



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

ESTUDIO DEL EFECTO DEL GRADO DE ENTRECruzAMIENTO  
DE GELATINA ELECTROHILADA EN SU RESISTENCIA A LA  
DEGRADACIÓN

Tesis que presenta

ANTONIO DAVID ABREU REJÓN

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS  
MATERIALES POLIMÉRICOS

Mérida, Yucatán, México

Diciembre 2017

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades experimentales 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.

Mérida, Yucatán, México a 08 de diciembre de 2017



Antonio David Abreu Rejón

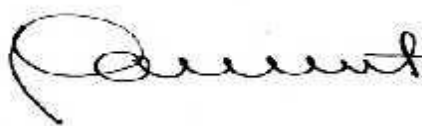
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Antonio David Abreu Rejón titulado ESTUDIO DEL EFECTO DEL GRADO DE ENTRECruzamiento DE GELATINA ELECTROHILADA EN SU RESISTENCIA A LA DEGRADACIÓN fue realizado en la Unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Fernando Hernández Sánchez, dentro de la opción de Maestro en Ciencias, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias en Materiales Poliméricos de este Centro.



---

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 08 de diciembre de 2017

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos y al CONACYT, por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo y la beca 700249/589271.

Al Dr. Fernando Hernández Sánchez, por darme la oportunidad de trabajar con él como su estudiante de tesis de maestría, brindándome en todo momento su confianza y apoyo.

Al M.C. Hugo Joel Carrillo Escalante, por su importante participación como guía en la elaboración de las diversas pruebas de caracterización realizadas en el presente trabajo, por no dudar de compartir sus conocimientos y experiencia y por su amistad y consejo.

A la Q.I. Rossana Vargas Faride, por su ayuda y guía en las pruebas de caracterización y el trabajo en el laboratorio.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Alex Valadez González, Dr. José Manuel Cervantes Uc, Dr. Luis May Hernández, Dr. Mario Adrián de Atocha Dzul Cervantes, por sus valiosos consejos y críticas para mejorar esta tesis.

A Priscila Esther Colli Góngora por su amor, amistad y el apoyo que me ha brindado. Y a mis compañeros del posgrado por su amistad quienes me apoyaron y motivaron durante esta etapa.

# Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Capítulo 1. MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Ingeniería Tisular.....	5
1.2. Electrohilado.....	7
1.3. Gelatina .....	10
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVOS.....	17
Objetivo general .....	17
Objetivos específicos .....	17
Capítulo 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	19
2.1. Materiales.....	19
2.2. Metodología .....	19
2.3. Fabricación de los andamios electrohilados.....	20
2.4. Entrecruzamiento de las fibras de gelatina.....	20
2.5. Inactivación de los grupos aldehído.....	21
2.6. Eliminación del solvente residual.....	21
2.7. Caracterizaciones .....	21
2.7.1. Espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR).....	21
2.7.2. Caracterización morfológica .....	21
2.7.3. Caracterización superficial .....	21
2.7.4. Distribución de diámetros .....	22
2.7.5. Prueba de degradación.....	22
2.7.6. Determinación del grado de entrecruzamiento .....	23
2.7.7. Resistencia mecánica .....	24
Capítulo 3. RESULTADOS.....	25
3.1. Obtención de los andamios de gelatina electrohilada .....	25

<b>3.2. Entrecruzamiento de las fibras .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR) .....</b>	<b>29</b>
<b>3.4. Caracterización superficial.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5. Determinación del grado de entrecruzamiento .....</b>	<b>33</b>
<b>3.6. Propiedades mecánicas a tensión .....</b>	<b>34</b>
<b>3.7. Pruebas de degradación.....</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>42</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de los componentes de un andamio en ingeniería tisular [14]. .....	5
Figura 1.2. Componentes de un equipo de electrohilado [23]. .....	8
Figura 1.3. Estructura el enlace péptido. ....	10
Figura 1.4. Desnaturalización del colágeno y formación de la gelatina. ....	12
Figura 1.5. Proceso de hidrólisis del enlace péptido de las proteínas. ....	13
Figura 1.6. Cadenas poliméricas entrecruzadas. ....	14
Figura 1.7. Reacción del glutaraldehído con la gelatina. ....	14
Figura 2.1. Esquema de las etapas generales del desarrollo de la parte experimental. ....	19
Figura 3.1. Imágenes SEM de las fibras del andamio de gelatina electrohilada sin entrecruzamiento. ....	25
Figura 3.2. Andamios entrecruzados antes del lavado. (A) 3 h, (B) 6 h, (C) 48 h, (D) 72 h. ....	26
Figura 3.3. Andamios de gelatina electrohilada después del proceso de entrecruzamiento y lavado. (A) sin entrecruzar. (B) entrecruzado 3 h. (C) entrecruzado 6 h. (D) entrecruzado 9 h. (E) entrecruzado 12 h. (F) entrecruzado 24 h. (G) entrecruzado 48 h. (H) entrecruzado 72 h. ....	27
Figura 3.4. Imágenes SEM de los andamios después del proceso de entrecruzamiento y lavado. (A) 3 horas, (B) 6 horas, (C) 9 horas, (D) 12 horas, (E) 24 horas, (F) 48 horas. ....	28
Figura 3.5. Fibras de gelatina entrecruzadas por 48 horas con GTA. ....	29
Figura 3.6. Espectro IR del andamio de gelatina sin entrecruzar. ....	30
Figura 3.7. Espectros IR de los andamios de gelatina entrecruzada y sin entrecruzar. ....	31
Figura 3.8. Ángulos de contacto de los andamios de gelatina a través del tiempo. .....	32
Figura 3.9. Viales con la solución de ninhidrina luego de reaccionar con los grupos amina de los andamios de gelatina. El primer vial del lado izquierdo corresponde a	

la solución de referencia. El color más intenso corresponde a la membrana de gelatina sin entrecruzamiento y el menos intenso a la membrana entrecruzada por más tiempo..... 33

Figura 3.10. Curvas de esfuerzo-deformación a tensión de los andamios..... 35

Figura 3.11. Porcentaje de pérdida de masa de los andamios..... 37



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Parámetros del proceso de electrohilado y su efecto [25].	9
Tabla 1.2. Componentes de la gelatina.	11
Tabla 1.3. Propiedades de la gelatina a tensión [28].	13
Tabla 2.1. Parámetros de electrohilado.	20
Tabla 3.1. Principales picos IR de la gelatina.	30
Tabla 3.2. Absorbancia UV de las soluciones del ensayo de ninhidrina.	34
Tabla 3.3. Propiedades mecánicas de los andamios de gelatina.	35

## **RESUMEN**

En este trabajo se estudió el efecto que tiene el grado de entrecruzamiento de las moléculas de gelatina de membranas electrohiladas sobre su resistencia a la degradación, resistencia a tensión y carácter hidrofílico. Para ello se fabricaron películas de gelatina con la técnica de electrohilado a partir de una solución de gelatina en trifluoroetanol (TFE). Estas membranas fueron entrecruzadas con glutaraldehído (GTA) colocándolas en un ambiente de vapor de GTA y dejándolas reaccionar por distintos periodos de tiempo: 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas. Después de retirar las membranas, fueron lavadas durante una hora para eliminar residuos de GTA y del solvente utilizado para el electrohilado. Las propiedades químicas de las membranas fueron estudiadas por un análisis FTIR, el carácter hidrofílico mediante el ángulo de contacto con la técnica de semiángulo, la resistencia a la degradación se estudió con una prueba de pérdida de masa, en la cual se cortaron las películas en muestras de 1 cm<sup>2</sup> y fueron puestos en fosfato búfer salino (PBS) y se mantuvieron a 37 °C en una incubadora. Las muestras fueron retiradas después de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas y se calculó la pérdida de masa. El grado de entrecruzamiento se estimó por medio de un ensayo de ninhidrina en el cual se midió la absorción de ondas UV a 570 nm. Las membranas no presentaron cambios químicos ni en su carácter hidrofílico después del entrecruzamiento, tanto la resistencia a la tensión como la resistencia a la degradación incrementaron directamente con el grado de entrecruzamiento.

## **ABSTRACT**

In this work was studied the effect of the crosslinking-degree on the degradation resistance, stress strength and hydrophilicity of electrospun gelatin membranes. Gelatin films were elaborated by electrospinning from a solution of gelatin in trifluoroethanol (TFE). These membranes were crosslinked with glutaraldehyde (GTA) in an environment filled with GTA vapor and reacting by different time periods: 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 hours. After that, the membranes were rinsed by 1 hour to remove waste from the GTA and TFE. The chemical properties of the membranes were studied by a FTIR analysis, the hydrophilicity by contact angle with the half angle method, the degradation resistance was studied with a loss of mass test, samples of 1 cm<sup>2</sup> were cut from the membranes and placed in an incubator at 37 °C within a phosphate-buffered saline (PBS) medium. Samples were withdrawn after 1, 2, 3, 4, 5 and 6 weeks and the mass loss was calculated. Crosslinking-degree was estimated by a Ninhydrin assay with absorbance of UV radiation at 570 nm. The membranes didn't show chemical changes after crosslinking, both the stress strength and degradation resistance were improved with the increase in the crosslinking-degree.

# INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular es un campo de estudio con el potencial de reparar y crear tejidos y órganos [1]. Esto se lleva a cabo combinando los principios de las ciencias de la vida con los de ingeniería, para crear materiales y técnicas que ayuden a reparar, reemplazar, mantener o mejorar tejidos y órganos enfermos o dañados [2].

Uno de los principales puntos en el que se basa la ingeniería tisular, es utilizar un andamio o soporte al que se le siembran células y moléculas biológicamente activas biológicamente. [3]. Las características que debe reunir un buen andamio son: 1) tener poros interconectados que permitan el suministro de nutrientes y metabolitos y que permitan el crecimiento celular; 2) el tamaño del poro debe ser de 5 a 10 veces el diámetro de la célula; 3) la superficie del andamio debe favorecer la adhesión, diferenciación y proliferación celular; 4) el material con el que es elaborado debe tener un tiempo de degradación apropiado que permita que el tejido reemplace eventualmente al andamio [4].

La ingeniería tisular puede aplicarse en la regeneración de varios órganos vitales, entre ellos la piel, el órgano más extenso del cuerpo. La piel, entre muchas funciones complejas incluyendo la respuesta inmune, brinda protección contra el medio ambiente [5]. La pérdida o el daño de grandes porciones de esta barrera son perjudiciales para la salud y pueden llegar a provocar la muerte. Es evidente que en heridas extensas se requiere una barrera que brinde la protección que cumple la piel y ayude en su recuperación. Una de las técnicas más populares recientemente, es cubrir la herida con un andamio biocompatible, el cual sirve de barrera protectora a la vez que promueve la regeneración del tejido cutáneo en la zona. Estos andamios pueden ser elaborados con polímeros biocompatibles, entre ellos el colágeno y la gelatina, pues el colágeno está presente en la matriz extracelular de la dermis y la gelatina es obtenida de la desnaturalización del primero, por lo que resultan útiles como materiales para andamios en la regeneración de tejidos [6, 7].

Uno de los principales problemas, tanto del colágeno como de la gelatina es que se degradan rápidamente en el cuerpo por hidrólisis y la acción de enzimas como las proteasas [8]. Las matrices deben ser estabilizadas al ser implantadas para su uso a tiempos largos, esto se logra realizando un entrecruzamiento molecular en las macromoléculas de la gelatina [9, 10].

El tratamiento con glutaraldehído ha sido utilizado ampliamente ya que es rápido, barato y eficiente, sin embargo, se incorpora a su estructura y puede ser liberado al degradarse por hidrólisis, además moléculas de glutaraldehído residual pueden quedar adheridas en el material y reaccionar con las células, lo que causa incompatibilidad, inflamación, limitar el crecimiento celular y citotoxicidad. Debido a lo anterior es importante incorporar la menor cantidad de glutaraldehído posible en los andamios, pero que sea lo suficiente para darle la estabilidad necesaria para su uso en ingeniería tisular [11].

Tanto el colágeno como la gelatina presentan una resistencia mecánica baja, por esta razón suele agregarse otro polímero biocompatible al andamio que le brinde la resistencia mecánica necesaria para su uso [12]. En este trabajo se consideró el uso de un andamio electrohilado bicapa de PCL/Gelatina como apósito para la regeneración de tejido cutáneo, la gelatina se entrecruzó con glutaraldehído utilizando diferentes tiempos de entrecruzamiento. Debido a que el tiempo de degradación de la PCL es de alrededor de 2 años en fosfato buffer salino (PBS) a 37 °C (pH = 7.4), el estudio se centró en la gelatina y cómo afecta el grado de entrecruzamiento su tiempo de degradación.

# Capítulo 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. Ingeniería Tisular

La ingeniería tisular es un campo de estudio con el potencial de reparar y crear tejidos y órganos [1]. Esto se lleva a cabo combinando los principios de las ciencias de la vida con los de ingeniería, para crear materiales y técnicas que ayuden a reparar, reemplazar, mantener o mejorar tejidos y órganos enfermos o dañados [2]. Los avances en ésta área involucran investigaciones en múltiples disciplinas, incluyendo la biología celular, biomateriales, imagenología y caracterización de superficies e interacción celular [13].

