

# Evaluación de la biocompatibilidad de redes semi-interpenetadas de colágeno-poliuretano-pectina

Myriam Lisseth Guzmán-Chávez <sup>a</sup>; Martín Caldera-Villalobos <sup>a</sup>; Denis A. Cabrera-Munguía <sup>a</sup>; Jesús A. Claudio-Rizo <sup>a\*</sup>,

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Ing. J. Cárdenas Valdez S/N, República, 25280 Saltillo, Coahuila, México.

*Evaluation of the biocompatibility of semi-interpenetrated networks of collagen-polyurethane-pectin.*

*Avaluació de la biocompatibilitat de xarxes semi-interpenetades de col·lagen-poliuretà-pectina*

IVED: 30 AUGUST 2021; REVISED: 8 MAY 2022; ACCEPTED: 28 JULY 2022

## ABSTRACT

In the present investigation, hydrogels based on collagen-polyurethane-pectin semi-interpenetrated polymeric networks (semi-IPN) were designed, with different concentrations of pectin (10-40 %m) and their effect on *in vitro* biocompatibility was evaluated. The pectin used in this work was enzymatically extracted from orange peels. The parameters equivalent weight, free acidity, percentage of methoxyl, degree of esterification and percentage of galacturonic acid anhydride (GAA) of the pectin were determined according to the methodology proposed by Owens<sup>1</sup>. The hydrogels were characterized by FTIR and SEM. In addition, the degree of cross-linking, swelling, and storage modulus of the hydrogels were evaluated. The biocompatibility of the hydrogels was evaluated through cell viability assays with monocytes and fibroblasts. In addition, the hemolytic activity of the hydrogels was evaluated. High pectin concentrations decrease the swelling capacity significantly, and promote a slight improvement in crosslinking and a significant increase in the storage modulus of the semi-IPN matrix. FTIR and SEM characterization confirmed the formation of semi-interpenetrated collagen-polyurethane-pectin networks. The formulated hydrogels do not have a cytotoxic character. The viability percentage of fibroblasts reached 75% while the viability of monocytes reached 105% for up to 48 h of incubation. The formulations containing 10 and 20 %m of pectin showed better biocompatibility *in vitro*, since the presence of high semi-interpenetrated granular regions in the collagen-polyurethane matrix shows an impact on cell metabolism.

**Paraules clau:** *Collagen, hydrogel, pectin, polyurethane*

## RESUMEN

En la presente investigación se diseñaron hidrogeles a base de redes poliméricas semi-interpenetradas (semi-IPN) de colágeno-poliuretano-pectina, con diferente concentración de pectina (10-40 %m) y se evaluó su efecto en la biocompatibilidad *in vitro*. La pectina utilizada en este trabajo fue extraída enzimáticamente a partir de cáscaras de naranja. Los parámetros peso equivalente, acidez libre, porcentaje de metoxilo, grado de esterificación y porcentaje de ácido anhídrido galacturónico (AAG) de la pectina fueron determinados de acuerdo con la metodología propuesta por Owens<sup>1</sup>. Los hidrogeles fueron caracterizados por FTIR y SEM. Además, se evaluó el grado de entrecruzamiento, hinchamiento y módulo de almacenamiento de los hidrogeles. La biocompatibilidad de los hidrogeles se evaluó a través de ensayos de viabilidad celular con monocitos y fibroblastos. Además, se evaluó la actividad hemolítica de los hidrogeles. Altas concentraciones de pectina disminuyen la capacidad de hinchamiento significativamente, y promueven una ligera mejora de la reticulación y un incremento significativo del módulo de almacenamiento de la matriz semi-IPN. La caracterización por FTIR y SEM confirmó la formación de redes semi-interpenetradas de colágeno-poliuretano-pectina. Los hidrogeles formulados no poseen carácter citotóxico. El porcentaje de viabilidad de fibroblastos alcanzó el 75% mientras que la viabilidad de monocitos alcanzó el 105% hasta por 48 h de incubación. Las formulaciones que contienen 10 y 20 %m de pectina mostraron

\*Corresponding author: [jclaudio@uadec.edu.mx](mailto:jclaudio@uadec.edu.mx)

mejor biocompatibilidad *in vitro*, ya que la presencia de altas regiones granulares semi-interpenetradas en la matriz colágeno-poliuretano muestran impactar en el metabolismo celular.

