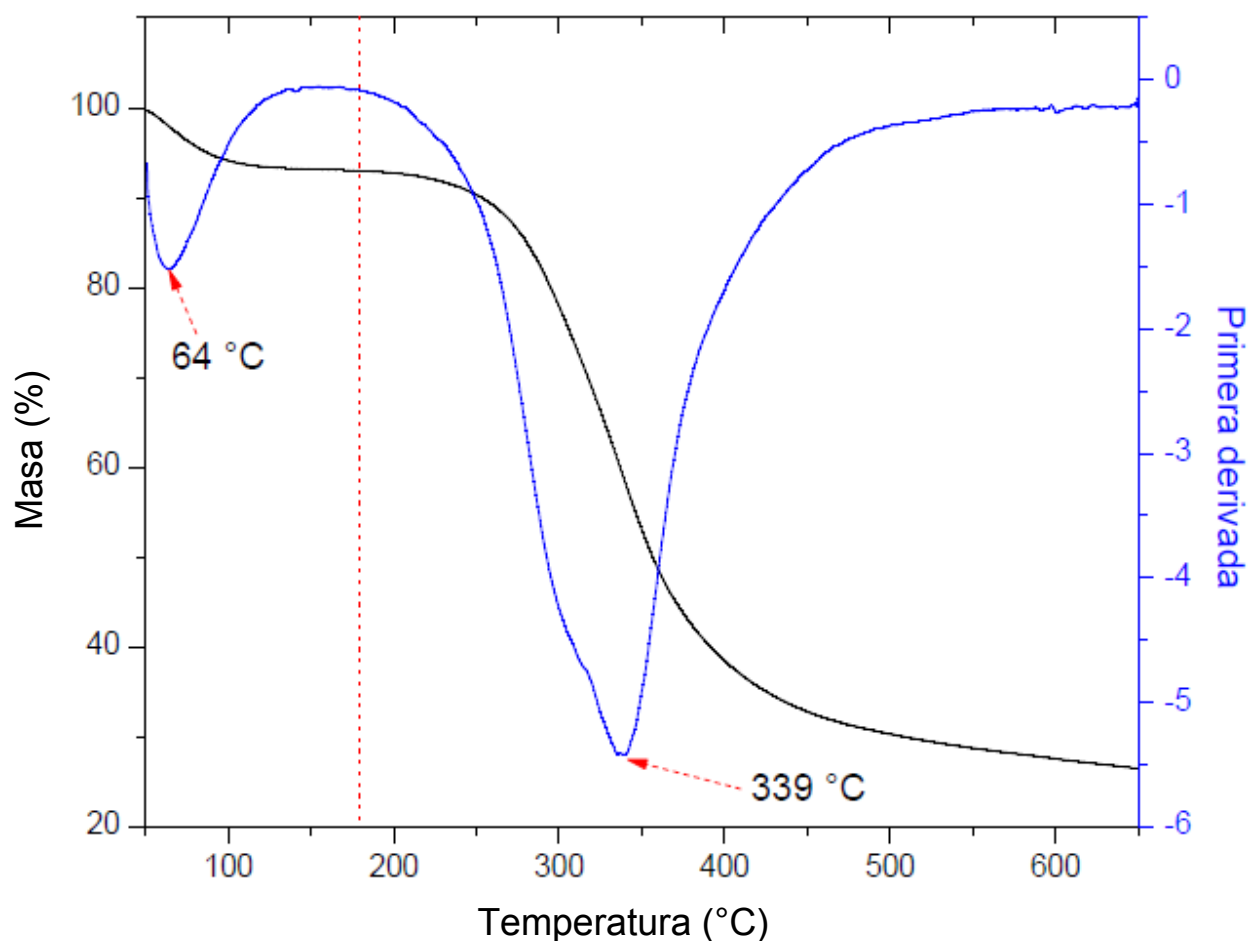


Figura 3.9. TGA y DTGA de la colágena obtenida de escamas de *Lutjanus campechanus*.

En esta prueba se encontró que la CLG marina se degrada en dos pasos; el primero de ellos tiene un máximo a 64 °C y corresponde a una pérdida del 7%, relacionada a la pérdida del agua absorbida durante el proceso de obtención [22].

En el siguiente proceso degradativo, el cual presenta un valor máximo a 339 °C, ocurre una pérdida del 66.5%. Este fenómeno es atribuido principalmente a la pérdida tanto de la estructura de la CLG como de aminoácidos presentes en ésta (metionina, tirosina, arginina, lisina, serina, treonina, entre otros). Debido a esto, se generan moléculas de bajo peso molecular, tales como H₂O, NH₃, CO₂, H₂S y SO₂ [22].

Tabla 3.3. Procesos degradativos de la CLG extraída de escamas de *Lutjanus campechanus*.

Temperatura máxima (°C)	Masa perdida (%)	Proceso de degradación asociado
64	7	Pérdida de agua
339	66.5	Pérdida estructural y de aminoácidos

A 650 °C, se observa que existe un 26.5% de la masa original. Sin embargo, dicho remanente proviene de la carbonización de la muestra. Este resultado es similar al reportado para andamios elaborados mediante CLG de organismo marinos como la medusa [6].

- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Esta prueba permitió identificar los procesos endotérmicos y exotérmicos que ocurren en la proteína de interés. En la Figura 3.10 se observa el termograma DSC para la CLG obtenida en este trabajo.

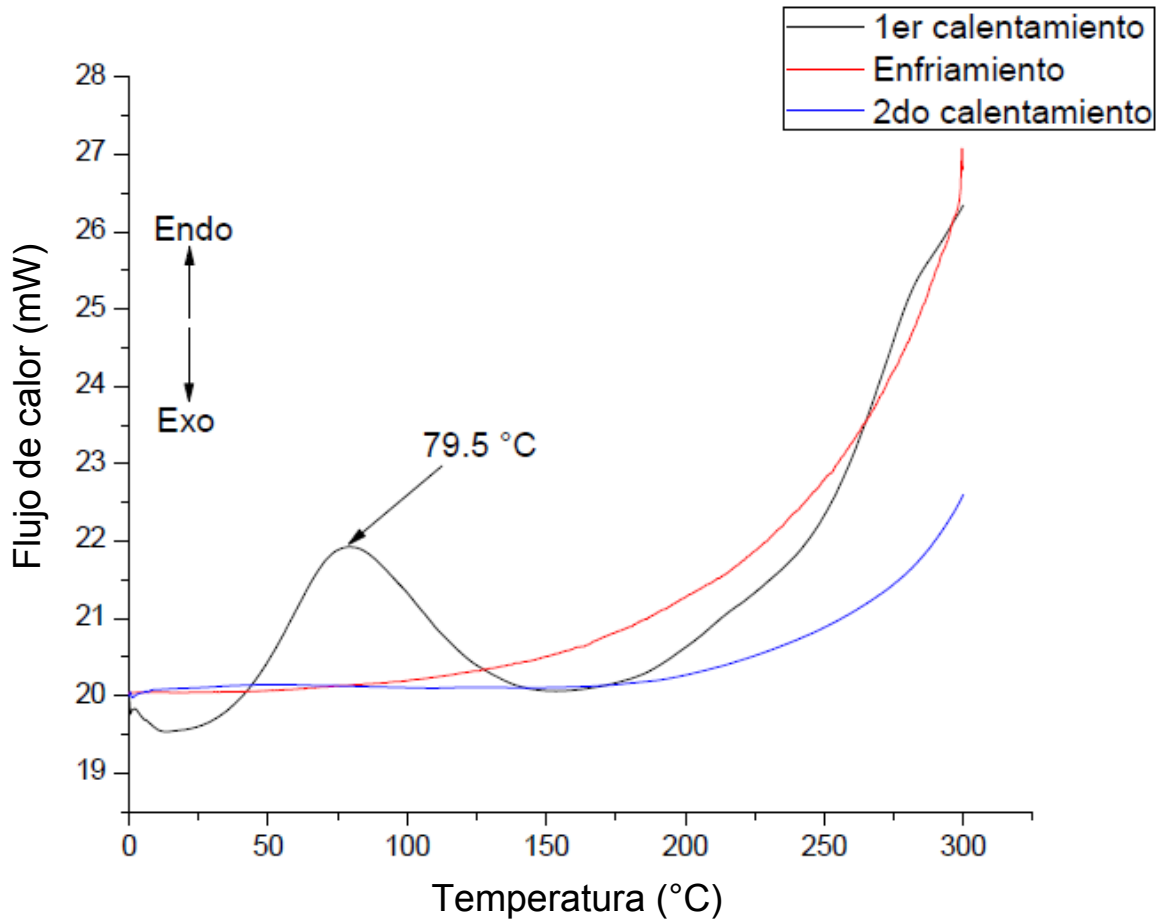


Figura 3.10. Termograma de DSC de la colágena obtenida de escamas de *Lutjanus campechanus*.

En la figura 3.10 se observa que el experimento se realizó con una corrida de calentamiento, seguida por un enfriamiento y, posteriormente, una segunda corrida de calentamiento. En la primera de ellas, la CLG presentó un pico endotérmico a 79.5 °C, el cual corresponde a la temperatura de desnaturalización de la CLG hidratada nativa. A pesar de que no se observa otro pico endotérmico, de acuerdo con la literatura también se presenta una temperatura de transición

asociada a la evaporación de agua residual, unida a la CLG mediante puentes de hidrógeno [62]. En el caso de esta muestra, es posible que este fenómeno esté traslapado con el proceso de desnaturalización a 79.5 °C. Durante dicho fenómeno ocurre la gelatinización de la CLG, la cual es causada por diversos cambios conformacionales relacionados con la ruptura de entrecruzamientos presentes a nivel intermolecular, como la glucosilación no enzimática de residuos de lisina e hidroxilisina; y a escala intramolecular como los puentes disulfuro [62].

Se sabe que los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares, así como el agua unida mediante dichos enlaces son responsables de la estabilidad de la estructura triple helicoidal presente en la CLG, por lo que los cambios parciales en la estructura secundaria de esta proteína son precedidos tanto por la ruptura de dichos enlaces durante el calentamiento como por la consecuente liberación de agua [63].

En la segunda corrida de calentamiento, este pico endotérmico no se forma, ya que la estructura de la proteína se encuentra escindida debido al primer proceso térmico [22]. Esto comprueba que la transición de CLG a gelatina es un proceso irreversible [64].

3.4. Fabricación de andamios electrohilados a base de CLG marina y AH, entrecruzados con glutaraldehído

- Preparación y electrohilado de disoluciones de CLG-AH

Para la estandarización del electrohilado, primero se probaron con distintos sistemas de solventes (ver Anexo A). Se encontró que el adecuado para preparar una solución de CLG marina y AH al 9.5% (m/v), con relación CLG:AH de 18:1, es el conformado por HFIP y ácido fórmico [5]. Sin embargo, a diferencia de lo mencionado en la literatura (relación HFIP/ácido fórmico de 7:3), la mezcla de HFIP/ácido fórmico fue de 9:1 (v/v).

Debido a que en investigaciones previas se reporta que el HFIP es un solvente idóneo para CLG [65, 66], se preparó una solución de CLG al 9% en HFIP. Esto se hizo para ver el efecto que tiene la ausencia del AH.

Es importante mencionar que, además de estandarizar la solución a electrohilar, también fue necesario hacerlo con los parámetros de electrohilado (ver Anexo B). Para ello, se probaron las condiciones reportadas en investigaciones previas (velocidad de flujo igual a 2.54 ml/h, voltaje a 23 kV, distancia de trabajo de 10 cm) [5]. Sin embargo, no se lograba generar adecuadamente un andamio en el colector plano. Esto pudo deberse a las condiciones ambientales al momento

de electrohilar, ya que la humedad afecta las condiciones de electrohilado como ha sido reportado por Bhardwaj [33].

Después de experimentar con los distintos parámetros de electrohilado, se pudo obtener un andamio fibroso con los parámetros que se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Parámetros de electrohilado durante la elaboración de andamios a base de CLG marina y AH.

Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/h)	Distancia de trabajo (cm)	Diámetro interno de la aguja (mm)
21.45	0.3	13	1.15

Para el caso de la CLG, se encontró que es posible generar fibras electrohiladas, relativamente homogéneas y libres de cúmulos o “perlas” entre las fibras, con los parámetros que se reportan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Parámetros de electrohilado durante la elaboración de andamios a base de CLG marina.

Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/h)	Distancia de trabajo (cm)	Diámetro interno de la aguja (mm)
20	0.2	15	0.90

En la Figura 3.11 se muestran tanto la estructura macroscópica de un andamio electrohilado a base de CLG marina y AH (andamio CLG-AH), como la correspondiente para el andamio de CLG electrohilada (andamio CLG). En ambos casos, se aprecian estructuras de aproximadamente 9 cm² (3 cm x 3 cm), las cuales presentan una coloración blanquecina, la cual dista del tono de la solución a electrohilar. Esto puede deberse a que durante el electrohilado se genera una fuerza cortante, la cual ordena las cadenas del polímero pasando así, a un estado de solidificación debido a la rápida evaporación del solvente [32].

No obstante, el andamio obtenido exclusivamente de CLG presenta una textura fibrosa, mientras que el elaborado con CLG y AH cuenta con una superficie más lisa.