Las estrategias generales adoptadas por la ingeniería tisular pueden ser clasificadas en tres grupos: 1) Implante de células aisladas o células sustitutas en el organismo; 2) Suministro de sustancias inductoras de tejido; 3) Colocar células en diferentes matrices con sustancias activas (Figura 1.1). La última estrategia es la más frecuentemente asociada con la ingeniería tisular. El diseño y la fabricación de andamios son las áreas principales de la ciencia de biomateriales [13].

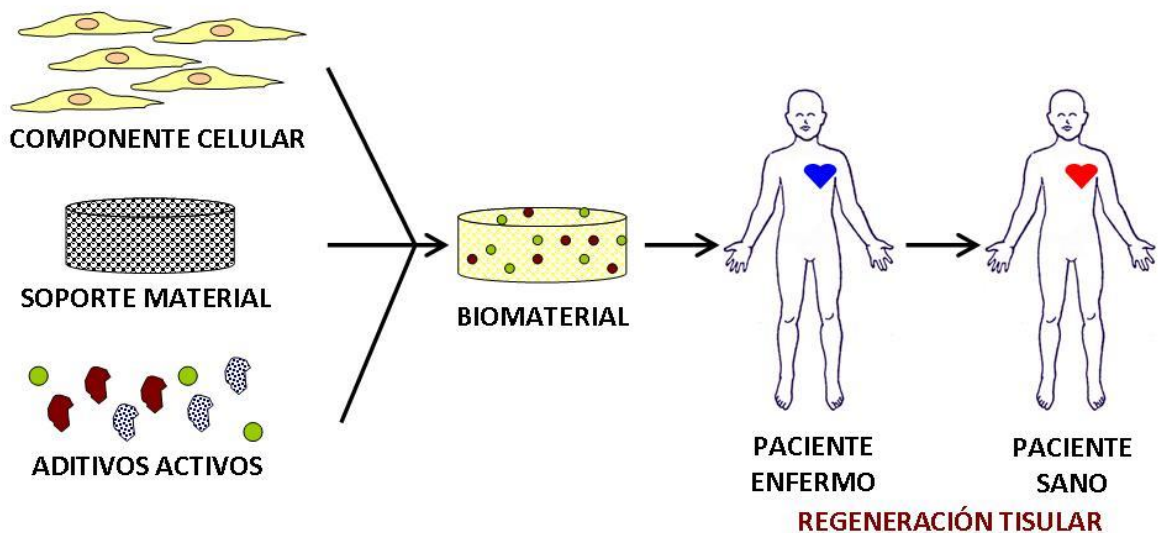


Figura 1.1. Esquema de los componentes de un andamio en ingeniería tisular [14].

La función del andamio es brindarle una zona de anclaje, protección y un ambiente en el cual las células puedan desarrollarse, así como direccionar su crecimiento. Las células contenidas en el andamio deben ser capaces de diferenciarse en células específicas del tejido que se requiere, por esto, generalmente son utilizadas células madre. Las sustancias inductoras de tejido, en general son factores de crecimiento, su función es estimular a las células a que proliferen y se diferencien adecuadamente para formar el tejido requerido. Las características del andamio son cruciales para la creación de tejidos y órganos de formas y tamaños deseados [3].

### **Porosidad y tamaño de poro**

La estructura porosa del andamio es un factor muy importante, pues gobierna la difusión de nutrientes, eliminación de sustancias de desecho, exclusión de materiales o células, transporte de proteínas y migración celular [15]. El tamaño del poro mínimo suele estar determinado por el diámetro de las células, que varía por cada tipo de célula. Si los poros son demasiado pequeños, las células podrían no penetrar en el andamio y si son demasiado grandes podrían no adherirse [16].

El tamaño de poro ideal, es un tema que aún se encuentra en debate, sin embargo, algunos autores sugieren que debe ser de 5 a 10 veces el diámetro de la célula, para permitir que ésta pueda anclarse adecuadamente [4]. Diversos estudios proponen que el tamaño de poro óptimo para la neovascularización de un tejido es de 5  $\mu\text{m}$ . Mientras que para la proliferación de fibroblastos se requiere de un tamaño entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ .

### **Biodegradabilidad**

El material para fabricar un andamio en ingeniería tisular debe ser elegido de forma que se degrade a una velocidad controlada, al mismo tiempo que las células del tejido específico implantadas se propaguen, reproduzcan y desarrollen. Si la degradación del material libera subproductos ácidos de forma masiva en el cuerpo, y la capacidad el tejido de eliminar estos subproductos es baja, ya sea por la pobre

vascularización o una baja actividad metabólica, puede conducir a perturbaciones temporales en el organismo, como una reacción de inflamación [15].

La velocidad de degradación del andamio puede ser afectada por diversos parámetros: la naturaleza y cantidad de enlaces que pueden ser rotos por hidrólisis o la acción de enzimas, el grado de hidrofiliidad de la superficie, la presencia y cantidad de zonas tanto cristalinas como amorfas, entre otras [16].

### **Propiedades mecánicas**

Un andamio ideal debe ser mecánicamente estable y capaz de cumplir su función biológica en el sitio de implantación, la matriz extracelular rodea a las células para proveerles soporte mecánico y regular la actividad celular. La estabilidad mecánica depende principalmente de la selección del biomaterial, la arquitectura del diseño y las interacciones entre las células y el material. El fin del diseño de andamios es producir una estructura ideal que pueda reemplazar la matriz extracelular hasta que las células puedan repoblar y sintetizar una nueva matriz natural [17].

Muchas células se extienden, adhieren y sobreviven mejor en matrices rígidas ( $E > 50 \text{ Pa}$ ). Sin embargo, no todos los tipos de células parecen ser sensibles a la rigidez del sustrato. Se ha demostrado en diferentes estudios que los fibroblastos generan una mejor adhesión y desarrollan una morfología más amplia y extendida en sustratos rígidos que en sustratos flexibles. También se demostró que las células migran preferentemente de un sustrato flexible a uno rígido [18,19].

Existen posturas que afirman que los andamios deben poseer características mecánicas muy similares a la matriz extracelular que van a sustituir [20,21], pero este es un tema que aún se encuentra en debate.

### **1.2. Electrohilado**

El electrohilado es un método simple y económico para producir fibras largas y uniformes. Puede utilizarse con casi cualquier polímero o mezcla de polímeros solubles para crear nanofibras. Las nanofibras proporcionan una alta relación de



área superficial a volumen, alta porosidad y baja densidad, que son factores importantes en el diseño de andamios para la ingeniería tisular [22].

En la Figura 1.2 se muestran los componentes principales de un equipo de electrohilado. El proceso consiste en inducir a una solución de polímero a vencer las fuerzas de tensión superficial a la salida de un capilar, mediante la aplicación de un campo eléctrico. Esto genera la formación de un chorro líquido de partículas cargadas, el cual se estira y sale disparado a través del campo eléctrico, el solvente se evapora durante este trayecto y segmentos de fibras son depositados en un colector [22,23].

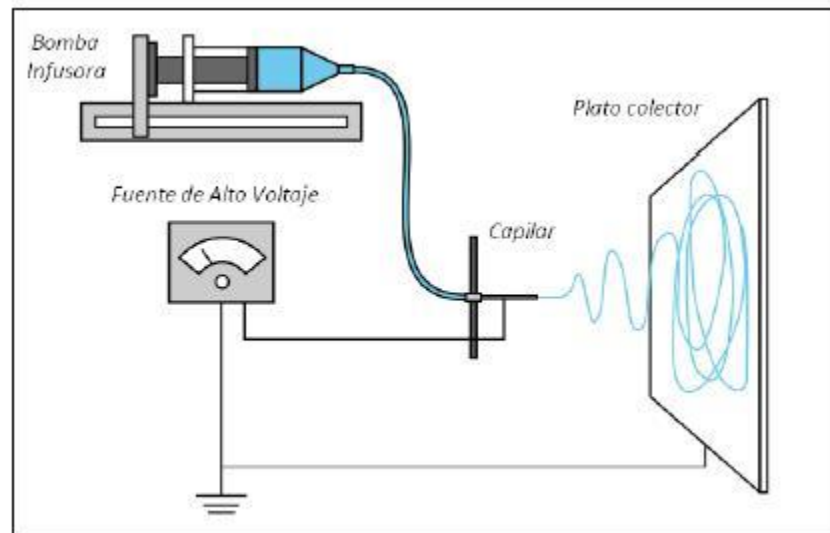


Figura 1.2. Componentes de un equipo de electrohilado [24].

Los andamios de nanofibras electrohiladas poseen alta porosidad (generalmente en un intervalo de 70 a 90 %), el principal problema de la técnica de electrohilado es su baja capacidad para formar estructuras tridimensionales, además de una baja infiltración celular en las capas más profundas. A pesar de esto, recientemente se ha reportado que las células pueden organizarse y adherirse bien alrededor de fibras con diámetros mucho más pequeños que el de las células [25].

En la Tabla 1.1 se muestran los parámetros que deben ser tomados en cuenta en el electrohilado y el efecto que tienen sobre la formación de las fibras.

Tabla 1.1. Parámetros del proceso de electrohilado y su efecto [26]. (↑) Incremento, (↓) Disminución.

<b>PARÁMETRO</b>		<b>EFECTO</b>
<b>VOLTAJE</b>	↑	Fibras gruesas, glóbulos, distorsión del chorro.
	↓	Poco impulso, las fibras no llegan al colector.
<b>RAPIDEZ DE INYECCIÓN</b>	↑	Fibras más gruesas y glóbulos con mayor tamaño.
	↓	Mayor tiempo para evaporación del solvente.
<b>DISTANCIA</b>	↑	Mayor estiramiento de la solución, obteniendo fibras más delgadas. Las fibras pueden romperse por su propio peso, aparición de glóbulos.
	↓	Fibras más gruesas. Aparición de glóbulos.
<b>CONCENTRACIÓN</b>	↑	Más viscosidad dificulta el paso de la solución a través del capilar y puede obstruirlo.
	↓	El chorro se rompe y no se generan fibras.
<b>CONDUCTIVIDAD</b>	↑	Mayor estiramiento del chorro, genera fibras más delgadas.
	↓	Menor estiramiento del chorro, genera fibras más gruesas.
<b>CONSTANTE DIELECTRICA DEL SOLVENTE</b>	↑	Reduce la formación de glóbulos y el diámetro de las fibras.
	↓	Aumenta la formación de glóbulos y el diámetro de las fibras.
<b>TENSIÓN SUPERFICIAL</b>	↑	Propicia la aparición de glóbulos en las fibras.

La masa molar de los polímeros tiene un efecto importante en las propiedades de las soluciones preparadas y afectan la morfología de las fibras obtenidas. El electrohilado se utiliza con polímeros de alta masa molar, ya que éstos proporcionan una viscosidad adecuada para la creación de las fibras. Al utilizar polímeros de muy baja masa molar, suelen obtenerse grumos en lugar de fibras, sin embargo, se ha reportado la obtención de fibras con polímeros de baja masa molar y se han empleado diversas técnicas para tratar con estos polímeros, como el uso del electrohilado simultáneo en el que un polímero de alta masa molar recubre a otro de baja masa molar, con la posterior eliminación del primero [27].

### 1.3. Gelatina

Las proteínas están conformadas por una estructura molecular constituida fundamentalmente por cadenas polipeptídicas, que están formadas por la unión repetida de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional única y la función específica de cada proteína. El enlace péptido se muestra en la Figura 1.3.

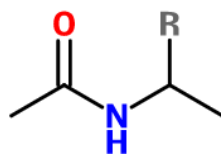


Figura 1.3. Estructura el enlace péptido.

Los aminoácidos se diferencian uno de otro por el sustituyente R; en la Tabla 1.2 se presentan los aminoácidos componentes de la gelatina y su presencia en una molécula de gelatina. Cuando los aminoácidos se unen para formar la cadena polimérica, dan lugar al enlace péptido, este enlace es desde el punto de vista químico, una amida. El grupo peptídico produce hasta nueve bandas características en los espectros infrarrojo, llamadas: A, B, I, II, III, IV, V, VI y VII. Las bandas Amida I y Amida II son las principales de los espectros IR en las proteínas.

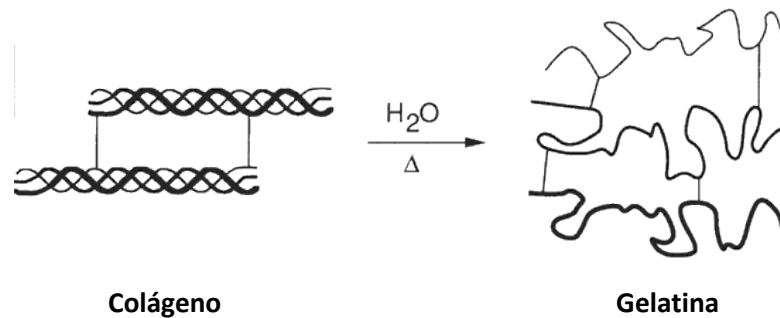
Tabla 1.2. Componentes de la gelatina [28].