**Palabras clave:** *Colágeno, hidrogel, pectina, poliuretano.*

## RESUM:

En aquesta investigació es van dissenyar hidrogels a base de xarxes polimèriques semi-interpenetrades (semi-IPN) de col·lagen-poliuretano-pectina, amb diferent concentració de pectina (10-40 %m) i se'n va avaluar l'efecte en la biocompatibilitat *in vitro*. La pectina utilitzada en aquest treball va ser extreta enzimàticament a partir de closques de taronja. Els paràmetres pes equivalent, l'acidesa lliure, el percentatge de metoxil, el grau d'esterificació i el percentatge d'àcid anhidrid galacturònic (AAG) de la pectina van ser determinats d'acord amb la metodologia proposada per Owens<sup>1</sup>. Els hidrogels van ser caracteritzats per FTIR i SEM. A més, es va avaluar el grau d'entrecruament, inflamament i mòdul d'emmagatzematge dels hidrogels. La biocompatibilitat dels hidrogels es va avaluar a través d'assajos de viabilitat cel·lular amb monòcits i fibroblasts. A més a més, es va avaluar l'activitat hemolítica dels hidrogels. Altes concentracions de pectina disminueixen la capacitat d'inflament significativament i promouen una lleugera millora de la reticulació i un increment significatiu del mòdul d'emmagatzematge de la matriu semi-IPN. La caracterització per FTIR i SEM va confirmar la formació de xarxes semi-interpenetrades de col·lagen-poliuretano-pectina. Els hidrogels formulats no tenen caràcter citotòxic. El percentatge de viabilitat de fibroblasts va assolir el 75% mentre que la viabilitat de monòcits va assolir el 105% fins a 48 h d'incubació. Les formulacions que contenen 10 i 20 % m de pectina van mostrar millor biocompatibilitat *in vitro*, ja que la presència d'altres regions granulars semi-interpenetrades a la matriu col·lagen-poliuretàn mostren impactar en el metabolisme cel·lular.

**Paraules clau:** *Col·lagen, hidrogel, pectina, poliuretàn*

## INTRODUCCIÓN

La pectina es un polisacárido de origen vegetal que posee excelentes características de gelificación, biodegradabilidad y biocompatibilidad<sup>2</sup>. Los hidrogeles a base de colágeno utilizados como biomateriales son de suma importancia para la ingeniería de tejidos y en medicina regenerativa debido a su excelente biocompatibilidad y baja inmunogenicidad<sup>3</sup>.

Se ha reportado que estos biomateriales estimulan los procesos bioquímicos vitales como la migración, proliferación, señalización y modulación del metabolismo de diferentes tipos de líneas celulares<sup>4</sup>. Los biomateriales en forma de hidrogeles son materiales poliméricos hidrofílicos formados por una red tridi-

mensional de cadenas poliméricas flexibles entrecruzadas<sup>5</sup>. Estos materiales tienen la capacidad de retener grandes cantidades de agua por lo cual son una buena alternativa para la regeneración de tejidos<sup>6,7</sup>. Además, los hidrogeles permiten la difusión de metabolitos de interés que mejoran la respuesta biológica de los procesos de reparación tisular<sup>3</sup>.