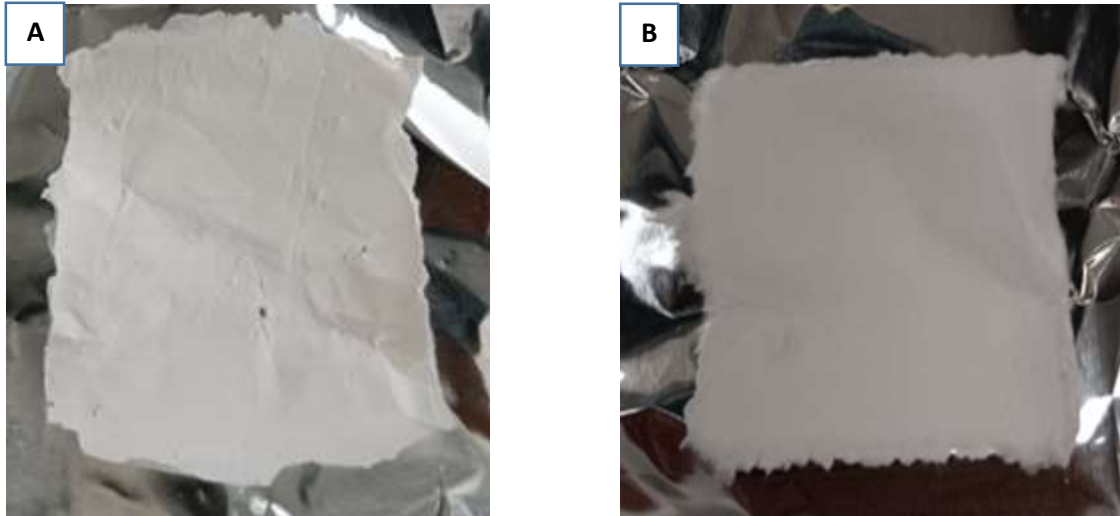


Figura 3.11. Estructura macroscópica de los andamios electrohilados. (A) andamio CLG-AH. (B) andamio CLG.

- Entrecruzamiento de andamios

Para el entrecruzamiento se consideró una inmersión en EDC-NHS 5 mM (ver Anexo C) o bien, un tratamiento entrecruzante con vapor de GTA al 2.5% (m/v), siendo este último el que permitió reforzar los andamios sin que éstos pierdan la consistencia adecuada para el tejido de interés. Durante este proceso se observó un cambio de coloración, tanto en los andamios que contienen AH como en aquellos que no. Se observó que, en ambos casos, el tono blanquecino y opaco se tornó en un color amarillo ocre. Esto está relacionado con la formación de enlaces imina entre los grupos carboxilo del GTA y los grupos amina presentes en la CLG y el AH [67].

En la Figura 3.12 se presentan los andamios entrecruzados a 1 h. En la imagen se puede observar que los andamios presentan cierta deformación con respecto a los presentados en la Figura 3.11, los cuales no estuvieron en contacto con el agente entrecruzante. Este cambio morfológico es consecuencia del lavado con agua destilada en los andamios después del entrecruzamiento. De igual manera, los que fueron sometidos al tratamiento entrecruzante muestran cambios en su tamaño, ya que posterior a todo el tratamiento, los andamios tuvieron aproximadamente $\frac{1}{4}$ de su área original.

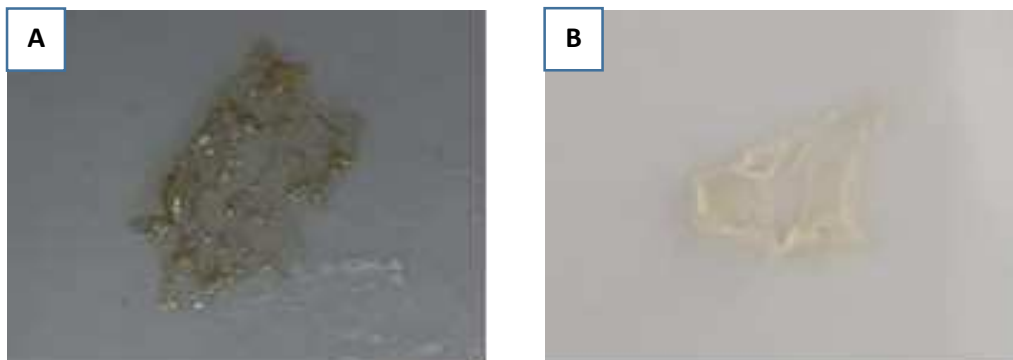


Figura 3.12. Andamios sometidos a un tratamiento entrecruzante con GTA durante 1 h y lavados con agua destilada. (A) andamio CLG-AH-GTA. (B) andamio CLG-GTA.

Asimismo, se pudo observar que el entrecruzamiento no ocurrió uniformemente en los andamios, ya que el tono amarillento es más intenso en el borde del andamio y en algunas rugosidades en comparación con el centro. Esto pudo deberse a las características superficiales del montaje empleado para colocar los andamios durante el tratamiento entrecruzante, ya que éstas pudieron haber hecho que el vapor de GTA no se distribuyera homogéneamente en el andamio electrohilado. Otro punto a destacar es que el andamio con AH presenta una apariencia casi translúcida posterior al contacto con el agua destilada.

3.5. Propiedades fisicoquímicas de los andamios entrecruzados

- Microestructura

Mediante microscopía óptica en campo claro se determinó la calidad cualitativa tanto de los electrohilados como de las soluciones utilizadas para éstos, ya que puso de manifiesto la estructura micrométrica de los agregados fibrilares. En la Figura 3.13 se reporta la microestructura observada durante el electrohilado bajo las condiciones mencionadas en la sección 3.4. La fotografía fue tomada con una distancia óptica de trabajo de 5.35 mm utilizando el software CapturePro v2.8.8.5.

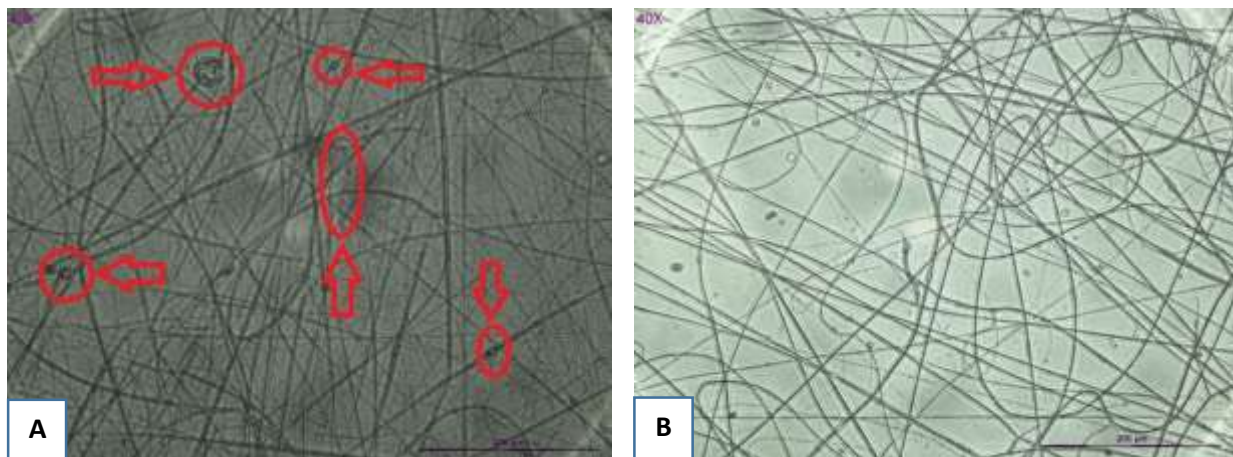


Figura 3.13. Agregados fibrilares electrohilados. (A) andamio CLG-AH. (B) andamio CLG. Las perlas presentes en el andamio CLG-AH se encuentran encerradas y marcadas con flechas.

Como se puede observar en las imágenes anteriores, la presencia del AH en la solución a electrohilar genera cúmulos o perlas entre las fibras. Esto puede deberse a que fue necesario recurrir a una mezcla de solventes para poder electrohilar CLG y AH. En la literatura se menciona que la CLG es soluble en HFIP, mientras que el AH lo es en el ácido fórmico, lo cual se corroboró experimentalmente. Se probaron varias proporciones de solventes y se utilizó la que generó menos perlas en la microestructura. Posiblemente aún haya que modificar la proporción de HFIP y ácido fórmico para obtener mejores resultados o bien, estas perlas sean producto de la humedad ambiental al momento de electrohilar. Cabe destacar que, en otros trabajos usando sistemas de solventes similares, no se reportan fotografías inmediatas al electrohilado, por lo que se desconoce si existe la presencia de cúmulos entre las fibras. En la literatura se reporta que es posible electrohilar CLG y AH mediante un sistema simultáneo de doble fuente, obteniendo fibras sin perlas [68].

Se puede apreciar algunos cúmulos en el electrohilado de sólo CLG, pero éstos desaparecen a medida que el tejido se vuelve más denso.

Adicionalmente, se realizaron mediciones para determinar el diámetro promedio de las fibras para ambas muestras. Estos resultados se muestran en la Figura 3.14.

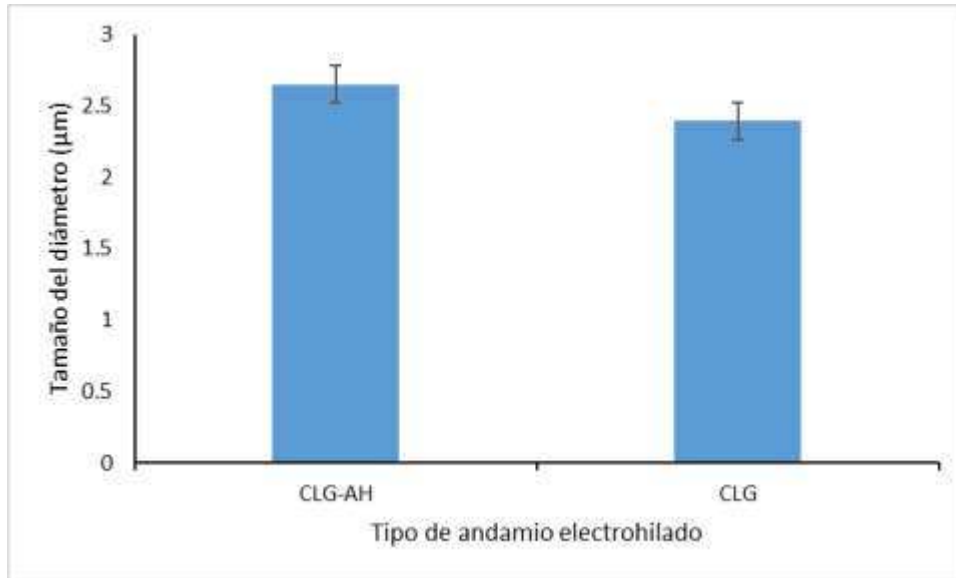


Figura 3.14. Relación entre los diámetros promedio de las fibras electrohiladas y el tipo de solución utilizada. Las líneas sobre las barras representan el error típico en cada muestra (n = 15).

Se encontró que el diámetro de los agregados fibrilares de CLG-AH mide, en promedio, $2.650 \pm 0.639 \mu\text{m}$. Por otro lado, los agregados fibrilares formados exclusivamente de CLG cuentan con un diámetro promedio de $2.391 \pm 0.338 \mu\text{m}$. Asimismo, se halló que no existe diferencia significativa entre el promedio de ambas muestras, considerando una prueba t de Student para muestras independientes y varianzas desiguales, con un nivel de significancia de 0.05.

De los resultados anteriores se puede inferir que la formación de los cúmulos entre las fibras no influye en la variación del diámetro promedio de los agregados fibrilares, a pesar de que el andamio CLG-AH cuente tanto con un error como con una desviación estándar mayores que el andamio compuesto por sólo CLG.

- Estructura química de los andamios

El FTIR-ATR permitió identificar químicamente la estructura de los andamios electrohilados y, de igual manera, verificar si se generaron nuevos enlaces químicos debido a la adición del AH y/o al tratamiento entrecruzante. En la Figura 3.15 se presenta el espectro infrarrojo de los andamios electrohilados. Sus picos principales se muestran en la tabla 3.6.