<b>Aminoácido</b>	<b>Presencia (%)</b>
Glicina	21
Prolina	12
Hidroxiprolina	12
Ácido gultámico	10
Alanina	9
Arginina	8
Asparagina	6
Lisina	4
Serina	4
Leucina	3
Valina	2
Fenilalanina	2
Treonina	2
Isoleucina	1
Hidroxilisina	1
Metionina	< 1
Histidina	< 1
Tirosina	< 0.5

La gelatina es un biopolímero ampliamente usado debido a varias de sus propiedades, como su origen biológico, no inmunogenicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y disponibilidad comercial a un costo relativamente bajo. En la

industria farmacéutica es usado en selladores, portadores para liberación de fármacos, vendajes, etc. [10,29].

La gelatina es una proteína obtenida de la desnaturalización por calor e hidrólisis del colágeno, que es la proteína estructural más abundante de los mamíferos. Las propiedades del material varían dependiendo de la fuente y el proceso de obtención [29]. La estructura de triple hélice característica del colágeno es perdida durante la preparación de la gelatina, como se ejemplifica en la Figura 1.4, pero puede volver a formarse debajo de la temperatura de fusión. La rigidez de las películas y los geles de gelatina están íntimamente ligados al nivel de renaturalización [30]. Es rica en dominios que se enlazan a los receptores superficiales de las células y a otras proteínas de la matriz extracelular, como las fibronectinas, siendo así un excelente sustrato para la adhesión celular [10]. Es un polímero rígido, sus principales características se presentan en la Tabla 1.3.



*Figura 1.4. Desnaturalización del colágeno y formación de la gelatina [7].*

En general existen dos tipos de gelatina: tipo A y B, su principal diferencia es el punto isoeléctrico (IEP). Esta propiedad es determinada por los tratamientos y el proceso por el cual se obtiene la gelatina. Las gelatinas tipo A (tratamiento ácido) presentan un IEP entre 6 – 9.5. Las gelatinas tipo B (tratamiento alcalino) tienen un IEP entre 4.5 – 5.6. Difieren en la presencia o número de ciertos aminoácidos, debido a los tratamientos, lo cual hace que tengan más o menos grupos carbonilos.

Tabla 1.3. Propiedades de la gelatina a tensión [31].

Temperatura de descomposición (°C)	Módulo elástico (GPa)	Elongación (%)
~ 269	0.2	20.7

Uno de los problemas, tanto del colágeno como de la gelatina es que son altamente solubles en medios acuosos y se degradan rápidamente en el cuerpo debido a la hidrólisis (el proceso se muestra en la Figura 1.5) y la acción de enzimas como las proteasas [8]. Las matrices deben ser estabilizadas al ser implantadas para su uso a largos tiempos, esto se logra realizando un entrecruzamiento molecular en las macromoléculas de la gelatina [9,10].

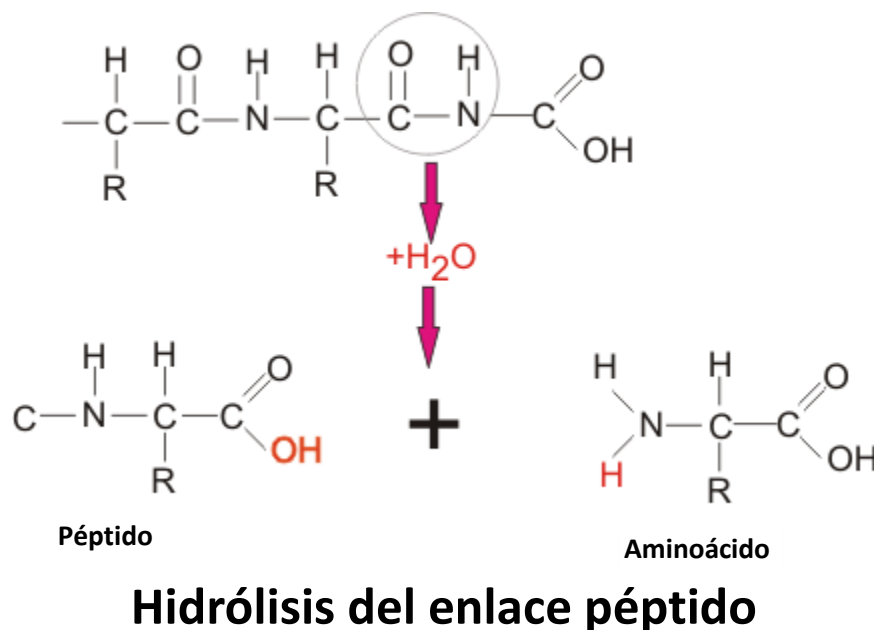


Figura 1.5. Proceso de hidrólisis del enlace péptido de las proteínas [32].

### Estabilización de las fibras

El entrecruzamiento es un proceso en el que las cadenas de un polímero quedan unidas entre sí por la formación de enlaces covalentes cruzados, generando enlaces químicos que antes no existían en el polímero, como se muestra en la

Figura 1.6. Se han empleado distintos métodos para conseguir el entrecruzamiento de la gelatina: químico, enzimático y físico. El tratamiento químico con glutaraldehído ha sido utilizado ampliamente ya que es rápido, barato, eficiente y disponible ampliamente [33]. Otra forma de realizar el entrecruzamiento es utilizando radiación ultravioleta, radiación  $\gamma$  y haces de rayos X, sin embargo, éstos métodos sólo modifican la superficie de la gelatina y su uso prolongado puede causar desnaturalización y ruptura de sus moléculas [7].

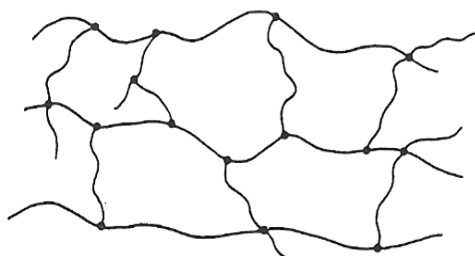


Figura 1.6. Cadenas poliméricas entrecruzadas.

El entrecruzamiento de gelatina con glutaraldehído involucra la reacción de grupos libres amino de aminoácidos de lisina e hidrolisina, así como residuos de la cadena polipéptida con los grupos aldehído del glutaraldehído, esto se ilustra en la Figura 1.7. Las aminas primarias reaccionan con los aldehídos para formar iminas. El mecanismo de la reacción se inicia con la adición nucleofílica de la amina al grupo carbonilo. A continuación, la protonación del oxígeno, seguida de la desprotonación de la amina, conduce a un producto inestable denominado carbinolamina que se convierte finalmente en la imina por protonación seguida de pérdida de agua [13].

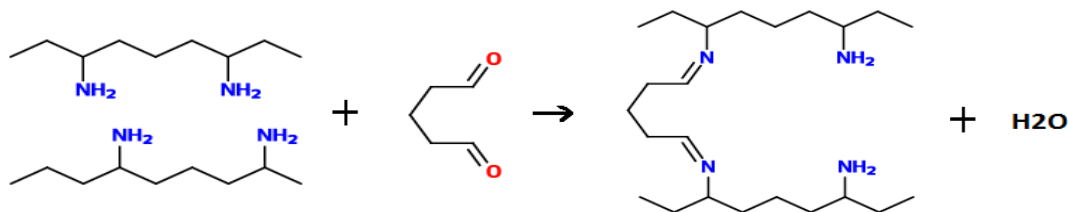


Figura 1.7. Reacción del glutaraldehído con la gelatina.

## **Toxicidad del GTA**

El entrecruzamiento de gelatina con GTA tiene el inconveniente que éste es incorporado a su estructura y las moléculas que no han reaccionado pueden causar incompatibilidad, inflamación, limitar el crecimiento celular y citotoxicidad [7,9,10]. La citotoxicidad puede ser debida a los grupos aldehído que permanecen activos después del proceso de entrecruzamiento y a la liberación de moléculas de GTA del material al degradarse.

En la literatura se ha reportado que los efectos citotóxicos por glutaraldehído han sido en general, debido a la utilización de altas concentraciones (3 ppm o 64 mg de GTA por gramo de polímero) [34,35]. En diversos estudios se determinó que el uso de glutaraldehído en bajas concentraciones puede ser ignorado, demostrando con pruebas de cultivo celular *in vivo* que las células son capaces de desarrollarse en andamios entrecruzados con GTA [36,37]. También se ha señalado que secar en horno de vacío durante algunas horas, realizar lavados con agua destilada y neutralizar los grupos aldehído con glicina, son métodos efectivos para eliminar los residuos de GTA y los grupos aldehído sin reaccionar después del entrecruzamiento [36,37].

Ulubayram et al., reportan que al incrementar la concentración de GTA en un 100% para entrecruzar esponjas de gelatina, hubo una disminución significativa en la proliferación celular y concluyeron que es importante controlar la cantidad de GTA que es incorporado al material [38]. Bigi et al., midieron la liberación de GTA en películas de gelatina entrecruzada utilizando concentraciones de 0.125% a 2.5% (m/m), después de 2 semanas las películas entrecruzadas con 2% y 2.5% liberaron 1% de GTA, en las películas entrecruzadas con menores concentraciones no encontraron liberación de GTA [39].

## **Determinación del grado de entrecruzamiento**

El grado de entrecruzamiento es la cantidad de enlaces intermoleculares generados a partir de los sitios reactivos, depende de la cantidad de agente entrecruzante presente y el tiempo de reacción. Se han empleado distintas pruebas



para determinar el grado de entrecruzamiento, como medir el grado de hinchamiento, cambios en las propiedades mecánicas o térmicas y el conteo de los sitios reactivos [40–43].

Para determinar el grado de entrecruzamiento en la gelatina, el método que más se ha utilizado es el conteo de los grupos amina libres por absorción de radiación ultravioleta. Se utiliza un ensayo de Ninhidrina, el cual es ampliamente utilizado para determinar grupos amina en proteínas. Éste ensayo consiste en poner en contacto una solución de Ninhidrina con la gelatina, los grupos amina libres reaccionan y pintan la solución con un color azul-morado, mientras más grupos amina se encuentren disponibles para la reacción, el color será más intenso. Esta solución absorbe radiación ultravioleta con una longitud de onda de 570 nm [44], [45].

# HIPÓTESIS

El aumento del grado de entrecruzamiento de andamios hechos de gelatina electrohilada, ocasiona un aumento en el tiempo de degradación del andamio, entonces, debe haber un valor de entrecruzamiento de la gelatina, para el cual el cambio del tiempo de degradación disminuye y, posteriormente tenderá a un valor constante. Esto permitirá reducir la cantidad de GTA añadido a la gelatina para que se lleve a cabo su entrecruzado y, facilitará la eliminación residual de GTA de la misma.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar el efecto del grado de entrecruzamiento de películas de gelatina electrohilada usando glutaraldehído como agente entrecruzante, en su resistencia a la degradación *in vitro*.

### Objetivos específicos

- Entrecruzamiento de las fibras de gelatina con glutaraldehído.
- Caracterización química y superficial de las películas.
  - FTIR ATR. Determinación de cambios en la estructura química de las películas.
  - Ángulo de contacto. Determinación del carácter hidrofílico de las películas utilizando la técnica de semiángulo.
- Determinación del grado de entrecruzamiento de las películas por medio de un ensayo de Ninhidrina, utilizando la metodología de Dash et al. [42].
- Caracterización mecánica de las películas.
  - Resistencia mecánica. Determinación del módulo elástico por ensayo de esfuerzo-deformación a tensión.
- Estudio de degradación. Pruebas de pérdida de masa en buffer fosfato salino (PBS) a 37°C y 7.4 pH, utilizando la metodología de Bigi et al. [39].



## Capítulo 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 2.1. Materiales

Los andamios fueron elaborados con gelatina tipo A de piel de cerdo usando trifluoroetanol (TFE) como solvente (Pureza > 99%). Se utilizó glutaraldehído (GTA) al 25% en agua como agente entrecruzante. También se utilizaron Carbonato de Sodio (Pureza > 99.5%) para eliminar el solvente residual y Glicina (Pureza 99%) para desactivar los grupos aldehídos sin reaccionar. Todos los materiales fueron comprados de la marca Sigma Aldrich ®.

### 2.2. Metodología

En la Figura 2.1 se presenta un esquema que resume las etapas generales de la metodología utilizada este trabajo.