Para lograr que los hidrogeles tengan una aplicación exitosa en el campo de la biomedicina e ingeniería tisular se deben cumplir algunos requisitos estructurales y de propiedades que aseguren su funcionalidad. Principalmente, la velocidad de degradación debe ser controlada, deben tener buena resistencia mecánica y gelificar *in situ*. Además, deben tener la capacidad de liberar sustancias terapéuticas de forma controlada y poseer alta biocompatibilidad<sup>8</sup>. Una estrategia para la obtención de estos materiales es la formación de matrices de redes poliméricas semi-interpenetradas (semi-IPN) a base de polímeros naturales y sintéticos<sup>9</sup>. Los polímeros naturales como el colágeno y los polisacáridos como la pectina permiten mantener y regular la biocompatibilidad de los hidrogeles<sup>10,11</sup>. Mientras que los polímeros sintéticos como el poliuretano adaptan la respuesta mecánica, regulan la degradación y la capacidad de liberación de fármaco<sup>12,13</sup>. Basados en esto, en este trabajo se propone la formulación de nuevos hidrogeles con redes semi-IPN de colágeno entrecruzado con poliuretano y pectina. La estructura, propiedades y biocompatibilidad de estas matrices fue regulada ajustando la concentración de pectina en la matriz semi-IPN. Con los resultados de esta investigación se busca desarrollar hidrogeles que puedan ser empleados en problemáticas actuales de importancia regional y nacional como la atención de heridas crónicas<sup>14,15</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES DE COLÁGENO-POLIURETANO-PECTINA

El colágeno de tipo I empleado en la formulación de los hidrogeles fue extraído a partir de segmentos de tendón bovino mediante hidrólisis enzimática<sup>16</sup>. La pectina se extrajo del mesocarpio de *Citrus sinensis* mediante hidrólisis enzimática. El prepolímero de poliuretano utilizado como agente entrecruzante se preparó haciendo reaccionar hexametildisocianato con glicerol etoxilato siguiendo el procedimiento reportado en la literatura<sup>17</sup>, para ello se usa una relación molar 4/1 de isocianato/poliol para generar prepolímeros que son solubilizados en presencia de bisulfito de sodio por la formación de carbamilsulfonatos altamente solubles. El grado de reacción obtenido abarca la formación desde heptámeros, pentámeros y trímeros con grupos isocianatos disponibles para la reticulación deseada. Se eligió un valor constante de 15 %m con respecto a la masa de colágeno ya que se ha reportado que proporciones mayores de este reticulante disminuye la biocompatibilidad nativa del colágeno<sup>18,19</sup>. El cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato dibásico de sodio

dihidratado y fosfato monobásico de potasio utilizados para la preparación de la solución tamponada con fosfatos (PBS-10X), así como la ninhidrina, glicerol etoxilato, hexametilendiisocianato y el bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se encuentran disponibles comercialmente y fueron utilizados sin purificación previa.

En el presente trabajo se usó la metodología descrita por Claudio-Rizo et al 2020<sup>20</sup>, para generar un nuevo hidrogel basado en colágeno-poliuretano-pectina. La referencia en cuestión sólo prueba con polisacáridos como almidón, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa; y deja como perspectiva que usar polisacáridos con diferente estructura química podría generar sistemas de hidrogeles semi-IPN con propiedades requeridas para medicina regenerativa. Para ello, se emplearon soluciones de colágeno (6 mg/mL) de dermis porcina y pectina (2% m/v) en agua desionizada. Para la preparación de todos los hidrogeles, se siguió el siguiente procedimiento: primero se mezcló 1 mL de la solución de colágeno con el poliuretano (15 %m con respecto a la masa de colágeno). La mezcla fue enfriada a 4 °C y posteriormente se adicionó la pectina en diferentes proporciones (10-40 %m con respecto a la masa de colágeno) manteniendo la mezcla a 4 °C. A continuación, el pH de la mezcla de reacción fue ajustado a 7.4 adicionando 200 µL de PBS-10X. Finalmente, la reacción de entrecruzamiento para formar la red semi-IPN fue llevada a cabo a 37 °C en una estufa de incubación por 5 h<sup>20</sup>. La designación y composición de los diferentes hidrogeles formulados se muestra en la Tabla 1.