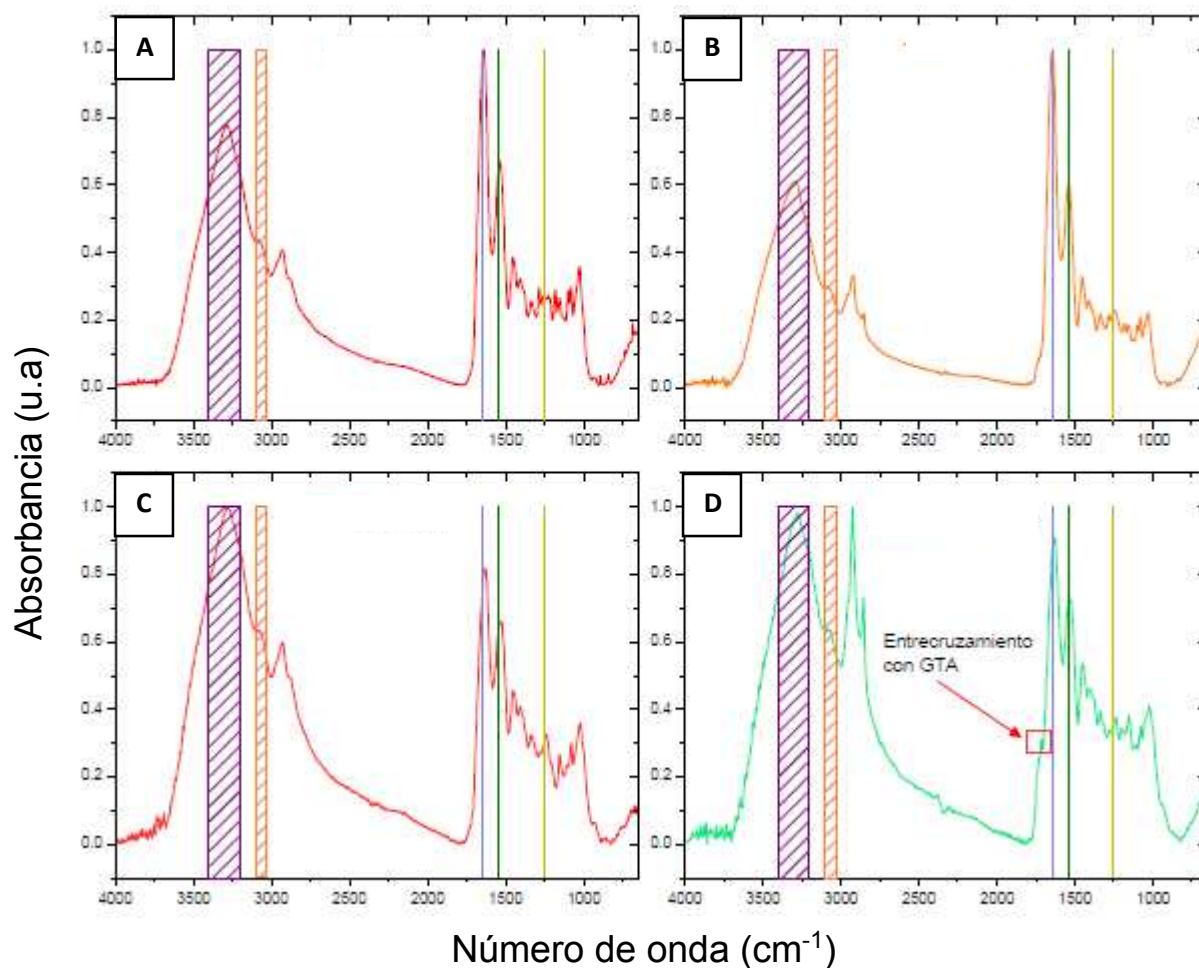


Figura 3.15. Espectro infrarrojo de los andamios electrohilados. (A) andamio CLG. (B) andamio CLG-AH. (C) andamio CLG-GTA. (D) andamio CLG-AH-GTA.

Tabla 3.6. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo de los andamios electrohilados [40, 60, 69, 70].

Pico CLG (cm ⁻¹)	Pico CLG-GTA (cm ⁻¹)	Pico CLG-AH (cm ⁻¹)	Pico CLG-AH-GTA (cm ⁻¹)	Pico según referencia (cm ⁻¹)	Tipo de enlace
3279	3274	3298	3277	3310-3270	Estiramiento N-H (banda amida A)
3085	3094	3082	3064	3100-3030	Estiramiento N-H (banda amida B)
2928	2930	2923	2924	2935-2925	Estiramiento asimétrico C-H
2881	2883	2851	2855	2870-2850	Estiramiento simétrico C-H

1639	1629	1644	1627	1660-1630	Estiramiento C=O (banda amida I)
1540	1529	1540	1541	1550-1535	Estiramiento C-N y Flexión N-H (banda amida II)
1453	1456	1455	1453	1460-1440	Flexión C-H
1408	1406	1408	1405	1391-1375	Deformación simétrica C-H ₃
1335	1336	1338	1337	1340-1310	Meneo C-H ₂
1284	1237	1285, 1243	1237	1320-1220	Estiramiento C-N y deformación N-H (banda amida III)
1181, 1154	1154	1182, 1155	1152	1170	Flexión asimétrica C-O-C
1080, 1100	1079	1081, 1100	1077	1082-1075	Vibración C-O de grupos hidroxilo
1027	1022	1030	1023	1038-1022	Estiramiento C-N (para amina primaria)

Se observa que en todos los andamios se tiene la presencia de las bandas características de la CLG. De acuerdo a la Figura 3.15, se observa que no hay cambios significativos entre los andamios sin y con AH, salvo un ligero corrimiento en los picos relacionados al estiramiento C=O (banda amida I) y al estiramiento C-N y deformación N-H (banda amida III). Esto puede deberse a la interacción entre los grupos amina de la CLG y los grupos aldehído del AH [13]. De igual manera, se puede notar que en el andamio de sólo CLG se aprecia que la banda característica que corresponde al estiramiento C=O (banda amida I) reduce su tamaño después del entrecruzamiento, incrementándose así, la banda característica asociada al estiramiento N-H (banda amida A). Un fenómeno similar ocurre entre los andamios CLG-AH y CLG-AH-GTA. Esto es un indicio de que la estructura secundaria del polímero está perdiendo libertad de movimiento debido al entrecruzamiento.

Por otra parte, la reacción de entrecruzamiento entre la CLG y el AH con el GTA tiene lugar mediante la formación de enlaces covalentes imina por medio de una reacción de Schiff, entre los grupos amina de la CLG y el AH con los grupos aldehído del entrecruzante. Este pico se reporta entre 1590 cm⁻¹ y 1690 cm⁻¹ [67, 71]. En el caso del andamio CLG-GTA, no se aprecia un cambio significativo en dicho intervalo, lo cual podría ser un indicio de un traslape con la banda característica de la amida I a 1629 cm⁻¹. En cuanto al andamio CLG-AH-GTA, éste presenta un

ligero pico a 1714 cm^{-1} (señalado con la flecha roja en la Figura 3.15) que podría estar atribuido a dicho enlace. En ambos casos, se sugiere el uso de una técnica más sensible, como la resonancia magnética nuclear del protón ($^1\text{H-RMN}$), para confirmar el entrecruzamiento.

- Propiedades térmicas del andamio

El TGA permitió determinar los procesos de degradación térmica, con sus respectivas temperaturas máximas, que experimentan los andamios electrohilados. En la Figura 3.16 se presenta el termograma tanto de la pérdida de masa (TGA) (en color negro), como el de la primera derivada (DTGA), en color azul, de los andamios elaborados. Este último gráfico sirvió para determinar las temperaturas máximas de cada proceso degradativo.

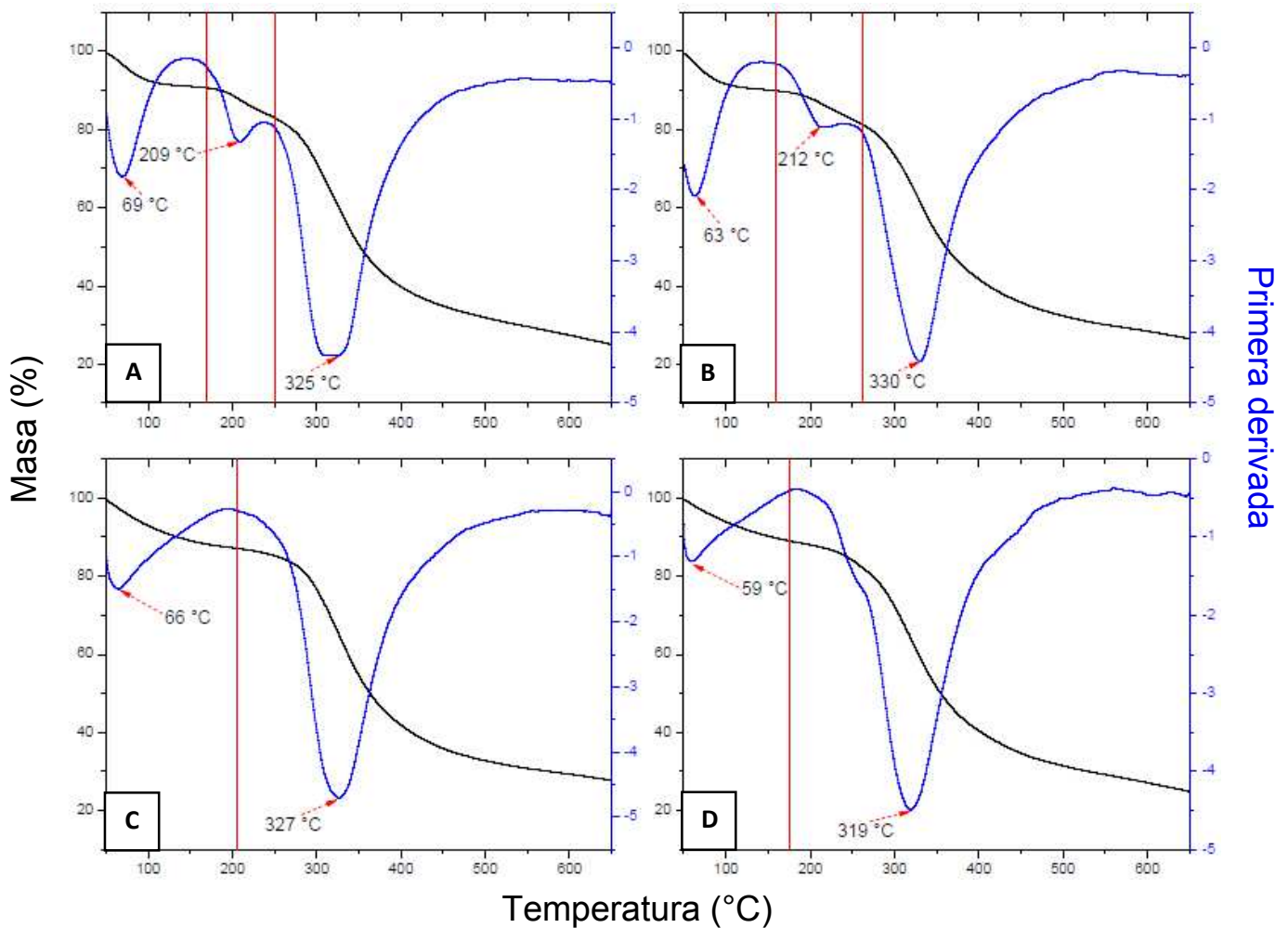


Figura 3.16. TGA y DTGA de los andamios electrohilados. (A) andamio CLG. (B) andamio CLG-AH. (C) andamio CLG-GTA. (D) andamio CLG-AH-GTA.

En la tabla 3.7 se muestran dichas temperaturas para cada andamio. Adicionalmente, la tabla 3.8 expresa el porcentaje de masa perdida de los andamios durante los procesos de degradación.

Tabla 3.7. Temperaturas máximas de degradación para los andamios.

Temperatura máxima (°C)	Tipo de andamio				Proceso degradativo
	CLG	CLG-GTA	CLG-AH	CLG-AH-GTA	
69	66	63	59	Pérdida de agua	
209	-	212	-	Pérdida estructural y de aminoácidos	
325	327	330	319		

Tabla 3.8. Porcentaje de pérdida de masa para los andamios.

Masa perdida (%)	Tipo de andamio				Proceso degradativo
	CLG	CLG-GTA	CLG-AH	CLG-AH-GTA	
9	13	10	11	Pérdida de agua	
8	-	9	-	Pérdida estructural y de aminoácidos	
58	59.2	54.4	64		

De la Figura 3.16 puede observarse que no hay cambios significativos debido a la adición de AH en el andamio electrohilado de CLG, ya que ambas muestras presentan como primer fenómeno de degradación, la pérdida de agua absorbida físicamente [22, 72]. Este fenómeno tiene su temperatura máxima a 69 °C para el andamio de CLG, mientras que en su variante con AH es a 63 °C, con pérdidas de masa de 9% y 10%, respectivamente. De aquí, se puede apreciar que el andamio con AH ligeramente contiene mayor cantidad de agua obtenida del medioambiente. Esto está relacionado a la alta capacidad hidrofílica que tiene este polímero. El siguiente proceso degradativo que tiene lugar, ocurre por la pérdida estructural y de aminoácidos generando con ello, moléculas volátiles de bajo peso molecular [22, 73]. Este fenómeno ocurre en 2 procesos térmicos, tanto en el andamio de CLG como en el de CLG-AH, teniendo mayores temperaturas máximas en el andamio CLG-AH. Sin embargo, el andamio de sólo CLG es más sensible a esta degradación térmica, ya que durante este proceso pierde un 66% de masa, mientras que en el andamio de CLG-AH esta pérdida corresponde al 63.4% de la masa original.

Por otra parte, se observa que el andamio de CLG adquiere cierta estabilidad térmica cuando se entrecruza con GTA, aunque el andamio entrecruzado pareciera contener mayor cantidad de agua del medioambiente, perdiendo ésta a una menor temperatura máxima que su contraparte

sin entrecruzar. Sin embargo, la pérdida estructural y de aminoácidos ocurre en un solo paso, a mayor temperatura máxima y se reduce en menor cantidad la masa original durante este fenómeno térmico de degradación, puesto que se pierde 59.2%, comparado con el 66% del andamio de sólo CLG.