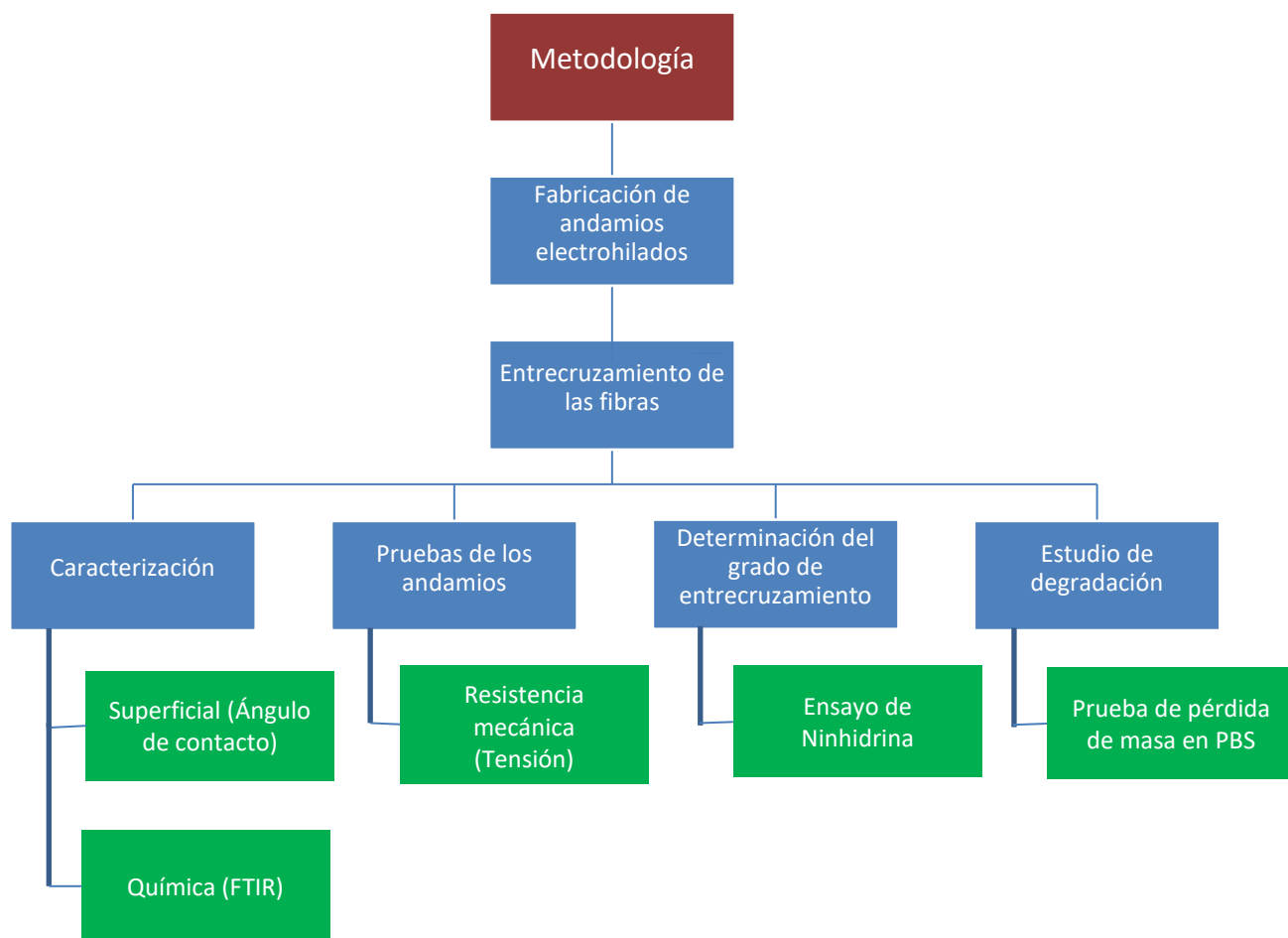


Figura 2.1. Esquema de las etapas generales del desarrollo de la parte experimental.

### 2.3. Fabricación de los andamios electrohilados

El procedimiento que se siguió para fabricar los andamios se explica a continuación. Se preparó una solución de gelatina en TFE a una concentración de 10% (m/v) y se dejó en agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente (25° C). La solución se colocó en una jeringa de 10 ml y se electrohiló durante 8 horas en un colector plano, utilizando los parámetros de la Tabla 2.1 [13].

Voltaje (kV)	Distancia al colector (cm)	Rapidez de inyección (ml/h)	Diámetro inferior de la aguja (mm)
<b>10</b>	15	0.8	0.9

Tabla 2.1. Parámetros de electrohilado.

### 2.4. Entrecruzamiento de las fibras de gelatina

El procedimiento de entrecruzamiento de los andamios electrohilados se llevó a cabo de la siguiente forma:

1. Se colocaron los andamios de gelatina en un desecador junto con un vial que contenía 10 ml de una solución de glutaraldehído al 25% (m/m) en agua.
2. El desecador fue sellado a vacío usando una bomba y se mantuvo a temperatura ambiente (25° C).
3. Los andamios permanecieron en el desecador 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas para ser entrecruzados con los vapores del GTA.
4. Después del tiempo de exposición, el desecador fue abierto en una campana de vacío, se retiró el vial con la solución de GTA y se dejaron secar los andamios en la campana durante 2 horas.
5. Posteriormente se lavaron los andamios con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro y se dejaron secar al aire.
6. Finalmente los andamios fueron colocados en un horno de vacío a 37° C durante 48 horas.

## **2.5. Inactivación de los grupos aldehído**

Los andamios entrecruzados fueron colocados en una solución acuosa de glicina al 0.2 M durante una hora a 24 °C. Posteriormente fueron lavados con 150 ml de agua destilada durante una hora. Finalmente los andamios fueron secados en un horno de vacío durante 48 horas a 37 °C.

## **2.6. Eliminación del solvente residual**

Se colocaron los andamios entrecruzados con GTA en una solución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5M, durante 3 horas a 24 °C. Posteriormente, los andamios fueron lavados con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro.

## **2.7. Caracterizaciones**

### ***2.7.1. Espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR)***

Este estudio se realizó a los andamios con el fin de visualizar algún cambio químico en la estructura después del entrecruzamiento. Se llevó a cabo mediante la técnica de reflexión total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance). Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo (Nicolet 8700), en el cual se colocaron los andamios en un cristal selenuro de zinc (ZnSe), en un intervalo de 600 cm<sup>-1</sup> a 4000 cm<sup>-1</sup>, con 10 barridos a una resolución de 1.928 cm<sup>-1</sup>.

### ***2.7.2. Caracterización morfológica***

La caracterización morfológica de los andamios fue realizada utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) JEOL JSM-6360LV a un voltaje de 25 kV. Se cortaron cuadrados de 1 cm<sup>2</sup> de los andamios y fueron recubiertos con una capa fina de partículas de oro durante 60 segundos para hacer a las muestras conductoras.

### ***2.7.3. Caracterización superficial***

Se realizó mediante la técnica de ángulo de contacto. Las pruebas se realizaron en un medidor de ángulo de contacto “Tantec’s Cam Plus Micro”, que utiliza la técnica del semiángulo. Una gota de agua desionizada de 5 µl fue aplicada

con una pipeta Pasteur a muestras de 3 cm<sup>2</sup>. Para cada muestra, se realizaron 8 mediciones en los 10 segundos posteriores a que se colocó la gota.

#### ***2.7.4. Distribución de diámetros***

Se llevó a cabo utilizando un método manual, utilizando el programa de análisis de imagen "ImageJ" con las imágenes obtenidas por SEM de la siguiente manera:

1. Se correlacionó el valor de la barra de escala en  $\mu\text{m}$  de la micrografía con el número de pixeles que detecta el programa.
2. Se trazó una rejilla para orientarse en la imagen, de 5  $\mu\text{m}^2$  por división.
3. Se convirtió la imagen a una imagen binaria, para tener mayor contraste.
4. Se realizó un aumento de entre 4000 y 5000 ampliaciones.
5. Se seleccionó una fibra dentro del primer cuadro de la rejilla y se midió la distancia entre ambos lados perpendicular al eje de la fibra.
6. Se realizaron 100 mediciones del punto anterior.
7. Se obtuvo el promedio de las mediciones.

#### ***2.7.5. Prueba de degradación***

El proceso que se utilizó para esta prueba se resume a continuación:

1. Se cortaron muestras de los andamios de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>.
2. Las muestras fueron secadas durante 48 h en un horno de vacío a 37 °C.
3. Se midió la masa inicial de las muestras ( $W_i$ ) en una balanza de 4 decimales.
4. Se colocaron las muestras en un vial y se añadieron 5 ml de fosfato buffer salino (PBS) a un pH de 7.4, el cual se renovó cada semana.
5. Se pusieron los viales en una incubadora a 37 °C. Después de 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días se retiraron las muestras de la incubadora. Las muestras fueron lavadas con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente (25 °C) durante 24 horas.

6. Posteriormente, se secaron las muestras en un horno de vacío a 37 °C durante 48 horas.
7. Se midió la masa final ( $W_f$ ) de las muestras. Se realizaron 10 réplicas por cada tiempo ensayado.

La degradación de la gelatina se calculó determinando el porcentaje de pérdida de masa de cada una de las muestras se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de pérdida (\%)} = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \times 100 \quad (1)$$

#### **2.7.6. Determinación del grado de entrecruzamiento**

El grado de entrecruzamiento fue medido utilizando un ensayo de Ninhidrina que se realizó de la siguiente manera [42]:

1. Se preparó una solución de Ninhidrina en etanol en una concentración de 1.5 % m/v, se agitó manualmente hasta que la solución quedó uniforme.
2. Se cortaron pedazos de 25 mm<sup>2</sup> de los andamios, se pusieron en viales hasta alcanzar 5 mg y se le agregó 1 ml de la solución de Ninhidrina.
3. Los viales fueron calentados a 80 °C durante 25 minutos a baño maría, al terminar se dejaron enfriar durante 1 hora a temperatura ambiente (25 °C).
4. Se diluyó la solución obtenida con 8 ml de agua destilada. Se midió la absorbancia de UV a 570 nm de la solución de cada muestra utilizando un equipo UV/VIS Spectrometer.

Se hicieron 10 repeticiones por cada tiempo de entrecruzamiento de los andamios. El grado de entrecruzamiento se calculó con la siguiente fórmula, utilizada por Dash et al., y Huang et al. [42,46]:

$$\begin{aligned} \text{Grado de entrecruzamiento (\%)} & \quad (2) \\ & = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra entrecruzada}}{\text{Absorbancia de la muestra no entrecruzada}} \right) \right] \times 100 \end{aligned}$$



### ***2.7.7. Resistencia mecánica***

Las propiedades mecánicas de los andamios fueron determinadas utilizando una máquina de pruebas universal (Autograph AGS-X de Shimadzu) de la siguiente manera:

1. Utilizando cinta adhesiva doble cara, los andamios fueron colocados en soportes en forma de marco de cartón.
2. Las dimensiones de las muestras fueron de 2 cm de largo y 1 cm de ancho, medidos con un vernier digital marca y modelo MITUTOYO 500-196-20 de 0.01 mm de resolución.
3. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando una rapidez de deformación de 5 mm/min, utilizando una celda de 100 N y temperatura ambiente (25 °C). Cinco muestras se ensayaron para cada tipo de membrana electrohilada.
4. Las curvas de esfuerzo-deformación se representaron gráficamente y se estimó el módulo elástico mediante la determinación de la pendiente de la zona elástica de las curvas.

## Capítulo 3. RESULTADOS

### 3.1. Obtención de los andamios de gelatina electrohilada

A continuación se presentan las imágenes SEM de fibras de gelatina de un andamio electrohilado, así como el histograma de distribución de diámetros de las fibras, Figura 3.1. Las fibras obtenidas son uniformes, libres de glóbulos, de apariencia cilíndrica y con superficie lisa. Los diámetros de las fibras presentan un promedio de  $602 \pm 150$  nm.

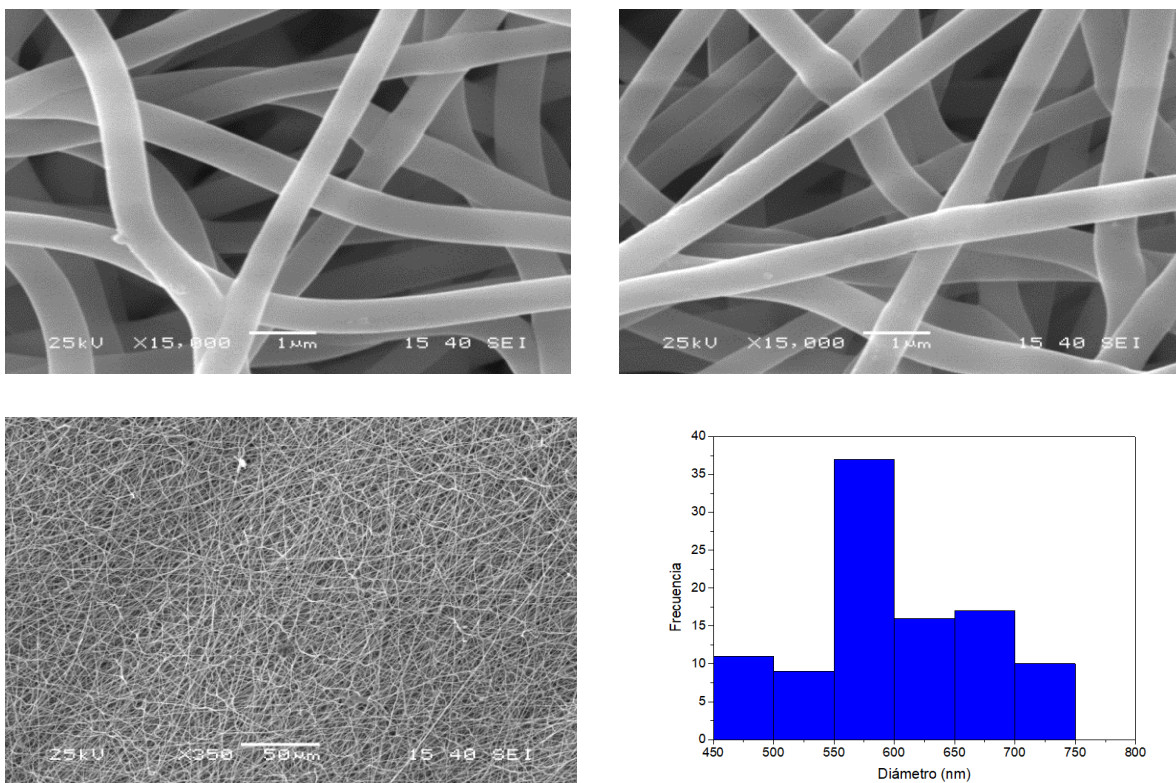


Figura 3.1. Imágenes SEM de las fibras del andamio de gelatina electrohilada sin entrecruzamiento.