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

Formulación*	mg de colágeno	mg de poliuretano	mg de pectina
Col-Pect10%	6	0.9	0.6
Col-Pect20%	6	0.9	1.2
Col-Pect30%	6	0.9	1.8
Col-Pect40%	6	0.9	2.4

## CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

Los espectros de FTIR fueron adquiridos en un espectrofotómetro *Perkin Elmer* Frontier utilizando un accesorio de reflectancia totalmente atenuada (ATR) con una resolución espectral de 4 cm<sup>-1</sup>. Las muestras de hidrogeles para FTIR y microscopía electrónica de barrido (SEM) fueron previamente secadas antes de realizar los experimentos. El módulo de almacenamiento de los hidrogeles fue obtenido por reología de pequeña amplitud oscilatoria de cizallamiento utilizando un reómetro MCR 300 *Anton -Paar*, el equipo fue precalentado a 37 °C y se empleó una geometría plato-plato de 40 mm de diámetro; con una trampa de disolvente para evitar la evaporación de agua. Por último, las micrografías de SEM fueron adquiridas en un microscopio electrónico de barrido marca *JEOL* modelo JSM-6510LV/LGS con un voltaje de aceleración de 15kV. Las muestras de xerogeles fueron fijadas en cinta de carbono para su observación.

## ANÁLISIS DE LA PECTINA

Las características de la pectina extraída del mesocarpio de *Citrus sinensis* fueron analizadas de acuerdo con la metodología reportada por Owens que consiste en titulaciones ácido-base<sup>1</sup>. Los experimentos fueron realizados con una solución de pectina en agua desionizada (2 % m/v) y empleando hidróxido de sodio 0.1 M como titulante.

El peso equivalente (PE) y la acidez libre (AL) de la pectina se determinaron utilizando las Ecuaciones 1 y 2 respectivamente:

$$\text{Peso equivalente (PE)} = \frac{\text{mg componente ácido}}{\text{meq A (NaOH)}} \quad (1)$$

$$\text{Acidez libre (AL)} = \frac{\text{meq A (NaOH)}}{\text{g componente ácido}} \quad (2)$$

Donde meq A (NaOH) son los miliequivalentes de NaOH utilizados en la titulación y el componente ácido representa la masa de pectina utilizada en la valoración expresada en mg o g según corresponda.

El porcentaje de metoxilo de la pectina se determinó utilizando la Ecuación 3:

$$\% \text{ Metoxilo (ME)} = \frac{\text{meq B} * 31 * 100}{\text{mg componente ácido}} \quad (3)$$

Donde 31 es el peso molecular del grupo metoxilo (CH<sub>3</sub>O) expresado en mg/meq, meq B son los miliequivalentes de NaOH utilizados en la titulación y el componente ácido es la masa de la muestra de pectina (mg).

El porcentaje del grado de esterificación se determinó de acuerdo con la Ecuación 4:

$$\% \text{ Grado de esterificación (GE)} = \frac{\text{meq B}}{\text{meq A} + \text{meq B}} \quad (4)$$

Donde meq A son los miliequivalentes de NaOH utilizados en la primera titulación y meq B son los miliequivalentes de NaOH utilizados en la segunda titulación para determinar el contenido de metoxilo.

Finalmente, el porcentaje de ácido anhídrido galacturónico (AAG) que permite conocer el grado de pureza de la pectina se determinó con la Ecuación 5:

$$\% \text{ AAG} = \frac{176 * 100 - (\text{meq A} + \text{meq B})}{\text{mg componente ácido}} \quad (5)$$

Donde 176 es el peso molecular del ácido anhídrido galacturónico expresado en mg/meq, meq A son miliequivalentes de NaOH utilizados en la primera titulación y meq B son miliequivalentes de NaOH utilizados en la segunda titulación para determinar el contenido de metoxilo y el componente ácido es el peso de la muestra (mg).