Un fenómeno similar ocurre entre los andamios CLG-AH y CLG-AH-GTA, ya que éste último retiene más agua absorbida físicamente que el andamio CLG-AH, mientras que la pierde a una temperatura máxima menor. De igual manera se aprecia que, con el entrecruzamiento, la pérdida estructural se reduce a un paso. Sin embargo, este último proceso de degradación ocurre con una menor temperatura máxima y una pérdida de masa ligeramente mayor que en los andamios sin entrecruzar, puesto que el andamio CLG-AH pierde 63.4% de la masa original a un máximo de 330 °C, mientras que el andamio CLG-AH-GTA tiene una pérdida del 64% de la masa original a un máximo de 319 °C.

Una vez terminados todos los procesos pirolíticos, todos los andamios conservaron entre un 25% y 27.8% de la masa original. Estos remanentes son resultado de la carbonización de las muestras.

Por otro lado, el DSC permitió identificar los procesos endotérmicos y exotérmicos que influyen en la estructura de los andamios electrohilados. En la Figura 3.17 se observa el termograma DSC para los andamios electrohilados. En esta gráfica sólo se muestra el primer calentamiento.

Cabe destacar que se corrió un segundo calentamiento para los andamios entrecruzados. En la Figura 3.18 se presenta el termograma DSC completo para dichos andamios.

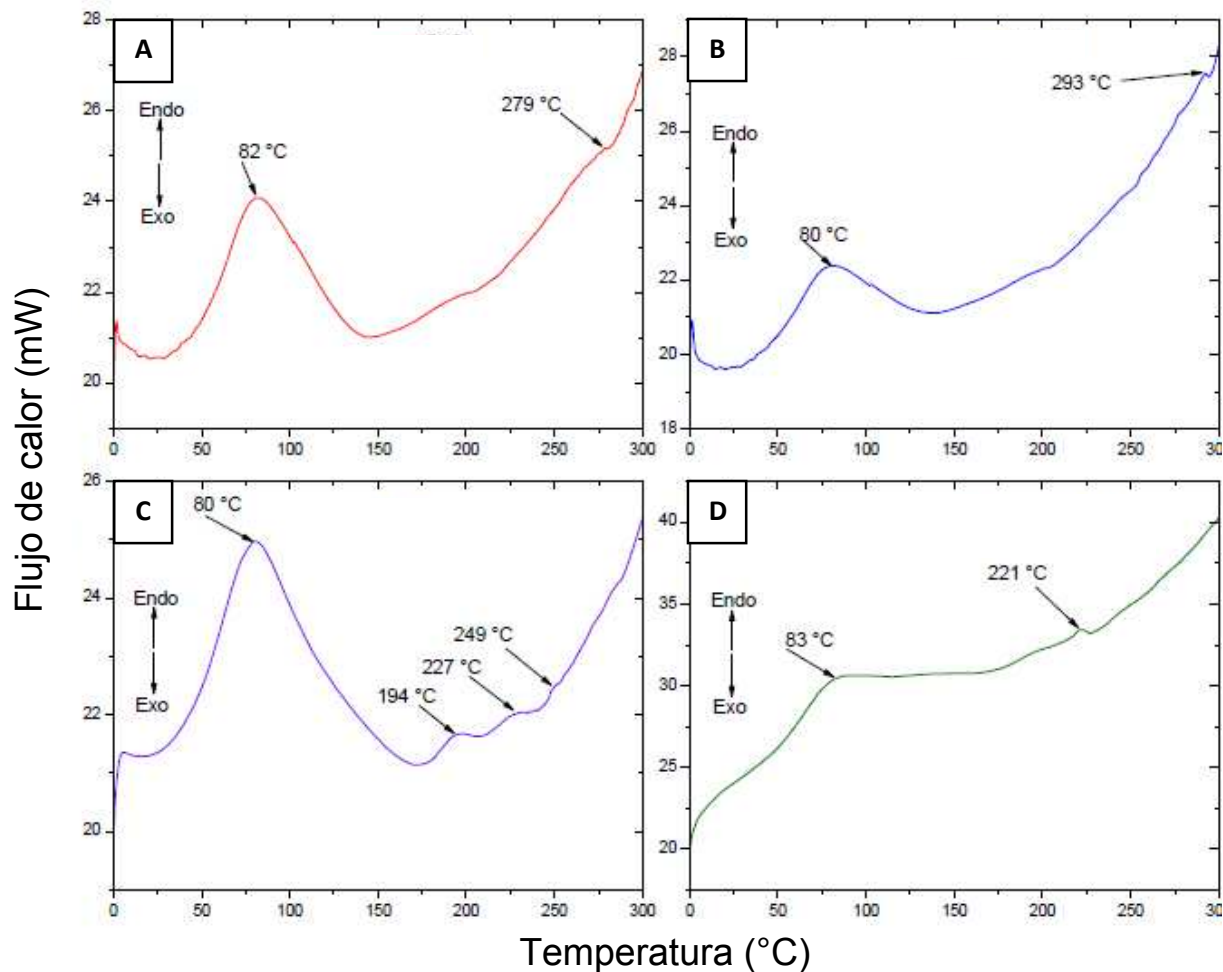


Figura 3.17. Termograma de DSC para los andamios electrohilados. (A) andamio CLG. (B) andamio CLG-AH. (C) andamio CLG-GTA. (D) andamio CLG-AH-GTA. El gráfico sólo presenta los primeros calentamientos.

En la figura anterior se observa que entre el andamio de sólo CLG y el andamio CLG-AH no existen grandes diferencias, ya que ambos andamios cuentan un pico endotérmico alrededor de 80 °C, el cual está ligado a la temperatura de desnaturalización de una CLG hidratada. Este proceso involucra la gelatinización de la CLG debido a cambios conformacionales relacionados con la ruptura de entrecruzamientos inter e intramoleculares [62]. Adicionalmente, se observa que ambas muestras presentan un pico adicional, el cual está relacionado con un fenómeno complejo de modificación térmica mediante el cual, primero se evapora agua residual, unida al polímero mediante puentes de hidrógeno; y luego, se generan cambios conformacionales en la CLG, los cuales la llevan de una estructura triple helicoidal a una conformación de ovillo estadístico [62, 63].

Por otro lado, comparando el andamio CLG con su contraparte entrecruzada, se puede notar que no hay gran diferencia en la temperatura de desnaturalización ya que, en el primero, este evento ocurre a 82 °C, mientras que en el andamio CLG-GTA se presenta a 80 °C. En la literatura se menciona que la temperatura de desnaturalización depende más del contenido de agua presente en la muestra que del grado de entrecruzamiento de ésta [63]. Sin embargo, mientras el andamio CLG cuenta sólo con un pico relacionado a cambios conformacionales en la estructura molecular, el andamio CLG-GTA cuenta con 3 eventos térmicos relacionados a dicho evento. Cabe destacar que el andamio entrecruzado cuenta con estos cambios conformacionales a menores temperaturas.

Comparando los andamios CLG-AH y CLG-AH-GTA, se puede notar que ambas muestras cuentan con una temperatura de desnaturalización alrededor de 80 °C. No obstante, aunque en ambas muestras se distingue un cambio conformacional, se aprecia que en el andamio CLG-AH éste se presenta a 293 °C, mientras que en su versión entrecruzada este fenómeno ocurre a 221 °C.

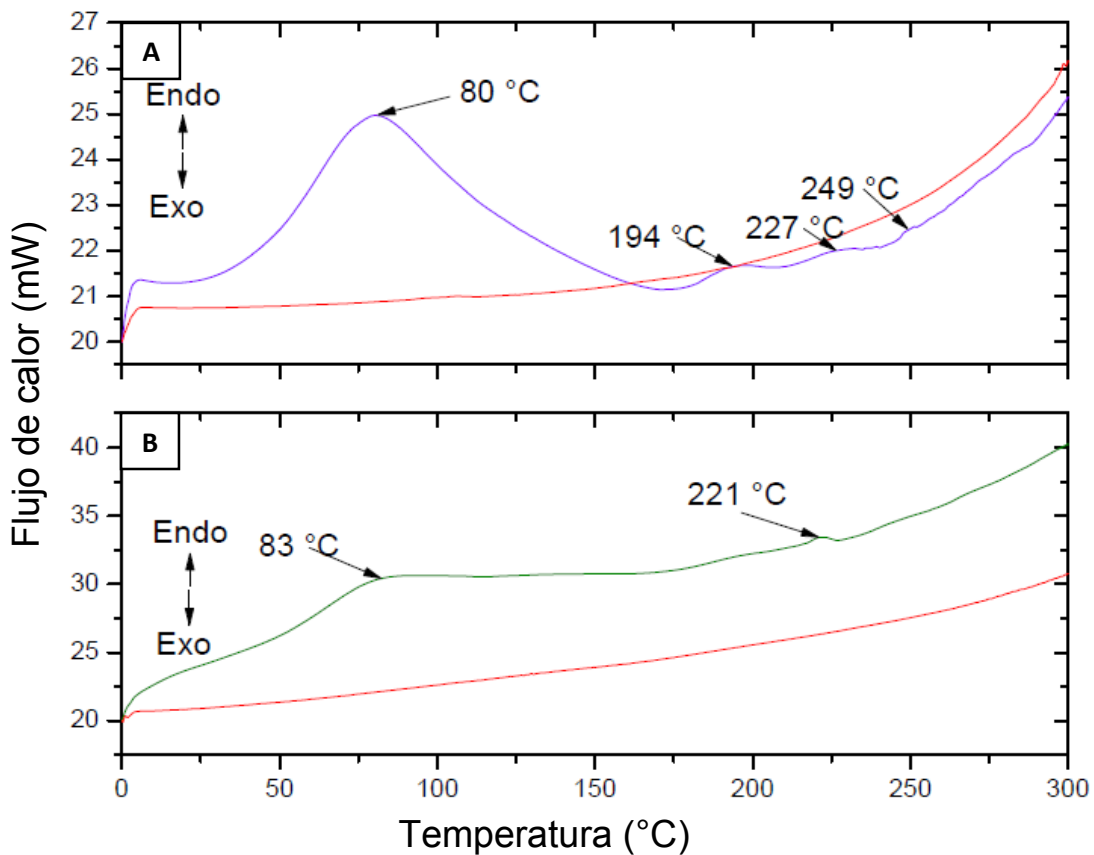


Figura 3.18. Termograma de DSC para los andamios entrecruzados. (A) andamio CLG-GTA. (B) andamio CLG-AH-GTA. El gráfico incluye el segundo calentamiento (en color rojo).

En las gráficas anteriores, se observa que ningún pico endotérmico se forma en el segundo calentamiento ya que el primer proceso térmico escinde la estructura de la proteína [22].

- Índice de entrecruzamiento del andamio

El índice de entrecruzamiento se determinó mediante el ensayo de ninhidrina. En la Figura 3.19 se presenta la solución de ninhidrina sin reaccionar, la cual adquirió una tonalidad violeta azulada al entrar en contacto con los andamios (ver Figura 3.20). Esto indica que en todas las muestras se encontraron grupos amina libres capaces de reaccionar con la ninhidrina.



Figura 3.19. Solución de ninhidrina.



Figura 3.20. Índice de entrecruzamiento por ensayo de ninhidrina de los andamios. Viales con la solución de ninhidrina posterior a la reacción con los grupos amina libres de los andamios electrohilados. H1, andamio CLG. H2, andamio CLG-GTA. H6, andamio CLG-AH. H8, andamio CLG-AH-GTA.

En la tabla 3.9 se presentan las 10 lecturas de absorbancia a 570 nm para todas las soluciones de ninhidrina, después de reaccionar con los grupos amina libres de los andamios sin entrecruzar y entrecruzados con GTA.

Tabla 3.9. Absorbancia a 570 nm de las muestras durante el ensayo de ninhidrina.

Repeticiones	CLG	CLG-GTA	CLG-AH	CLG-AH-GTA
1	0.216	0.204	0.388	0.252
2	0.227	0.204	0.388	0.265
3	0.243	0.205	0.379	0.268
4	0.255	0.205	0.391	0.274
5	0.221	0.208	0.385	0.333
6	0.225	0.216	0.38	0.348
7	0.219	0.21	0.397	0.338
8	0.218	0.208	0.394	0.349
9	0.220	0.206	0.398	0.353
10	0.219	0.203	0.385	0.352
Promedio	0.2263	0.2069	0.3885	0.3132
Desviación estándar	0.0127	0.0039	0.0066	0.0425
Grado de entrecruzamiento (%)	-	8.572	-	19.382

Se observa que ambas clases de andamios electrohilados presentan entrecruzamiento al estar en contacto con el GTA por 1 h. Sin embargo, el andamio CLG-AH-GTA cuenta con un grado de entrecruzamiento superior al 19%, mientras que el andamio CLG-GTA tiene uno de 8.57%. Esto puede deberse a que, el andamio CLG-AH cuente con mayor disponibilidad de grupos amina libres (proporcionados por el AH) capaces de reaccionar con el GTA durante el tratamiento entrecruzante.

De igual forma, se halló que sí existe diferencia significativa entre las absorbancias promedio de todas las muestras, considerando un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, con un nivel de significancia de 0.05.