La gelatina normalmente es traslúcida, pues sus cadenas tienen una estructura amorfa, sin embargo, las membranas electrohiladas de gelatina tienen un color blanco opaco. Este cambio pudiera atribuirse a que en el proceso de electrohilado las cadenas poliméricas son sometidas a una fuerza cortante muy alta, estirándolas y creando una estructura ordenada, similar a cristales alargados. Este ordenamiento combinado con la rápida evaporación del solvente y la solidificación

de las macromoléculas, impide que regresen a su estado relajado, dándole ese aspecto opaco a las membranas [26].

### 3.2. Entrecruzamiento de las fibras

Se observa un cambio en el color de los andamios después del proceso de entrecruzamiento con GTA, pasando de blanco a un tono amarillo, Figura 3.3. Esto puede atribuirse a la creación de enlaces imina ( $\text{CH}=\text{N}$ ) entre los grupos amina libres de la proteína y los grupos aldehído del GTA. Conforme aumenta el tiempo del entrecruzamiento de los andamios puede observarse que el tono del color amarillo va incrementando, lo que puede deberse a la creación de una mayor cantidad de enlaces imina [11,13].

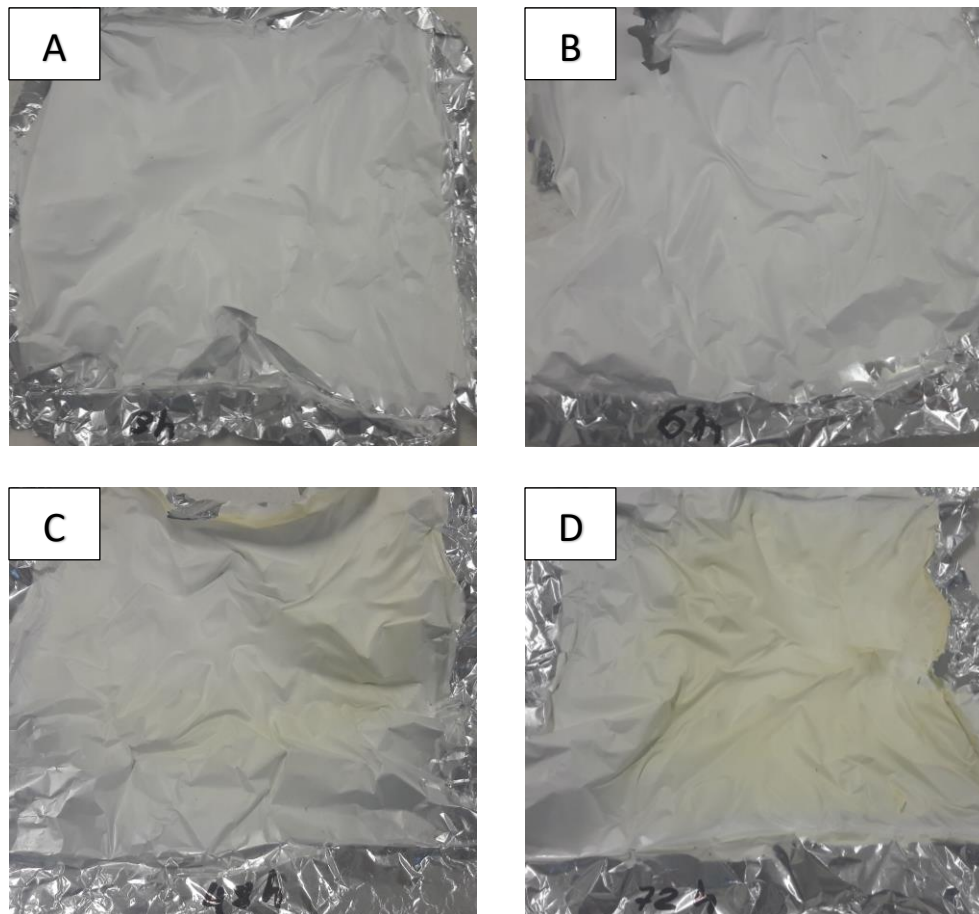


Figura 3.2. Andamios entrecruzados antes del lavado. (A) 3 h, (B) 6 h, (C) 48 h, (D) 72 h.

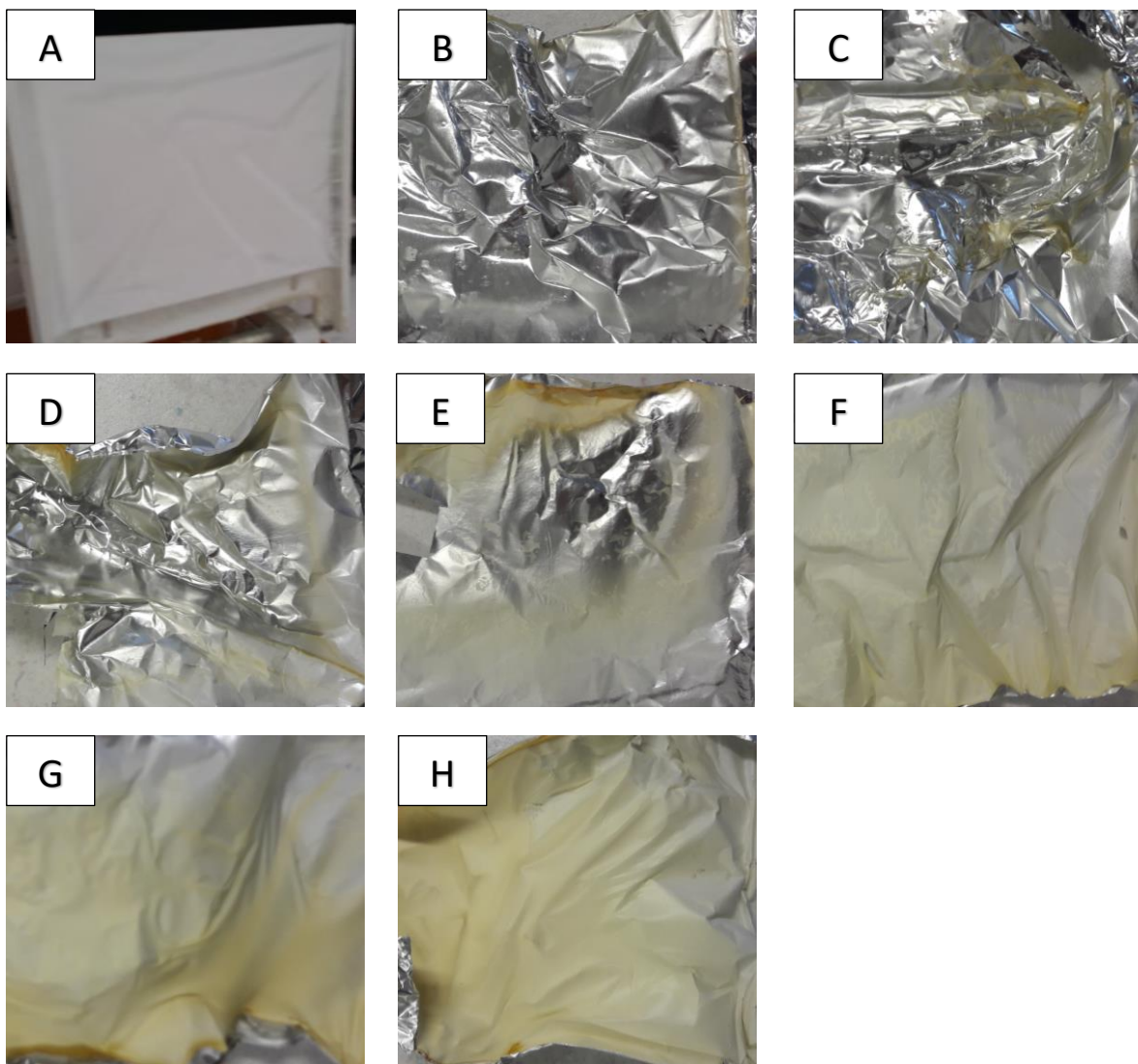


Figura 3.3. Andamios de gelatina electrohilada después del proceso de entrecruzamiento y lavado. (A) sin entrecruzar. Entrecruzado (B) 3 h. (C) 6 h. (D) 9 h. (E) 12 h. (F) 24 h. (G) 48 h. (H) 72 h.

Puede observarse en las Figuras 3.2 y 3.3, que los andamios entrecruzados por menos de 48 horas no mantienen su morfología después del lavado con agua destilada, mientras que al aumentar el tiempo de entrecruzamiento se mantienen opacos, lo que sugiere que efectivamente los andamios que permanecieron más tiempo expuestos al vapor de GTA están más entrecruzados y son más insolubles que los que permanecieron menos tiempo expuestos. La razón por la que los andamios entrecruzados por menos tiempo se vuelven más transparentes se pudiera deber a la pérdida de la estructura ordenada de las moléculas de gelatina creadas durante el proceso de electrohilado, por su mayor solubilidad en agua,

como lo menciona Li et al [26]. Esto también es evidente al observar la Figura 3.4 en donde se aprecia que los andamios más entrecruzados mantienen mejor su morfología tisular.

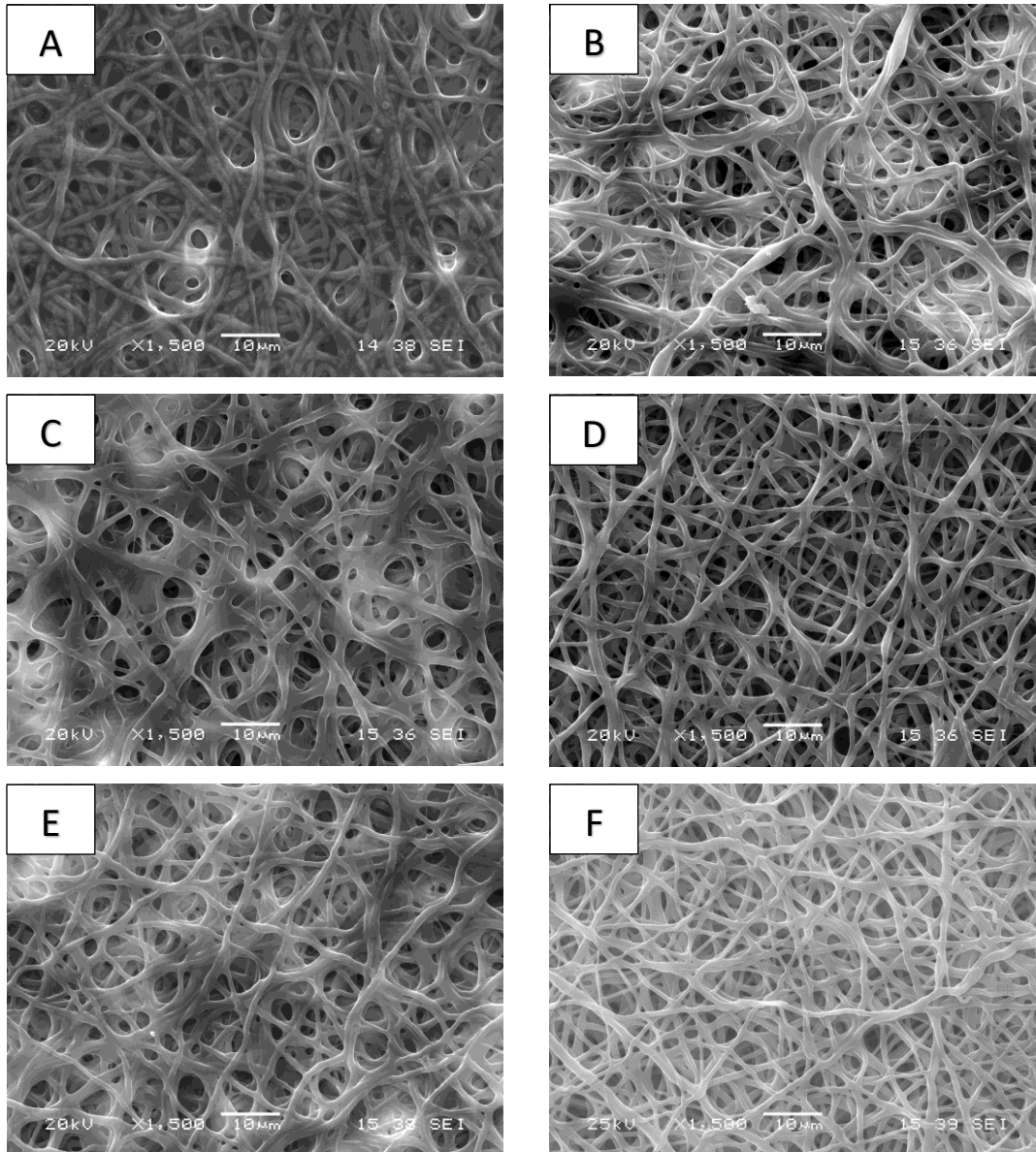
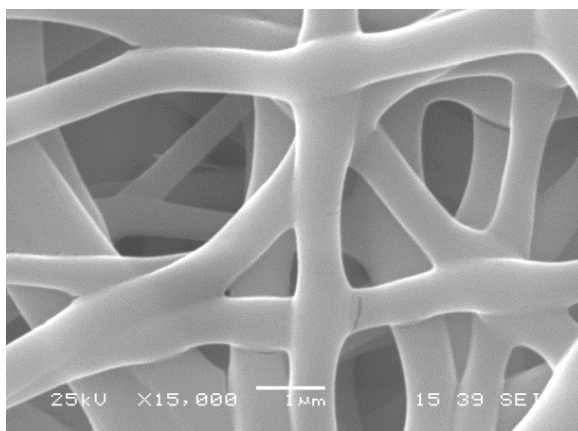


Figura 3.4. Imágenes SEM de los andamios después del proceso de entrecruzamiento y lavado. (A) 3 horas, (B) 6 horas, (C) 9 horas, (D) 12 horas, (E) 24 horas, (F) 48 horas.