Conclusiones

Se extrajo CLG a partir de las escamas de huachinango (*Lutjanus campechanus*) teniendo un rendimiento de extracción del 1.32% con un contenido proteico del 13.6%, que corresponde a CLG tipo I, como lo indicó el FTIR-ATR y la electroforesis, aunque posiblemente con la conformación heterotrimérica $\alpha 1(I)\alpha 2(I)\alpha 3(I)$, distinta a la variante comúnmente estudiada. Adicionalmente, los análisis térmicos mostraron que la CLG obtenida, exhibe una temperatura de desnaturalización a 79.5 °C; y una degradación térmica con 2 procesos pirolíticos, después de los cuales queda un residuo del 26.5% de la masa original.

Respecto al electrohilado, las mejores condiciones para obtener los andamios de CLG fueron un gasto de 0.2 mL/h, un voltaje de 20 kV y una distancia de trabajo de 15 cm utilizando una solución de CLG en HFIP al 9% (m/v). Por otro lado, al adicionar AH, los andamios se obtuvieron con una solución de CLG:AH al 9.5% (m/v), con una relación CLG:AH de 18:1, en una mezcla de HFIP y ácido fórmico en proporción 9:1 (v/v). Los parámetros de trabajo para esa solución fueron un gasto de 0.3 mL/h, un voltaje de 21.45 kV y una distancia de trabajo de 13 cm.

Se obtuvieron andamios electrohilados de CLG-AH, con estructura fibrilar y con un diámetro de fibra de $2.650 \pm 0.639 \mu\text{m}$, como lo confirma la microscopía óptica. La adición de AH al andamio promovió la formación de glóbulos y perlas entre la microestructura, sin embargo, no indujo cambios significativos en su estructura química, como lo indica el análisis de FTIR-ATR.

El grado de entrecruzamiento de los andamios CLG-AH-GTA y CLG-GTA fue de 19.38% y 8.57%, respectivamente, indicando que la adición de AH incrementa en un 10% el grado de entrecruzamiento como lo indica el ensayo de ninhidrina. No obstante, el AH no modifica las propiedades térmicas del andamio, puesto que éste cuenta con procesos de degradación similares, así como con una temperatura de desnaturalización superior a la temperatura fisiológica.

La hipótesis planteada en esta investigación sí se cumplió puesto que, con base en los resultados se demuestra que las propiedades del andamio electrohilado con CLG de *Lutjanus campechanus* y entrecruzado con GTA presentan modificaciones fisicoquímicas debidas a la presencia del AH las cuales lo hacen apto para su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos.

Perspectivas

Una de las perspectivas a considerar para la caracterización de la CLG es implementar la tinción con rojo de alizarina para determinar si la muestra contiene algún residuo mineral proveniente de las escamas. De igual manera, sería interesante determinar el contenido de CLG mediante el collagen assay kit (de Sigma Aldrich) o bien, utilizando un ensayo de hidroxiprolina. Asimismo, es importante llevar a cabo una secuenciación de proteína para determinar los aminoácidos que constituyen a la CLG obtenida y de esta forma, cerciorarse si corresponde a una CLG tipo I con el heterotrímero $\alpha 1(I)\alpha 2(I)\alpha 3(I)$.

En cuanto a la caracterización de los andamios electrohilados, es importante realizar una microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar a mayor detalle la microestructura de éstos y determinar si hubo un cambio morfológico debido al entrecruzamiento con GTA. También es necesario llevar a cabo pruebas a tensión y un análisis dinámico-mecánico (DMA) para medir las propiedades mecánicas del material y con ello, determinar si cuenta con las características de un tejido blando. Un análisis por espectroscopia Raman o por resonancia magnética nuclear del protón ($^1\text{H-RMN}$), confirmarían la formación de enlaces imina y por ende el entrecruzamiento de CLG-AH, ya que es una técnica más sensible y complementaria del FTIR. Aunado a esto, es importante llevar a cabo pruebas de pérdida de masa, puesto que hay que saber el tiempo de degradación de estos andamios.

Sin embargo, la perspectiva más importante para esta investigación es la evaluación de biocompatibilidad de los andamios mediante pruebas de hemólisis y ensayos de citotoxicidad *in vitro* con fibroblastos para examinar el posible uso de dichas estructuras en la regeneración tisular. De igual manera, es necesario realizar un ensayo de cierre de herida utilizando este material, para así, evaluar su capacidad de cicatrización y regeneración de tejidos.

Referencias

- [1] M. Rahmati, D. K. Mills, A. M. Urbanska, M. R. Saeb, J. R. Venugopal, S. Ramakrishna, et al. Electrospinning for tissue engineering applications, *Progress in Materials Science*. 117, 1-101, 2021.
- [2] N. E. Beltrán Vargas, C. H. González de la Rosa. *Técnicas de cultivos celulares e Ingeniería de tejidos*, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, 2016, 95-104.
- [3] M. Hiles, J. Hodde. Tissue engineering a clinically useful extracellular matrix biomaterial, *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 17 Suppl 1, S39-43, 2006.
- [4] U. Jammalamadaka, K. Tappa. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering, *J Funct Biomater*. 9(1), 1-14, 2018.
- [5] F. Y. Hsu, Y. S. Hung, H. M. Liou, C. H. Shen. Electrospun hyaluronate-collagen nanofibrous matrix and the effects of varying the concentration of hyaluronate on the characteristics of foreskin fibroblast cells, *Acta Biomater*. 6(6), 2140-2147, 2010.
- [6] I. Fernández-Cervantes, N. Rodríguez-Fuentes, L. V. León-Deniz, L. E. Alcántara Quintana, J. M. Cervantes-Uc, W. A. Herrera Kao, et al. Cell-free scaffold from jellyfish *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Scyphozoa) for skin tissue engineering, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 111, 1-10, 2020.
- [7] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner. Collagens--structure, function, and biosynthesis, *Adv Drug Deliv Rev*. 55(12), 1531-1546, 2003.
- [8] S. Tang, S. M. Vickers, H. P. Hsu, M. Spector. Fabrication and characterization of porous hyaluronic acid-collagen composite scaffolds, *J Biomed Mater Res A*. 82(2), 323-335, 2007.
- [9] B. Bavaresco, R. Comín, N. A. Salvatierra, M. P. Cid. Three-dimensional printing of collagen and hyaluronic acid scaffolds with dehydrothermal treatment crosslinking, *Composites Communications*. 19, 1-5, 2020.
- [10] Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai, S. Ramakrishna. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds, *Tissue Eng*. 11(1-2), 101-109, 2005.
- [11] A. A. Aldana, G. A. Abraham. Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications, *Int J Pharm*. 523(2), 441-453, 2017.
- [12] R. L. Fischer, M. G. McCoy, S. A. Grant. Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes, *J Mater Sci Mater Med*. 23(7), 1645-1654, 2012.
- [13] Y. Niu, M. Galluzzi. Hyaluronic Acid/Collagen Nanofiber Tubular Scaffolds Support Endothelial Cell Proliferation, Phenotypic Shape and Endothelialization, *Nanomaterials (Basel)*. 11(9), 1-18, 2021.

- [14] W. Jia, M. Li, L. Kang, G. Gu, Z. Guo, Z. Chen. Fabrication and comprehensive characterization of biomimetic extracellular matrix electrospun scaffold for vascular tissue engineering applications, *Journal of Materials Science*. 54(15), 10871-10883, 2019.
- [15] B. Holmes, T. J. Webster, L. G. Zhang. Nano/Microfabrication Techniques for Tissue and Organ Regeneration, en *Tissue and Organ Regeneration: Advances in Micro and Nanotechnology*, L. G. Zhang, A. Khademhosseini, T. J. Webster, 1st Ed.; Pan Stanford Publishing, Boca Ratón, Estados Unidos, 2014, 3-5.
- [16] R. D. Abbott, D. L. Kaplan. Strategies for improving the physiological relevance of human engineered tissues, *Trends Biotechnol.* 33(7), 401-407, 2015.
- [17] J. L. Quijano Mendoza, F. Hernández Sánchez, J. M. Cervantes Uc, N. Rodríguez Fuentes. Andamios electrohilados de gelatina con potencial aplicación en ingeniería tisular dérmica, *BioTecnología*. 25(3), 37-53, 2021.
- [18] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. S. Kumar. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A Review, *International Journal of Polymer Science*. 2011, 1-19, 2011.
- [19] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi. Scaffold Design for Tissue Engineering, *Macromolecular Bioscience*. 2(2), 67-77, 2002.
- [20] E. J. Sheehy, G.M. Cunniffe, F. J. O'Brien. Collagen-based biomaterials for tissue regeneration and repair, en *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*, M. A. Barbosa, M. C. L. Martins, 1st Ed.; Woodhead Publishing, Kidlington, Reino Unido, 2018, 127-150.
- [21] J. D. San Antonio, O. Jacenko, A. Fertala, J. P. R. O. Orgel. Collagen Structure-Function Mapping Informs Applications for Regenerative Medicine, *Bioengineering (Basel)*. 8(1), 1-23, 2020.
- [22] N. T. Chinh, V. Q. Manh, V. Q. Trung, T. D. Lam, M. D. Huynh, N. Q. Tung, et al. Characterization of collagen derived from tropical freshwater carp fish scale wastes and its amino acid sequence, *Natural Product Communications*. 14(7), 1-12, 2019.
- [23] M. D. Shoulders, R. T. Raines. Collagen structure and stability, *Annu Rev Biochem*. 78, 929-958, 2009.
- [24] N. K. Karamanos, A. D. Theocharis, Z. Piperigkou, D. Manou, A. Passi, S. S. Skandalis, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix, *The FEBS Journal*. 288(24), 6850-6912, 2021.
- [25] A. M. Carvalho, A. P. Marques, T. H. Silva, R. L. Reis. Evaluation of the Potential of Collagen from Codfish Skin as a Biomaterial for Biomedical Applications, *Mar Drugs*. 16(12), 1-14, 2018.

- [26] L. Si, Y. Fan, Y. Wang, L. Sun, B. Li, C. Xue, et al. Thermal degradation behavior of collagen from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) using TG-FTIR analysis, *Thermochimica Acta*. 659, 166-171, 2018.
- [27] N. Gallo, H. Nasser, L. Salvatore, M. L. Natali, L. Campa, M. Mahmoud, et al. Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges, *European Polymer Journal*. 117, 134-147, 2019.
- [28] K. J. Wolf, S. Kumar. Hyaluronic Acid: Incorporating the Bio into the Material, *ACS Biomater Sci Eng*. 5(8), 3753-3765, 2019.
- [29] I. S. Bayer. Hyaluronic Acid and Controlled Release: A Review, *Molecules*. 25(11), 1-38, 2020.
- [30] Y. Zhang, H. Ouyang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, Z. M. Huang. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 72(1), 156-165, 2005.
- [31] A. Greiner, J. H. Wendorff. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers, *Angew Chem Int Ed Engl*. 46(30), 5670-5703, 2007.
- [32] D. Li, Y. Xia. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?, *Advanced Materials*. 16(14), 1151-1170, 2004.
- [33] N. Bhardwaj, S. C. Kundu. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol Adv*. 28(3), 325-347, 2010.
- [34] J. B. Chiu, Y. K. Luu, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou. Electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications, *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 1(2), 115-132, 2005.
- [35] W. J. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, F. K. Ko. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering, *J Biomed Mater Res*. 60(4), 613-621, 2002.
- [36] N. Davidenko, J. J. Campbell, E. S. Thian, C. J. Watson, R. E. Cameron. Collagen-hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering, *Acta Biomater*. 6(10), 3957-3968, 2010.
- [37] H. Zhang, Y. T. Wei, K. S. Tsang, C. R. Sun, J. Li, H. Huang, et al. Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model, *Journal of Translational Medicine*. 6(1), 1-11, 2008.
- [38] E. Entekhabi, M. Haghbin Nazarpak, M. Shafieian, H. Mohammadi, M. Firouzi, Z. Hassannejad. Fabrication and in vitro evaluation of 3D composite scaffold based on collagen/hyaluronic acid sponge and electrospun polycaprolactone nanofibers for peripheral nerve regeneration, *J Biomed Mater Res A*. 109(3), 300-312, 2021.
- [39] F. Li, M. Ducker, B. Sun, F. G. Szele, J. T. Czernuszka. Interpenetrating polymer networks of collagen, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate as scaffolds for brain tissue engineering, *Acta Biomater*. 112, 122-135, 2020.

- [40] D. Liu, L. Liang, J. M. Regenstein, P. Zhou. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of Bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*), *Food Chemistry*. 133(4), 1441-1448, 2012.
- [41] H. Wang, P. K. Chu. Surface characterization of Biomaterials, en *Characterization of Biomaterials*, A. Bandyopadhyay, S. Bose, 1st Ed.; Elsevier, Estados Unidos, 2013, 105-174.
- [42] V. C. Grigoras. Thermal Behaviour and Crystallization of Green Biocomposites, en *Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites*, X. Inamuddin, S. Thomas, R. Kumar Mishra, A.M. Asiri, 1st Ed.; Springer; Cham, Suiza, 2019, 1185-1231.
- [43] H. Mori, Y. Tone, K. Shimizu, K. Zikihara, S. Tokutomi, T. Ida, et al. Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabis saira*), *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 33(1), 174-181, 2013.
- [44] W. Torres-Arreola, R. Pacheco-Aguilar, R. R. Sotelo-Mundo, O. Rouzaud-Sández, J. M. Ezquerro-Brauer. Caracterización parcial del Colágeno Extraído a partir del manto, Aleta y Tentáculos de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*), *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6(2), 101-108, 2008.
- [45] K. Gómez-Lizárraga, C. Piña-Barba, N. Rodríguez-Fuentes, Romero M. Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino, *Superficies y Vacío*. 24(4), 137-140, 2011.
- [46] M. Li, X. Zhang, W. Jia, Q. Wang, Y. Liu, X. Wang, et al. Improving in vitro biocompatibility on biomimetic mineralized collagen bone materials modified with hyaluronic acid oligosaccharide, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 104, 1-11, 2019.
- [47] M. Nair, R. K. Johal, S. W. Hamaia, S. M. Best, R. E. Cameron. Tunable bioactivity and mechanics of collagen-based tissue engineering constructs: A comparison of EDC-NHS, genipin and TG2 crosslinkers, *Biomaterials*. 254, 1-27, 2020.
- [48] R. Dash, M. Foston, A. J. Ragauskas. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers, *Carbohydr Polym*. 91(2), 638-645, 2013.
- [49] C. H. Huang, C. Y. Chi, Y. S. Chen, K. Y. Chen, P. L. Chen, C. H. Yao. Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system, *Materials Science and Engineering: C*. 32(8), 2476-2483, 2012.
- [50] J. Zhang, R. Duan, C. Ye, K. Konno. Isolation and characterization of collagens from scale of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), *Journal of Food Biochemistry*. 34(6), 1343-1354, 2010.
- [51] S. Chen, H. Chen, Q. Xie, B. Hong, J. Chen, F. Hua, et al. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*), *Food Hydrocolloids*. 52, 468-477, 2016.

- [52] J. Chen, L. Li, R. Yi, R. Gao, J. He. Release kinetics of tilapia scale collagen I peptides during tryptic hydrolysis, *Food Hydrocolloids*. 77, 931–936, 2018.
- [53] J. Chen, L. Li, R. Yi, N. Xu, R. Gao, B. Hong. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*), *LWT - Food Science and Technology*. 66, 453–459, 2016.
- [54] K. Matmaroh, S. Benjakul, T. Prodpran, A. B. Encarnacion, H. Kishimura. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*), *Food Chem*. 129(3), 1179-1186, 2011.
- [55] W. Liu, G. Li, Y. Miao, X. Wu. Preparation and characterization of pepsin-solubilized type I collagen from the scales of snakehead (*Ophiocephalus argus*), *Journal of Food Biochemistry*. 33(1), 20–37, 2009.
- [56] O. Kaewdang, S. Benjakul, T. Kaewmanee, H. Kishimura. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), *Food Chem*. 155, 264-270, 2014.
- [57] S. Nalinanon, S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*), *Food Chemistry*. 104(2), 593-601, 2007.
- [58] Q. Zhang, Q. Wang, S. Lü, J. Lu, S. Jiang, J. M. Regenstein, et al. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Food Bioscience*. 13, 41–48, 2016.
- [59] J. L. Quijano Mendoza, Elaboración de andamios electrohilados de gelatina para posible uso en ingeniería tisular para piel, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, México, 2020.
- [60] A. Barth. Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim Biophys Acta*. 1767(9), 1073-1101, 2007.
- [61] S. Krimm, J. Bandekar. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins, *Adv Protein Chem*. 38, 181-364, 1986.
- [62] L. Bozec, M. Odlyha. Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy, *Biophys J*. 101(1), 228-236, 2011.
- [63] K. Pietrucha. Changes in denaturation and rheological properties of collagen-hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies, *Int J Biol Macromol*. 36(5), 299-304, 2005.
- [64] V. Samouillan, A. Lamure, C. Lacabanne. Dielectric relaxations of collagen and elastin in the dehydrated state, *Chemical Physics*. 255(2-3), 259-271, 2000.
- [65] K. S. Rho, L. Jeong, G. Lee, B. M. Seo, Y. J. Park, S. D. Hong, et al. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing, *Biomaterials*. 27(8), 1452-1461, 2006.

- [66] A. Haider, S. Haider, I. K. Kang. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, *Arabian Journal of Chemistry*. 11(8), 1165–1188, 2018.
- [67] K. Adamiak, A. Sionkowska. Current methods of collagen cross-linking: Review, *Int J Biol Macromol*. 161, 550-560, 2020.
- [68] H. J. Lai, C. H. Kuan, H. C. Wu, J. C. Tsai, T. M. Chen, D. J. Hsieh, et al. Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple angiogenic growth factors for chronic wound healing, *Acta Biomater*. 10(10), 4156-4166, 2014.
- [69] V. Shabafrooz, M. Mozafari, G. A. Köhler, S. Assefa, D. Vashaei, L. Tayebi. The effect of hyaluronic acid on biofunctionality of gelatin-collagen intestine tissue engineering scaffolds, *J Biomed Mater Res A*. 102(9), 3130-3139, 2014.
- [70] I. V. Yannas. Collagen and gelatin in the solid state, *Journal of Macromolecular Science, Part C*. 7(1), 49-106, 1972.
- [71] Y. Liu, X. Huang, P. Guo, X. Liao, B. Shi. Skin collagen fiber-based radar absorbing materials, *Chinese Science Bulletin*. 56(2), 202-208, 2011.
- [72] E. P. Lamparelli, V. Casagrande, D. Pressato, N. Maffulli, G. Della Porta, D. Bellini. Synthesis and Characterization of a Novel Composite Scaffold Based on Hyaluronic Acid and Equine Type I Collagen, *Pharmaceutics*. 14(9), 1-18, 2022.
- [73] K. Lewandowska, A. Sionkowska, S. Grabska, B. Kaczmarek. Surface and thermal properties of collagen/hyaluronic acid blends containing chitosan, *Int J Biol Macromol*. 92, 371-376, 2016.
- [74] M. Erencia, F. Cano, J. A. Tornero, M. M. Fernandes, T. Tzanov, J. Macanás, et al. Electrospinning of gelatin fibers using solutions with low acetic acid concentration: Effect of solvent composition on both diameter of electrospun fibers and cytotoxicity, *Journal of Applied Polymer Science*. 132(25), 1-11, 2015.
- [75] Y. Niu, F. J. Stadler, X. Yang, F. Deng, G. Liu, H. Xia. HA-coated collagen nanofibers for urethral regeneration via in situ polarization of M2 macrophages, *J Nanobiotechnology*. 19(1), 1-14, 2021.

Anexo A. Efecto del solvente en el electrohilado

Antes de escoger el sistema presentado en la sección 3.4, se probaron diversos sistemas de solventes con el fin de obtener un electrohilado adecuado de las fibras compuestas por CLG marina y AH.

Una de estas mezclas consistió en DMF y NaOH en una relación de 1:4 (v/v), tal y como se reporta en la literatura [12]. Como soluto se utilizó CLG y AH al 9.5% (m/v), con una relación de CLG:AH de 18:1. Sin embargo, dicho sistema carecía de la tensión superficial necesaria para formar fibras electrohiladas. Debido a eso, se optó por invertir la relación de solventes y se utilizó una mezcla similar a la anterior, pero con DMF:NaOH a una relación de 4:1 (v/v). En este caso, la CLG precipitó en el sistema y tampoco fue posible electrohilar.

Otro sistema utilizado fue considerando como solvente ácido acético al 20% (v/v) y como soluto una mezcla de CLG y AH similar a la anterior. Al igual que el sistema anterior, se notó que la solución no contaba con la tensión superficial adecuada, puesto que dicha mezcla sólo producía gotas en la punta del electrohilado en vez de generar fibras. Esto pudo deberse a que para electrohilar con ácido acético, es necesario que este solvente esté con una concentración de al menos 25% (v/v). Es importante recalcar que, a menor concentración de ácido acético, se requiere mayor concentración de soluto para electrohilar. En la literatura se reporta que la acidez de la solución influye directamente en la formación de fibras [74].

Por otro lado, igual se probó como sistema una mezcla formada por TFE y ácido fórmico, en relación 7:3 (v/v), similar a la reportada en un estudio previo [5]. Sin embargo, a diferencia de lo reportado en una investigación reciente [75], el AH no logra disolverse en el TFE ya que este polímero precipita al contacto inmediato con este solvente. De igual manera, se electrohiló una solución conformada por CLG al 9% en TFE a manera de comparación. En la Figura A.1 se muestran las estructuras macro y microscópicas de este andamio, mientras que en la Figura A.2 se presenta el espectro FTIR-ATR de dicha muestra. Los picos principales de este espectro se presentan en la tabla A.1.

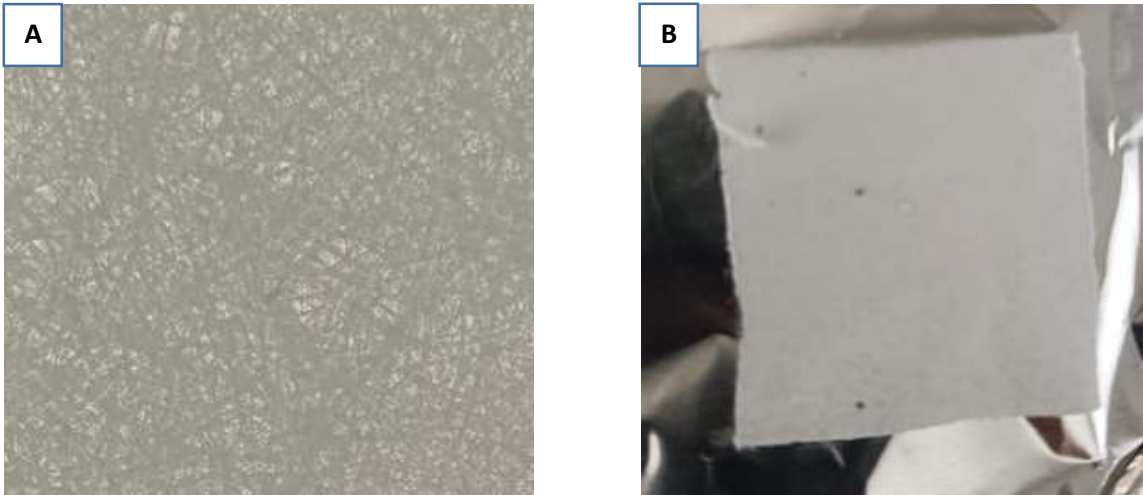


Figura A.1. Estructuras macro y microscópicas del andamio CLG-TFE. (A) Estructura microscópica tomada con una distancia óptica de 5.35 mm y campo claro. (B) Estructura macroscópica del andamio.

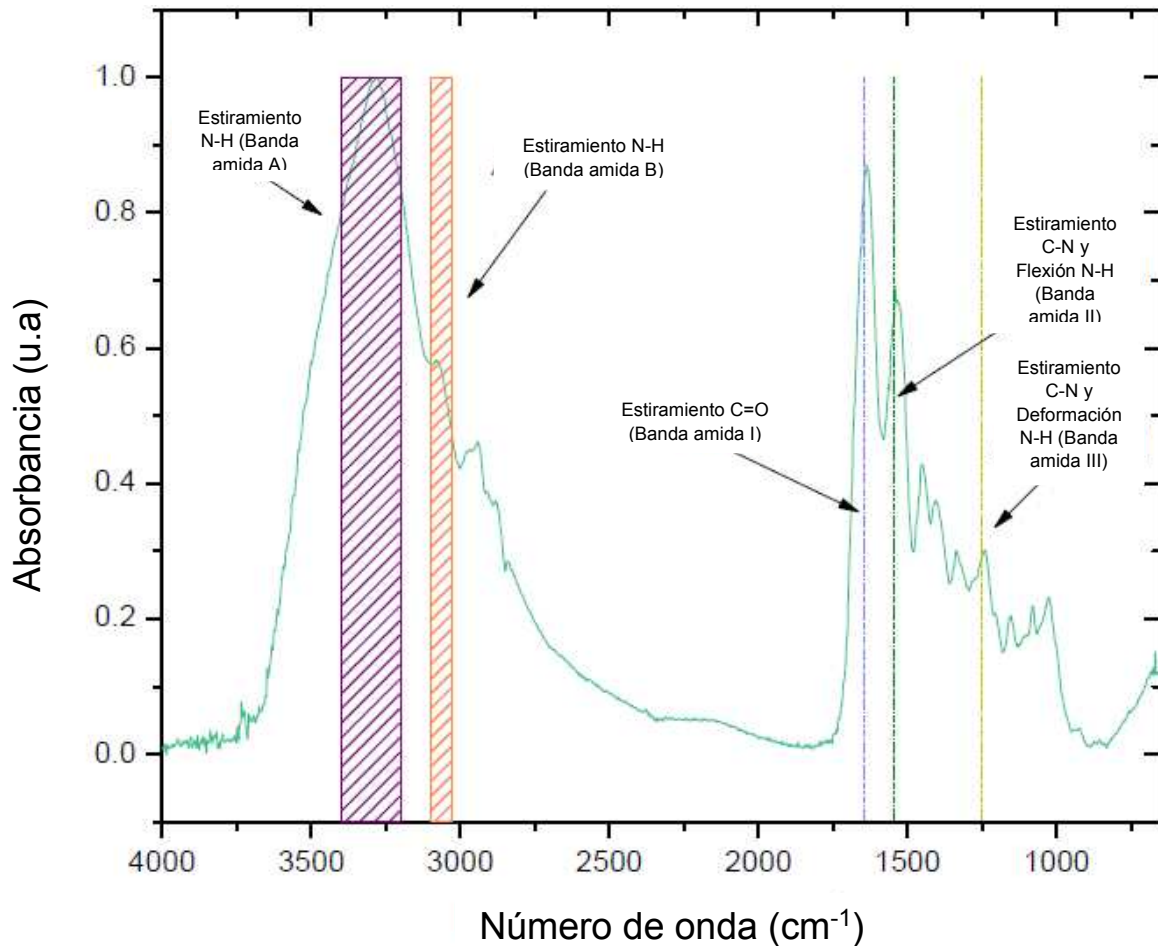


Figura A.2. Espectro infrarrojo del andamio CLG-TFE.