Puede verse en la Figura 3.4 que las fibras tienen un cambio en su morfología después del proceso de entrecruzamiento y lavado de los andamios, la estructura fibrilar y los poros se pierden parcialmente, principalmente en los andamios

entrecruzados durante menos tiempo. Únicamente en los tiempos de 48 y 12 horas se mantienen casi sin cambios, en la Figura 3.5 puede observarse la estructura fibrilar de los andamios entrecruzados por 48 horas después del lavado. La razón de que el andamio de 12 horas mantenga mejor su morfología que el de 24 horas puede ser porque existen zonas más entrecruzadas que otras, como sugiere la Figura 3.3(E), en donde puede verse que el color del andamio no es uniforme, mostrando zonas opacas y otras más transparentes.



*Figura 3.5. Fibras de gelatina entrecruzadas por 48 horas con GTA.*

### **3.3. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR-ATR)**

En la Figura 3.6, se presenta el espectro infrarrojo (IR) del andamio de gelatina electrohilada sin entrecruzar y sus principales picos se encuentran descritos en la Tabla 3.1 [15].

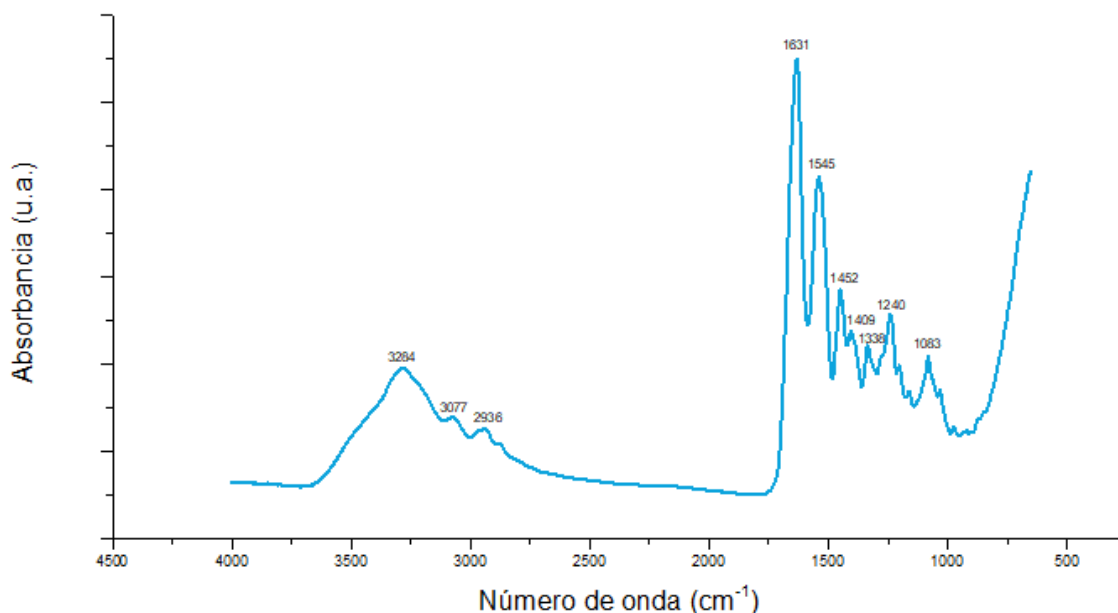


Figura 3.6. Espectro IR del andamio de gelatina sin entrecruzar.

Tipo de enlace	Experimental	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
Estiramiento N-H	3284	3300-3500
Estiramiento C-H	3077	3000-3250
Estiramiento asimétrico CH <sub>2</sub>	2936	2750-3000
Estiramiento C=O (Amida I)	1631	1635
Flexión N-H y Estiramiento C-N (Amida II)	1545	1500-1600
Flexión CH <sub>2</sub>	1452	1455
Deformaciones CH <sub>2</sub>	1338	1338
Estiramiento C-N (Amida III)	1240	1240
Amida	1083	1000-1100

Tabla 3.1. Principales picos IR de la gelatina.

Los picos que presenta el espectro IR coinciden con los valores o intervalos reportados en la literatura para la gelatina tipo A electrohilada [47]. En la figura 3.7 se muestran los espectros IR de los andamios entrecruzados a diferentes tiempos y el andamio sin entrecruzar para una comparación.

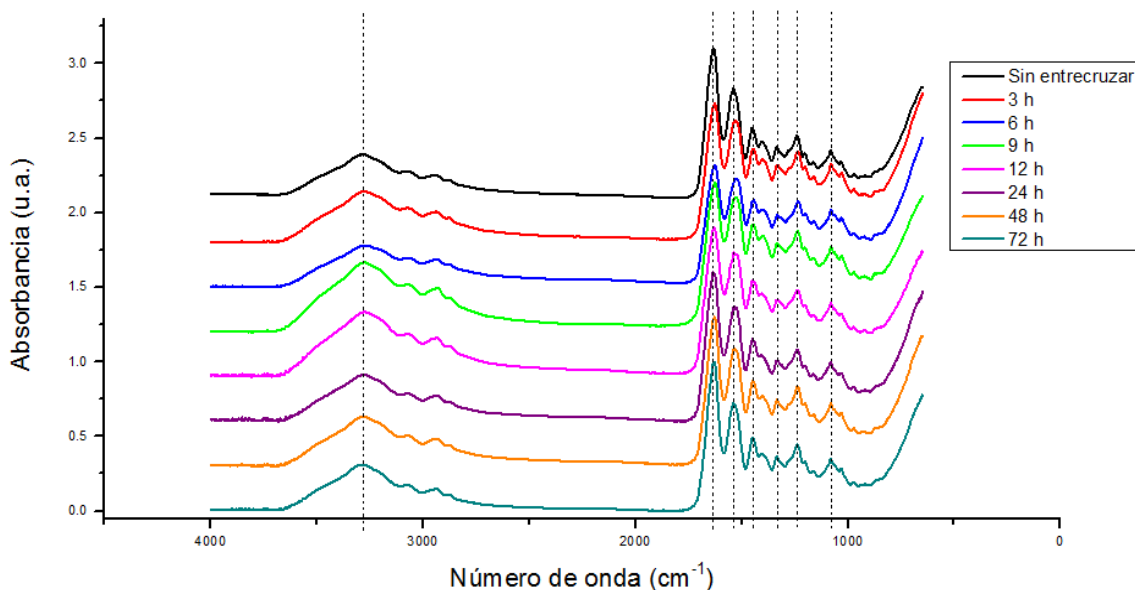


Figura 3.7. Espectros IR de los andamios de gelatina entrecruzada y sin entrecruzar.

No se observa un cambio en la estructura de los andamios de gelatina con los espectros IR obtenidos como se muestra en la Figura 3.7. El pico relacionado con los enlaces imida debería aparecer entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1680\text{ cm}^{-1}$ , sin embargo, éste no logra apreciarse, lo que podría deberse a un traslape con el pico característico de  $1631\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la banda Amida I o que la cantidad de enlaces formados es muy pequeña y la técnica utilizada no es lo suficientemente sensible para detectarlos [13], la técnica de resonancia magnética nuclear pudiera ofrecer mejores resultados para visualizar éstos enlaces.

### 3.4. Caracterización superficial

Para el cultivo celular se requiere de un material hidrofílico, por lo que se realizó la prueba de ángulo de contacto para determinar el carácter hidrofílico de los andamios. En la Figura 3.8 se presentan los ángulos de contacto medidos durante los primeros 5 segundos.



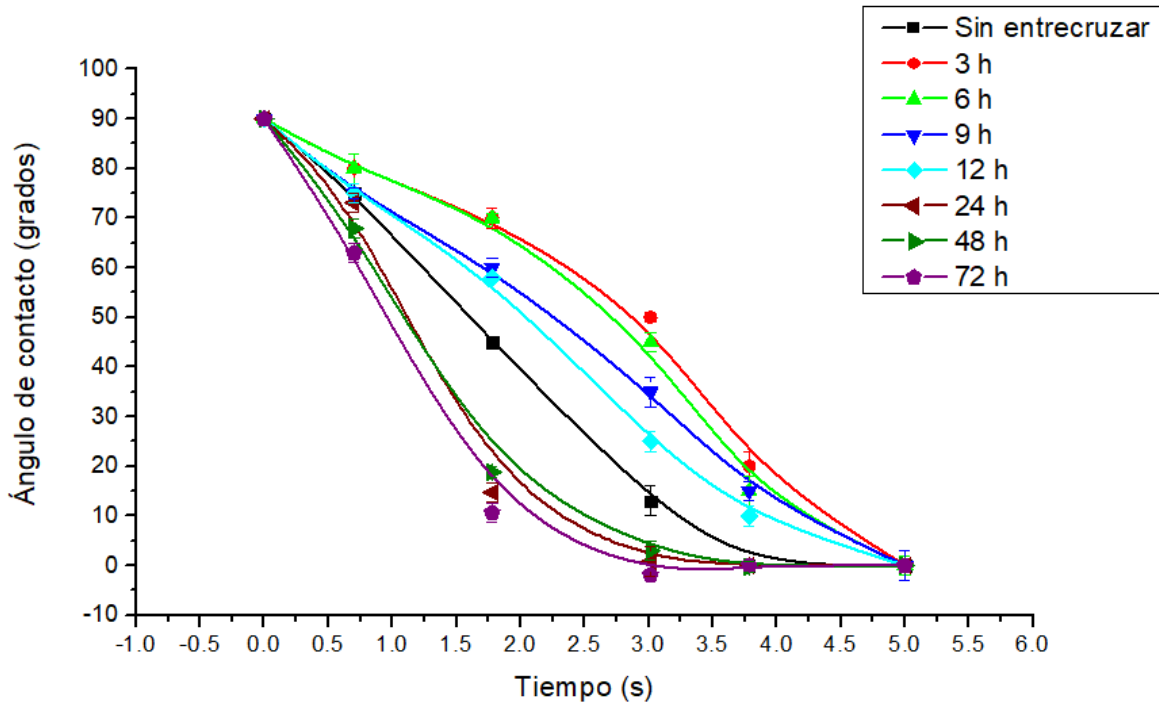


Figura 3.8. Ángulos de contacto de los andamios de gelatina a través del tiempo.

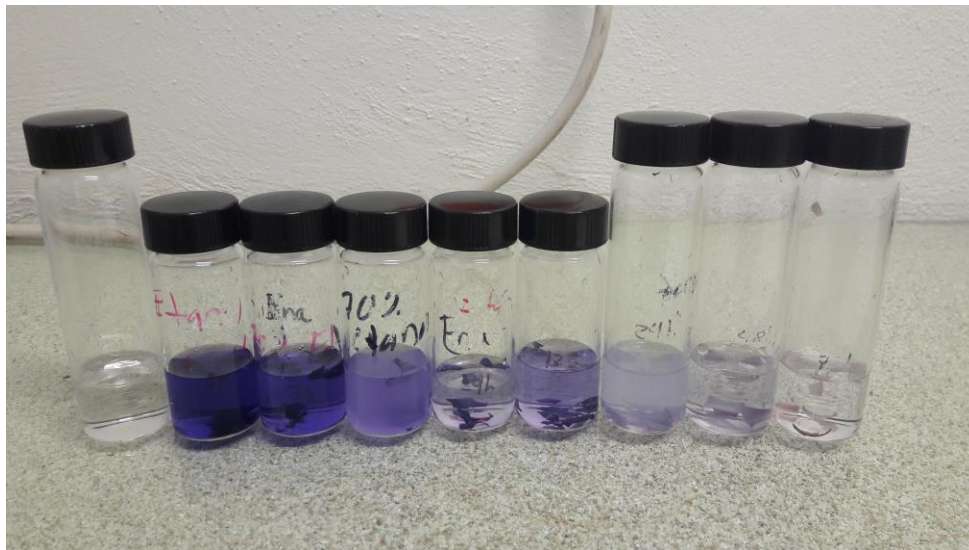
Los ángulos de contacto de las nanofibras de gelatina son prácticamente  $0^\circ$  después de 5 segundos, esto quiere decir que son altamente hidrofílicas. El carácter hidrofílico de la gelatina se puede atribuir a la gran cantidad de grupos amino y carboxílicos presentes. La razón de que los ángulos de contacto disminuyan más lento en los andamios entrecruzados entre 3 y 12 horas puede ser debido a que después del lavado el grosor de éstos disminuye, así como también lo hacen la cantidad y el tamaño de los poros debido a la solubilización parcial que sufren después del lavado realizado, como se mostró en las micrografías SEM, mientras que en los andamios entrecruzados por mayor tiempo el grosor se mantiene o incluso se incrementa debido a la contracción de las nanofibras, por lo que la gota de agua requiere un mayor tiempo para ser absorbida, pues la cantidad de material es menor.