Tabla A.1. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo del andamio CLG-TFE [40, 60, 69, 70].

Pico CLG-TFE (cm ⁻¹)	Pico según la referencia (cm ⁻¹)	Tipo de enlace
3285	3200-3600	Estiramiento N-H (banda amida A)
3081	3030-3100	Estiramiento N-H (banda amida B)
2942	2930-2950	Estiramiento asimétrico C-H
2881, 2843	2850-2870	Estiramiento simétrico C-H
1636	1630-1660	Estiramiento C=O (banda amida I)
1540	1535-1550	Estiramiento C-N y Flexión N-H (banda amida II)
1452	1350-1480	Flexión C-H
1405	1375-1391	Deformación simétrica C-H ₃
1337	1310-1340	Meneo C-H ₂
1240	1230-1270	Estiramiento C-N y deformación N-H (banda amida III)
1154	1170	Flexión asimétrica C-O-C
1079	1075-1082	Vibración C-O de grupos hidroxilo
1026	1022-1038	Estiramiento C-N (para amina primaria)

Macroscópicamente hablando, el andamio CLG-TFE es más delgado que el elaborado con HFIP, aunque ambos presentan una coloración y textura similares. Asimismo, se puede observar que este andamio presenta un espectro infrarrojo parecido al andamio CLG (el cual se hizo usando HFIP como solvente) ya que ambos tienen las bandas características de la CLG. Sin embargo, a diferencia de la muestra hecha con HFIP, este andamio tiene mayor absorbancia en el pico característico correspondiente a la banda amida A.

De igual manera, se probó una mezcla de HFIP y ácido fórmico, a una relación de 7:3 (v/v) tal y como se ha reportado previamente [5], usando como solutos CLG obtenida a partir de escamas de *Lutjanus campechanus* y AH de *Streptococcus equi* (marca Sigma Aldrich, peso molecular entre 1300 kDa y 2500 kDa, número de catálogo 53747). No obstante, se encontró que los andamios elaborados de esta forma carecen de buena estabilidad, ya que se degradan más

rápido a condiciones ambientales que los hechos cuando la relación de HFIP y ácido fórmico es de 9:1 (v/v).

Por todo lo anterior, es importante tener en cuenta el tipo de solvente a utilizar durante el electrohilado, ya que dicho solvente debe ser capaz de disolver los solutos de interés, generando al mismo tiempo, una solución con una tensión superficial apropiada para obtener fibras. En caso de que el solvente no sea compatible con los solutos, entonces habrá que preparar una mezcla de los primeros, considerando la afinidad existente entre cada solvente y soluto. Si todo lo anterior no se cumple, entonces no se obtendrán fibras electrohiladas.

Anexo B. Parámetros de electrohilado

A continuación, se presenta la estandarización de los parámetros de electrohilado para los andamios CLG y CLG-AH. En la tabla B.1 se muestran las condiciones para el andamio CLG, mientras que en la tabla B.2 se presentan dichas características para el andamio CLG-AH.

Tabla B.1. Estandarización del electrohilado para el andamio CLG.

Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/h)	Distancia de trabajo (cm)
13	0.5	13
13	0.7	13
13	0.6	13
18	0.3	18
19	0.5	19
24	0.2	15

Como se observa en la tabla anterior, se probaron diversos voltajes (de 13 a 24 kV), velocidades de flujo (de 0.2 a 0.7 mL/h) y distancias de trabajo (de 13 a 19 cm) durante la estandarización del electrohilado del andamio CLG. Para ello, se consideraron valores reportados en un estudio local, relacionado al electrohilado de gelatina porcina [59]. Durante estas pruebas se notó que, a bajos voltajes, la solución no es capaz de formar fibras continuas. Por otro lado, a velocidades de flujo elevadas, no hay un control adecuado del chorro de inyección y, por ende, aumenta la presencia de cúmulos entre las fibras. Esto también ocurre cuando la distancia de trabajo es elevada. No obstante, si la distancia de trabajo es insuficiente, el chorro de inyección sale con mucha fuerza, pudiendo ocasionar fisuras macroscópicas en el andamio.

Tabla B.2. Estandarización del electrohilado para el andamio CLG-AH

Voltaje (kV)	Velocidad de flujo (mL/h)	Distancia de trabajo (cm)
17	0.3	13
17	0.4	13
21.45	0.3	10
21.45	0.4	13
21.9	0.3	10
22.8	0.3	10
23	0.3	13
24	0.4	13

24	0.3	13
25	0.3	13
25	0.4	13
26	0.3	13
26	0.4	13
27	0.3	13
27	0.3	13
28	0.3	13
29	0.3	13
29	0.4	13
29	0.5	13

En la tabla B.2, se aprecian los distintos voltajes (de 17 a 29 kV), velocidades de flujo (de 0.3 a 0.5 mL/h) y distancias de trabajo (de 10 a 13 cm) utilizados para estandarizar el electrohilado del andamio CLG-AH. Se observa que el voltaje, la velocidad de flujo y la distancia de trabajo poseen un comportamiento similar al de la estandarización del andamio CLG.

En ambos casos, se observa la variación de los parámetros de electrohilado, esto pudo deberse a que las condiciones ambientales fueron distintas cada vez que se electrohiló, por lo que en cada sesión de electrohilado se deben hacer los ajustes necesarios al voltaje, velocidad de flujo y distancia, hasta obtener un flujo continuo que genere fibras limpias y sin cúmulos.

Anexo C. Efecto del entrecruzante en el electrohilado

Antes de optar por entrecruzar con GTA al vapor en vacío, se propuso como tratamiento entrecruzante una inmersión en una solución etanólica de EDC 5 mM con NHS, a una relación molar de EDC:NHS de 1:1. Para ello, se puso en contacto el andamio CLG con dicha solución durante 1 h. Posterior a ello, se le dio un lavado por goteo con etanol al 96% (v/v) y con agua destilada (igual por goteo). Finalmente, se dejó secar por 18 h.

En general, se encontró que el andamio se reduce a 1/9 de su área original, al mismo tiempo que pierde la estructura fibrilar, característica del electrohilado, adquiriendo así, la apariencia de una película. Esto se debe a que posiblemente, ocurre un fenómeno de hinchazón al poner en contacto el andamio con el etanol y el EDC-NHS, y como consecuencia, las fibras se contrajeron y colapsaron [46]. En la Figura C.1 se presenta la macroestructura de este andamio, mientras que en la Figura C.2 se muestra el espectro infrarrojo para dicha muestra. Sus bandas características se presentan en la tabla C.1.



Figura C.1. Macroestructura del andamio CLG-EDC-NHS

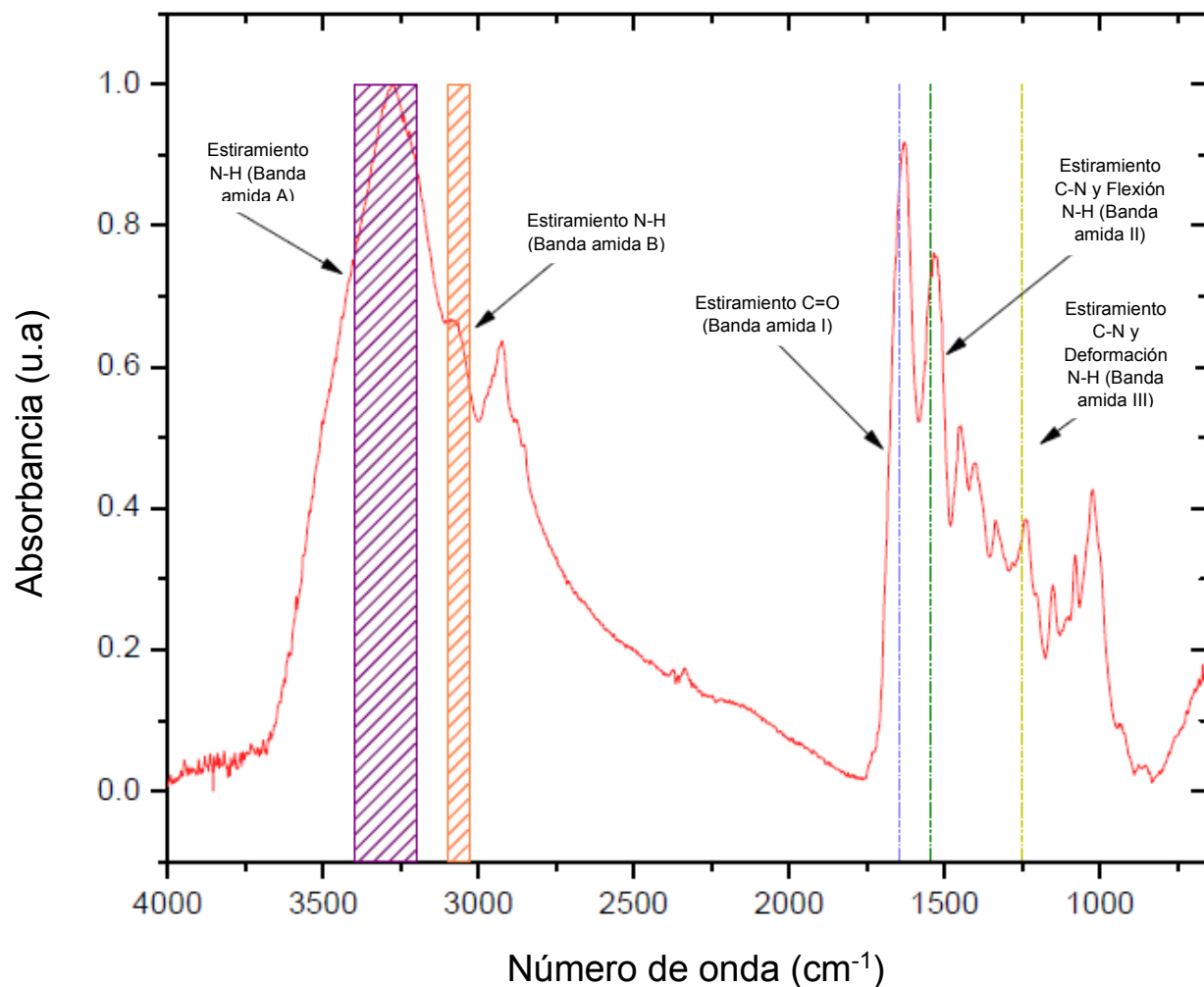


Figura C.2. Espectro infrarrojo del andamio CLG-EDC-NHS.

Tabla C.1. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo del andamio CLG-EDC-NHS [40, 60, 69, 70].

Pico CLG-EDC-NHS (cm ⁻¹)	Pico según la referencia (cm ⁻¹)	Tipo de enlace
3273	3200-3600	Estiramiento N-H (banda amida A)
3089	3030-3100	Estiramiento N-H (banda amida B)
2925	2930-2950	Estiramiento asimétrico C-H
2884, 2852	2850-2870	Estiramiento simétrico C-H
1629	1630-1660	Estiramiento C=O (banda amida I)
1534	1535-1550	Estiramiento C-N y Flexión N-H (banda amida II)

1447	1350-1480	Flexión C-H
1403	1375-1391	Deformación simétrica C-H ₃
1335	1310-1340	Meneo C-H ₂
1239	1230-1270	Estiramiento C-N y deformación N-H (banda amida III)
1151	1170	Flexión asimétrica C-O-C
1079	1075-1082	Vibración C-O de grupos hidroxilo
1023	1022-1038	Estiramiento C-N (para amina primaria)

Se puede observar que este andamio presenta un espectro infrarrojo similar al del andamio CLG-GTA, con las bandas características para CLG, aunque el mecanismo de reacción sea distinto, ya que el EDC-NHS utiliza un entrecruzamiento de longitud cero [12]. Esto quiere decir que, a diferencia del GTA, el EDC-NHS no se adhiere al material, sino que interactúa con él, haciendo reactivos los grupos amino y carboxilo disponibles para que reaccionen entre sí.

Asimismo, se probó este sistema de entrecruzamiento con un andamio CLG-AH. No obstante, se encontró que este andamio se vuelve demasiado delgado y quebradizo al tacto. En la Figura C.3 se observa esta muestra, mientras que su espectro infrarrojo queda plasmado en la Figura C.4 y detallado en la tabla C.2.



Figura C.3. Macroestructura del andamio CLG-AH-EDC-NHS

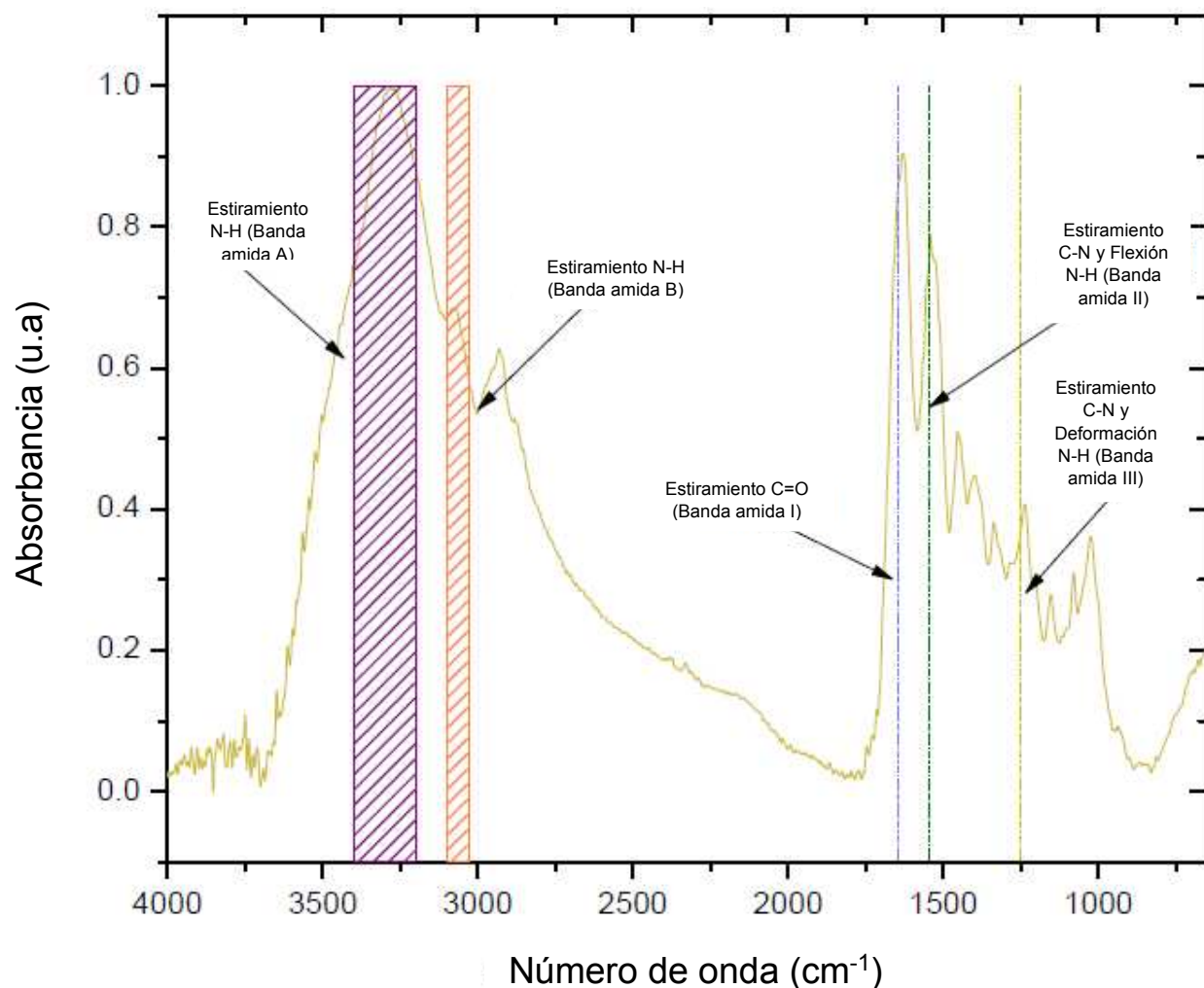


Figura C.4. Espectro infrarrojo del andamio CLG-AH-EDC-NHS.

Tabla C.2. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo del andamio CLG-AH-EDC-NHS [40, 60, 69, 70].

Pico CLG-AH-EDC-NHS (cm ⁻¹)	Pico según la referencia (cm ⁻¹)	Tipo de enlace
3275	3200-3600	Estiramiento N-H (banda amida A)
3074	3030-3100	Estiramiento N-H (banda amida B)
2933	2930-2950	Estiramiento asimétrico C-H
2879	2850-2870	Estiramiento simétrico C-H
1633	1630-1660	Estiramiento C=O (banda amida I)
1539	1535-1550	Estiramiento C-N y Flexión N-H (banda amida II)

1455	1350-1480	Flexión C-H
1403	1375-1391	Deformación simétrica C-H ₃
1337	1310-1340	Meneo C-H ₂
1283, 1237, 1202	1230-1270	Estiramiento C-N y deformación N-H (banda amida III)
1154	1170	Flexión asimétrica C-O-C
1079	1075-1082	Vibración C-O de grupos hidroxilo
1026	1022-1038	Estiramiento C-N (para amina primaria)

En este caso, el espectro es parecido al del andamio CLG-AH-GTA, pero no cuenta con el pico característico a 1714 cm^{-1} , el cual podría estar relacionado a la formación de enlaces imina. Esto se debe a que el mecanismo de reacción entre ambos tratamientos es distinto.

Es importante tener en cuenta el tipo de andamio a entrecruzar, ya que esto permitirá decidir cuál reactivo será el adecuado para dicho tratamiento químico. En el caso de los andamios electrohilados, es recomendable realizar un entrecruzamiento por vapor ya que, a diferencia de los tratamientos a inmersión, el vapor del agente entrecruzante no provoca el colapso de las fibras electrohiladas.

Anexo D. Efecto de la fuente de AH

Para determinar si el tipo de AH tiene efecto en el electrohilado de los andamios, se hicieron andamios CLG-AH utilizando AH extraído de gallo. En la Figura D.1 se muestran las estructuras macro y microscópicas de este andamio, mientras que en la Figura D.2 se presenta el espectro FTIR-ATR de dicha muestra. Los picos característicos de esta muestra se reportan en la tabla D.1.

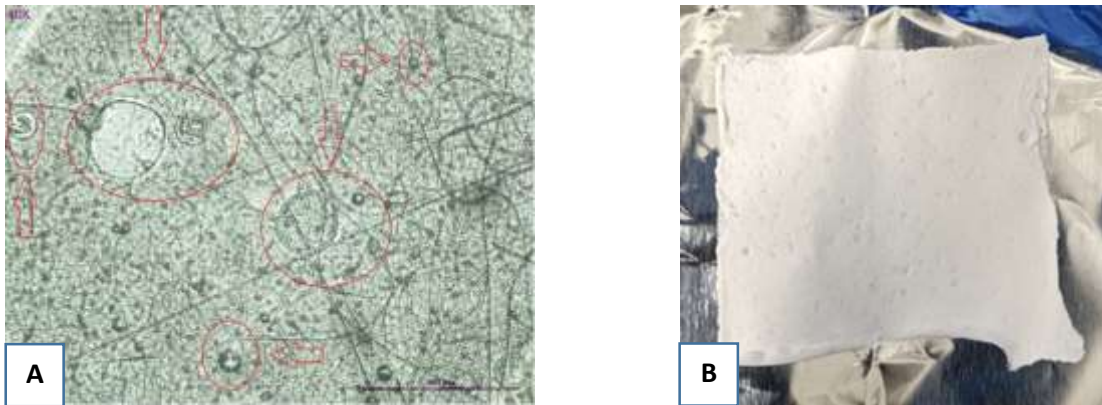


Figura D.1. Estructuras macro y microscópicas del andamio CLG-AH gallo. (A) Estructura microscópica tomada con una distancia óptica de 5.35 mm utilizando el software CapturePro v2.8.8.5. (B) Estructura macroscópica del andamio

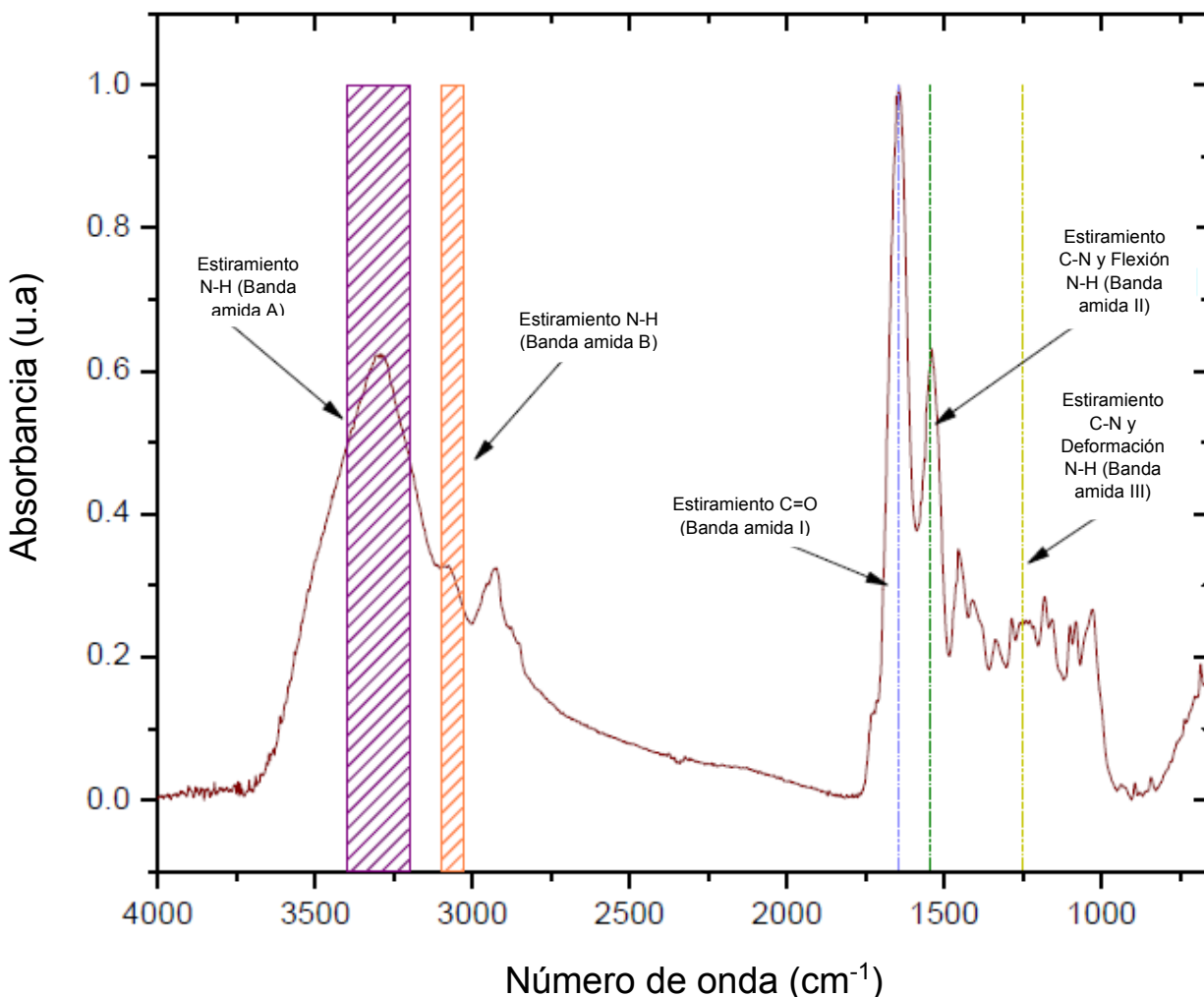


Figura D.2. Espectro infrarrojo del andamio CLG-AH gallo.

Tabla D.1. Tipos de enlace, picos reportados en la literatura y picos experimentales en el espectro infrarrojo del andamio CLG-AH gallo [40, 60, 69, 70].

Pico CLG-AH gallo (cm ⁻¹)	Pico según la referencia (cm ⁻¹)	Tipo de enlace
3291	3200-3600	Estiramiento N-H (banda amida A)
3076	3030-3100	Estiramiento N-H (banda amida B)
2925	2930-2950	Estiramiento asimétrico C-H
-	2850-2870	Estiramiento simétrico C-H
1644	1630-1660	Estiramiento C=O (banda amida I)
1540	1535-1550	Estiramiento C-N y Flexión N-H (banda amida II)

1455	1350-1480	Flexión C-H
1410	1375-1391	Deformación simétrica C-H ₃
1337	1310-1340	Meneo C-H ₂
1285	1230-1270	Estiramiento C-N y deformación N-H (banda amida III)
1181, 1157	1170	Flexión asimétrica C-O-C
1081, 1100	1075-1082	Vibración C-O de grupos hidroxilo
1029	1022-1038	Estiramiento C-N (para amina primaria)

De lo anterior, se puede destacar que este andamio es micro y macroestructuralmente similar al obtenido con AH comercial de *Streptococcus equi* (marca Sigma Aldrich, peso molecular entre 1300 kDa y 2500 kDa, número de catálogo 53747). Incluso, el espectro infrarrojo es muy parecido. Sin embargo, se optó por usar AH comercial puesto que con éste pudieron obtenerse el doble de andamios durante el mismo tiempo, es decir, el AH de *Streptococcus equi* optimiza la producción de andamios con respecto al AH extraído de gallo.