El carácter hidrofílico de la capa de gelatina favorece la adhesión celular, ya que las células de los mamíferos pueden adherirse a superficies hidrofílicas con más afinidad respecto a las superficies hidrofóbicas. La membrana celular cuenta con receptores para los grupos polares de las proteínas, grupos OH, COOH y NH,

lo que permite que se adhieran [48]. Estos grupos polares son los que interactúan con las moléculas de agua y le dan el carácter hidrofílico a los materiales, por lo que un material hidrofílico funciona mejor como soporte para la adhesión celular.

### 3.5. Determinación del grado de entrecruzamiento

El ensayo de Ninhidrina consiste en hacer reaccionar una solución de Ninhidrina con los grupos amina libres de la gelatina. Al reaccionar la solución se torna de un color azul-morado (como se aprecia en la Figura 3.9) que absorbe luz ultravioleta a 570 nm, la cantidad de grupos amina libres, es proporcional a la absorción de la solución.



*Figura 3.9. Viales con la solución de ninhidrina luego de reaccionar con los grupos amina de los andamios de gelatina. El primer vial del lado izquierdo corresponde a la solución de referencia. El color más intenso corresponde a la membrana de gelatina sin entrecruzamiento y el menos intenso a la membrana entrecruzada por más tiempo.*

En la Tabla 3.2 se presentan las 10 mediciones hechas de absorbancia a 570 nm de las soluciones de Ninhidrina después de reaccionar con los grupos amina de la gelatina. Se obtuvo el promedio de las 10 mediciones y con ello se calculó el grado de entrecruzamiento con la fórmula (2).

Tabla 3.2. Absorbancia UV de las soluciones del ensayo de ninhidrina.

	0h	3h	6h	9h	12h	24h	48h	72h
1	0.9437	0.6715	0.58	0.2108	0.183	0.1284	0.05	0.0278
2	0.9441	0.6707	0.5807	0.211	0.1824	0.1289	0.0496	0.0285
3	0.9444	0.6694	0.5801	0.2115	0.1822	0.1289	0.0488	0.0284
4	0.9443	0.6708	0.5812	0.2121	0.1827	0.1284	0.0491	0.028
5	0.9438	0.6702	0.581	0.2118	0.1823	0.1286	0.0491	0.0288
6	0.9437	0.6706	0.5808	0.2114	0.1827	0.1284	0.0497	0.0286
7	0.9428	0.6694	0.5812	0.2117	0.183	0.1283	0.0491	0.0279
8	0.9427	0.6689	0.5807	0.212	0.1982	0.1283	0.049	0.0285
9	0.9426	0.6684	0.581	0.2119	0.1832	0.1289	0.0482	0.0282
10	0.9414	0.6681	0.5817	0.2115	0.1825	0.1283	0.0485	0.0274
Promedio	0.94335	0.6698	0.58084	0.21157	0.18422	0.12854	0.04911	0.02821
Grado de entrecruzamiento		28.99	38.43	77.57	80.47	86.37	94.79	97.01

El grado de entrecruzamiento aumentó con el tiempo de exposición de los andamios al vapor de glutaraldehído. El aumento en el grado de entrecruzamiento de 48 horas a 72 horas es menos de 3% después de 24 horas, en comparación con los demás andamios que después de un periodo de tiempo menor, presentan un mayor aumento en el grado de entrecruzamiento, una razón de esto puede ser que la mayor parte de las moléculas de gelatina se encuentran entrecruzadas y son pocos los grupos amina que permanecen libres.

### 3.6. Propiedades mecánicas a tensión

En la Figura 3.10 se muestran las curvas de esfuerzo-deformación de las membranas de gelatina entrecruzadas a los diferentes tiempos. Puede observarse que los andamios se vuelven más rígidos conforme más entrecruzados estén, también se presenta una disminución en la elongación de los andamios en comparación con el andamio no entrecruzado. La resistencia máxima también incrementa en función del grado de entrecruzamiento. En la Tabla 3.3 se muestran el módulo elástico y la deformación obtenidas de los andamios.

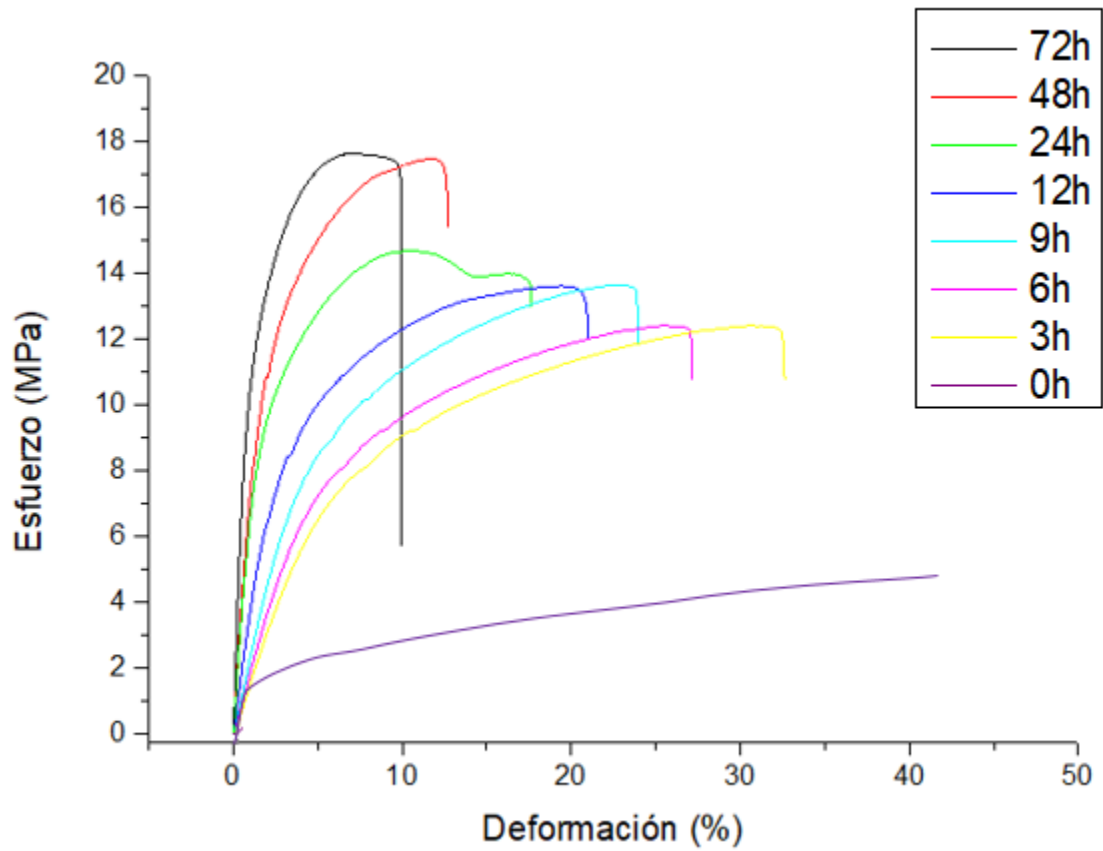


Figura 3.10. Curvas de esfuerzo-deformación a tensión de los andamios.

Tabla 3.3. Propiedades mecánicas de los andamios de gelatina.

Andamio	Módulo elástico (MPa)	Deformación (%)
0h	$30.5 \pm 2$	$42 \pm 2.5$
3h	$94 \pm 9$	$33 \pm 3.2$
6h	$137 \pm 13$	$26 \pm 2.4$
9h	$184 \pm 16$	$24 \pm 3.1$
12h	$217 \pm 20$	$20 \pm 2.6$
24h	$258 \pm 13$	$18 \pm 2.3$
48h	$303 \pm 12$	$12 \pm 1.1$
72h	$325 \pm 10$	$10 \pm 0.8$

Aunque el módulo elástico de los andamios incrementa en gran medida al ser entrecruzados, es importante recordar que en aplicaciones en ingeniería tisular, estarán en contacto con fluidos corporales, por lo que las membranas se hidratarán y el módulo elástico correspondiente cambiará y se harán más elásticas.

Se han reportado las propiedades mecánicas deseables en un sustituto dérmico, las cuales son: módulo elástico entre 0.69 MPa y 6.89 MPa y elongación de entre 20 % y 100 % [13]. Es importante remarcar que los andamios al ser cultivados o implantados en el cuerpo se hidratan, lo que disminuye el módulo elástico medido en el material seco. Kharaziha et al., reportan una caída de más del 99% en membranas de gelatina electrohilada [49]. Chi reportó que los valores para el módulo elástico y la elongación de un andamio bicapa PCL/Gelatina hidratado se encuentran dentro de los intervalos mencionados anteriormente [13].

### **3.7. Pruebas de degradación**

La degradación polimérica se refiere a los cambios en las propiedades físicas o químicas debido a reacciones que involucran el rompimiento de enlaces en la cadena principal de la macromolécula, así como el rompimiento de estructuras ordenadas en las cadenas. La degradación principal de la gelatina es la hidrólisis, que se da en medios acuosos.

La pérdida de masa es uno de los cambios que pueden observarse como consecuencia de una degradación. Ésta se debe a la ruptura de las cadenas poliméricas en cadenas más pequeñas que migran fuera de la estructura del andamio, así como por la solubilización de las cadenas en agua, lo que hace que se pierdan. En la Figura 3.11 se muestran los perfiles de pérdida de masa de los andamios entrecruzados.

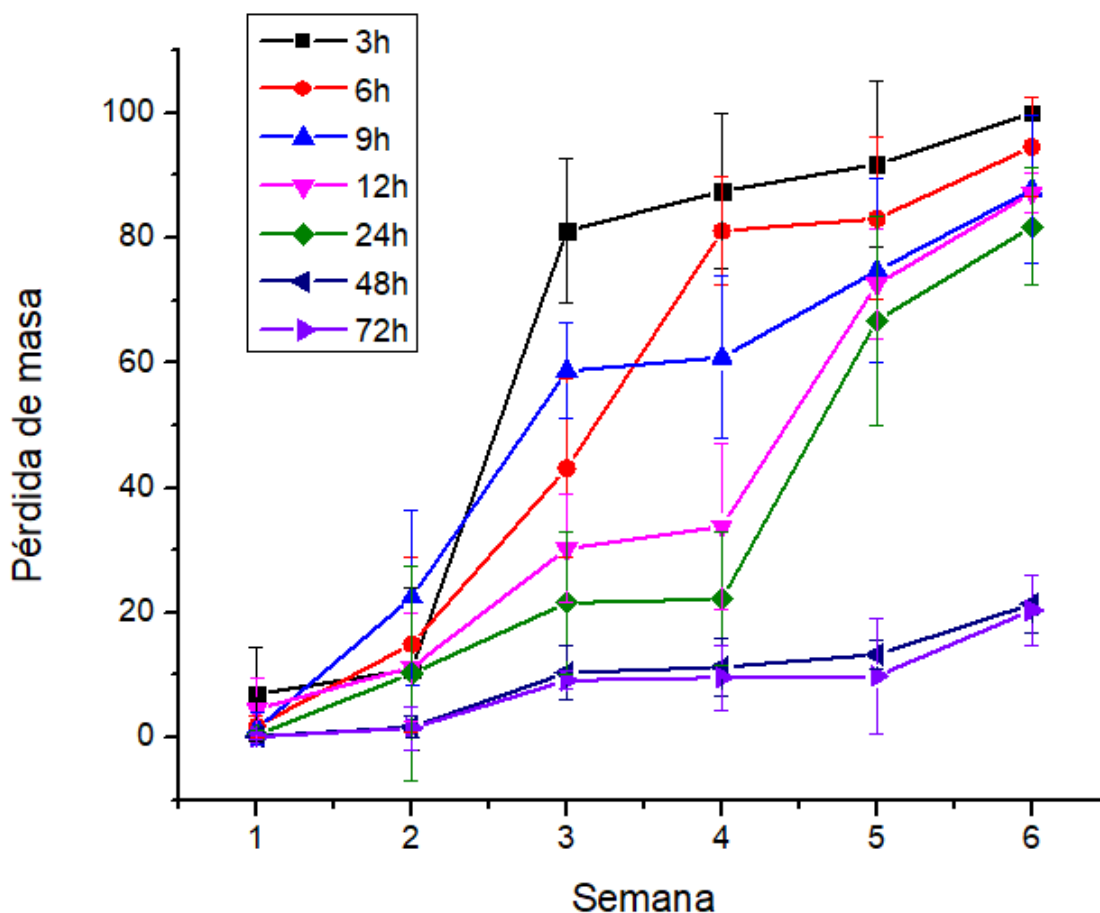


Figura 3.11. Porcentaje de pérdida de masa de los andamios.

Puede observarse que en general la resistencia a la degradación en medios acuosos incrementó de forma directa con el grado de entrecruzamiento de los andamios. En los andamios entrecruzados por 48 y 72 horas disminuyó significativamente la pérdida de masa, que es más evidente a partir de la semana 5 de la prueba. En algunos puntos los perfiles de pérdida de masa se cruzan, como en el caso de los andamios entrecruzados por 3 y 6 horas después de la tercera semana, esto sugiere que el entrecruzamiento de los andamios no es uniforme y hay zonas que menos entrecruzadas que otras, las cuales se degradan antes y hay una mayor pérdida de masa. A partir de las 48 horas de reacción de

entrecruzamiento se ve un perfil de pérdida de masa más lineal, lo que sugiere que se ha alcanzado un entrecruzamiento más uniforme.

La insolubilización y resistencia a la degradación, así como las propiedades mecánicas de los andamios incrementaron directamente con el tiempo de reacción con el vapor de GTA, de igual forma, el ensayo de ninhidrina demostró que el grado de entrecruzamiento de las moléculas de gelatina aumentó al permanecer más tiempo reaccionando. Por lo tanto, el incremento de las propiedades anteriores en este caso es debido al incremento del grado de entrecruzamiento de las membranas de gelatina. En las tres pruebas se observa que los cambios en las propiedades no cambian en gran medida para los andamios entrecruzados por 48 y 72 horas, por lo que no hay ningún beneficio en dejar reaccionar más de 48 horas los andamios con los vapores de GTA.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron fibras de gelatina libres de glóbulos con un diámetro promedio de 602 nm, utilizando soluciones con una concentración de 10 % (m/v) en TFE, con un flujo de 0.8 ml/h, distancia de 15 cm entre el colector y la aguja y bajo un potencial eléctrico de 10 kV.

Se lograron entrecruzar los andamios mediante la exposición al vapor de GTA a distintos tiempos. Conforme incrementó el tiempo de exposición y entrecruzamiento, mejoraron la resistencia a la solubilización y a la degradación, como se muestra en las pruebas realizadas. El aspecto de las membranas evidencian el posible entrecruzamiento de las cadenas poliméricas debido al cambio de color de las membranas a un tono amarillo que se relaciona con la aparición de enlaces imina al reaccionar los grupos aldehído con los grupos amina.

El análisis IR de los andamios entrecruzados y no entrecruzados muestran que no hay cambios significativos en la estructura química al ser entrecruzados con GTA, como puede verse en el análisis FTIR presentado.

En las pruebas de IR, no se detectó presencia de flúor residual del solvente utilizado en el electrohilamiento. El flúor es uno de los principales factores de citotoxicidad reportados para las células, y debe presentar un pico característico en  $1130\text{ cm}^{-1}$ , el cual no es observado en el espectro de IR, por lo que se pudiera atribuir su eliminación durante los lavados realizados del material.

Los ángulos de contacto medidos para los distintos andamios son de  $0^\circ$  después de 5 segundos, lo que significa que el entrecruzamiento no afecta la hidrofiliidad de la gelatina. Esto es adecuado ya que según la literatura esto beneficia a la adhesión y el crecimiento celular.

Por medio del ensayo de Ninhidrina pudo determinarse el grado de entrecruzamiento de las membranas en función de la absorbancia de luz UV a 570 nm. El grado de entrecruzamiento de los andamios fue entre 29 % y 97 %



dependiendo del tiempo de reacción con el vapor de GTA, lo que permitiría tener un control sobre el tiempo de degradación de los andamios.

Las propiedades mecánicas varían en función del grado de entrecruzamiento de las cadenas de gelatina, los andamios se volvieron más rígidos conforme éste aumentó. El módulo elástico de la membrana entrecruzada por 48 horas aumentó 10 veces respecto a la membrana de gelatina sin entrecruzamiento, igualmente la elasticidad disminuyó al aumentar el grado de entrecruzamiento. No hay una diferencia significativa en las propiedades de los andamios entrecruzados por 48 y 72 horas, lo que podría sugerir que se alcanza una zona de estabilidad.

Los perfiles de pérdida de masa también tienen un comportamiento en función del grado de entrecruzamiento de las membranas. Al estar más entrecruzadas las membranas, la pérdida de masa fue menor, los andamios entrecruzados por 48 y 72 horas perdieron alrededor de 20 % de su masa luego de 42 días de exposición al PBS bajo condiciones fisiológicas, mientras que los andamios entrecruzados por 24 horas y menos perdieron de 80 % a 100 % de su masa en el mismo periodo de tiempo.

## **RECOMENDACIONES**

Entre las recomendaciones para continuar y mejorar el trabajo realizado se encuentran diversos estudios y modificaciones en el proceso de entrecruzamiento, tales como:

- Pruebas biológicas de viabilidad celular con fibroblastos.
- Estudiar distintos tiempos de entrecruzamiento entre 24 y 48 horas.
- Utilizar otros agentes entrecruzantes que no sean tóxicos para las células.

## REFERENCIAS

- [1] U.S. Department of Health & Human Services. tissue-engineering-and-regenerative-medicine @ www.nibib.nih.gov n.d.
- [2] Hubbell J a. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (N Y)* 1995;13:565–76. doi:10.1038/nbt0695-565.
- [3] Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cells Mater* 2003;5:29–40. doi:10.22203/eCM.v005a03.
- [4] Peltola SM, Melchels FPW, Grijpma DW, Kellomäki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Ann Med* 2008;40:268–80. doi:10.1080/07853890701881788.
- [5] Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* 2005;9:592–608. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00491.x.
- [6] Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface* 2007;4:413–37. doi:10.1098/rsif.2006.0179.
- [7] Gorgieva S, Kokol V. Collagen-vs. Gelatin-Based Biomaterials and Their Biocompatibility : Review and Perspectives. *Biomater Appl Nanomedicine* 2011:17–51. doi:10.5772/24118.
- [8] Simpson DG, Jha BS, Ayres CE, Bowman JR, Telemeco TA, Sell SA, et al. Electrospun collagen: A tissue engineering scaffold with unique functional properties in a wide variety of applications. *J Nanomater* 2011;2011. doi:10.1155/2011/348268.
- [9] Ma B, Wang X, Wu C, Chang J. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regen Biomater* 2014;1:81–9. doi:10.1093/rb/rbu009.
- [10] Rose JB, Pacelli S, El Haj AJ, Dua HS, Hopkinson A, White LJ, et al. Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. *Materials (Basel)* 2014;7:3106–35. doi:10.3390/ma7043106.
- [11] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer (Guildf)* 2006;47:2911–7. doi:10.1016/j.polymer.2006.02.046.
- [12] Lu H, Oh HH, Kawazoe N, Yamagishi K, Chen G. PLLA–collagen and PLLA–gelatin hybrid scaffolds with funnel-like porous structure for skin tissue engineering. *Sci Technol Adv Mater* 2012;13:64210. doi:10.1088/1468-6996/13/6/064210.
- [13] Chi L. Obtención de un andamio bicapa mediante la técnica de electrohilamiento para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos de la piel. Centro de investigación científica de Yucatán, 2015.
- [14] Uruanga J. Ingeniería Tisular @ enciende.cosce.org n.d.

- [15] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21:2529–43. doi:10.1016/S0142-9612(00)00121-6.
- [16] Chung C, Beecham M, Mauck RL, Burdick JA. The influence of degradation characteristics of hyaluronic acid hydrogels on in vitro neocartilage formation by mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2009;30:4287–96. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.040.
- [17] Li WJ, Laurencin CT, Catterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002;60:613–21. doi:10.1002/jbm.10167.
- [18] Soria JM, Barcia-González J, Andrades JA, Romero J, Monleón Pradas M, García-Verdugo JM. Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso. *Trauma* 2009;20:15–22.
- [19] Hadjipanayi E, Mudera V, Mudera R V. Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness. *J Tissue Eng Regen Med* 2009;3:77–84. doi:10.1002/term.
- [20] O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today* 2011;14:88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [21] Mo XM, Xu CY, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004;25:1883–90. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.042.
- [22] Chew S, Wen Y, Dzenis Y, Leong K. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Curr Pharm Des* 2006;12:4751–70. doi:10.2174/138161206779026326.
- [23] Hiep NT, Lee BT. Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:1969–78. doi:10.1007/s10856-010-4048-y.
- [24] Rangel K. nanofibras @ kar-rang.blogspot.mx n.d.
- [25] Faculty TA, Kolambkar YM, Fulfillment IP. Electrospun Nanofiber Meshes for the Functional Repair of Bone Defects. Georgia Institute of Technology, 2009.
- [26] Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv Mater* 2004;16:1151–70. doi:10.1002/adma.200400719.
- [27] Zizumbo F. Obtención y caracterización de andamios en forma de conductos tubulares coaxiales a base de quitosano y poli (ácido láctico) mediante la técnica de electrohilado para su posible uso en la regeneración de nervios periféricos. *Cent Investig Científica Yucatán, AC* 2013.
- [28] Babel W. Gelatine – ein vielseitiges Biopolymer. *Chemie Unserer Zeit* 1996;30:86–95. doi:10.1002/ciuz.19960300205.
- [29] Zhang Y, Ouyang H, Chwee TL, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2005;72:156–65. doi:10.1002/jbm.b.30128.

- [30] Yakimets I, Wellner N, Smith AC, Wilson RH, Farhat I, Mitchell J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer (Guildf)* 2005;46:12577–85. doi:10.1016/j.polymer.2005.10.090.
- [31] Diop JM. Preparation and characterization of gelatin and chitosan films. An Honor Thesis Dep Chem Biol Eng Tufts Univ 2009.
- [32] Lumen. Chemical Digestion @ courses.lumenlearning.com n.d.
- [33] Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 2002;23:4827–32. doi:10.1016/S0142-9612(02)00235-1.
- [34] Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* 1996;17:471–84. doi:10.1016/0142-9612(96)82721-9.
- [35] Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1980;14:753–64. doi:10.1002/jbm.820140607.
- [36] Liu Y, Ma L, Gao C. Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 2012;32:2361–6. doi:10.1016/j.msec.2012.07.008.
- [37] Campos E, Coimbra P, Gil MH. An improved method for preparing glutaraldehyde cross-linked chitosan-poly(vinyl alcohol) microparticles. *Polym Bull* 2013;70:549–61. doi:10.1007/s00289-012-0853-4.
- [38] Ulubayram K, Aksu E, Gurhan SID, Serbetci K, Hasirci N. Cytotoxicity evaluation of gelatin sponges prepared with different cross-linking agents. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13:1203–19. doi:10.1163/156856202320892966.
- [39] Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* 2001;22:763–8. doi:10.1016/S0142-9612(00)00236-2.
- [40] Martucci JF, Ruseckaite RA, Vázquez A. Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. *Mater Sci Eng A* 2006;435–436:681–6. doi:10.1016/j.msea.2006.07.097.
- [41] Leach JB, Bivens KA, Patrick CW, Schmidt CE. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2003;82:578–89. doi:10.1002/bit.10605.
- [42] Dash R, Foston M, Ragauskas AJ. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydr Polym* 2013;91:638–45. doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.080.
- [43] Vera-Graziano R, Hernandez-Sanchez F, Cauich-Rodriguez J V. Study of crosslinking density in polydimethylsiloxane networks by DSC. *J Appl Polym Sci* 1995;55:1317–27. doi:10.1002/app.1995.070550905.

- [44] Chang W-H, Chang Y, Lai P-H, Sung H-W. A genipin-crosslinked gelatin membrane as wound-dressing material: in vitro and in vivo studies. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14:481–95. doi:10.1163/156856203766652084.
- [45] Fadnavis NW, Sheelu G, Kumar BM, Bhalerao MU, Deshpande AA. Gelatin blends with alginate: Gels for lipase immobilization and purification. *Biotechnol Prog* 2003;19:557–64. doi:10.1021/bp010172f.
- [46] Huang CH, Chi CY, Chen YS, Chen KY, Chen PL, Yao CH. Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system. *Mater Sci Eng C* 2012;32:2476–83. doi:10.1016/j.msec.2012.07.029.
- [47] Panzavolta S, Gioffrè M, Focarete ML, Gualandi C, Foroni L, Bigi A. Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomater* 2011;7:1702–9. doi:10.1016/j.actbio.2010.11.021.
- [48] Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 2011;29:739–67. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
- [49] Kharaziha M, Nikkhah M, Shin SR, Annabi N, Masoumi N, Gaharwar AK, et al. PGS:Gelatin nanofibrous scaffolds with tunable mechanical and structural properties for engineering cardiac tissues. *Biomaterials* 2013;34:6355–66. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.045.