## GRADO DE ENTRECruzAMIENTO E HINCHAMIENTO DE LOS HIDROGELES.

La evaluación del grado de entrecruzamiento de los hidrogeles se realizó con la prueba de ninhidrina<sup>18</sup>. En un tubo falcón se colocó un hidrogel y 1 mL de solución de ninhidrina (1 ml, 1 %m, tampón de citrato, pH 5,0). Las muestras se calentaron a 90 ° C durante 120 min. Al término de la reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con 3 mL de agua destilada. La absorbancia de la solución fue medida a 560 nm empleando un espectrofotómetro *Thermo Scientific* MultiSkan Sky. Se realizaron de forma independiente tres experimentos por cada formulación. El grado de hinchamiento de los hidrogeles se determinó gravimétricamente utilizando la ecuación 6:

$$\text{Grado de hinchamiento} = \frac{m_{\text{hidrogel}} - m_{\text{xerogel}}}{m_{\text{xerogel}}} * 100 \quad (6)$$

Donde  $m_{\text{hidrogel}}$  y  $m_{\text{xerogel}}$  son las masas del hidrogel y xerogel respectivamente.

## EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR *IN VITRO*

La viabilidad celular de monocitos humanos y fibroblastos dérmicos de porcino se evaluó mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para determinar la citotoxicidad *in vitro* de los hidrogeles.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de poliestireno e incubadas en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C usando como medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) para fibroblastos y medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para monocitos, suplementados con suero fetal bovino (10% v/v). Las suspensiones de células (50 000 células/hidrogel) se agregaron a los pocillos que contienen hidrogeles semi-IPN y control (PBS-1X), cultivados por 24 y 48 h, respectivamente. La viabilidad celular se determinó por la capacidad de las células con metabolismo activo para reducir las sales de MTT en formazano. Se añadió a los pocillos con hidrogeles la solución MTT (1% m/v) y controles, y luego las células se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 2h a 37 ° C. Se decantó el medio y los cristales azules de formazano se disolvieron en 2-propanol y se midió la absorbancia del sobrenadante a 560 nm. La absorbancia de MTT reducida por células cultivadas en pocillos libres de materiales representa el 100% de la actividad metabólica (control).<sup>17</sup> El porcentaje de viabilidad celular se calculó con la ecuación 7.

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{absorbancia de hidrogel}}{\text{absorbancia del control}} * 100 \quad (7)$$

## ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.

La hemocompatibilidad de los hidrogeles se evaluó mediante la prueba de hemólisis; esta prueba mide la hemoglobina liberada cuando la célula destruye la membrana de los eritrocitos. Para ello, se obtuvo sangre humana de donantes sanos, recolectada y centrifugada a 3000 rpm para 5 min a 4 °C. El plasma se decantó y la

fase roja que incluía los eritrocitos se lavó con solución de Alsever (dextrosa 0,116 M, cloruro de sodio 0,071 M, citrato de sodio 0,027 M y cítrico ácido 0,002 M) tres veces. Se tomó una alícuota de 100 µL de eritrocitos purificados y se diluyó en 10 ml de solución de Alsever. A continuación, se mezclaron 112 µL de esta solución con 150 µl de lixiviado extraído de los hidrogeles en tubos Eppendorf individuales. El volumen fue ajustado a 2000 µL con solución de Alsever. La solución de Alsever y agua desionizada en conjunto con la solución de eritrocitos se utilizaron como controles negativos (0% de hemólisis) y positivos (100% de hemólisis), respectivamente. Se prepararon tres muestras individuales para cada material evaluado. Los tubos se incubaron a 37 ° C con agitación continua (250 rpm) durante 30 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron y se tomaron alícuotas del sobrenadante. La hemoglobina liberada fue cuantificada mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia de la solución a 415 nm. El porcentaje de hemólisis se determinó con la Ecuación 8:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{control(-)}}}{A_{\text{control(+)}} - A_{\text{control(-)}}} * 100 \quad (8)$$

Donde  $A_{\text{muestra}}$ ,  $A_{\text{control(-)}}$  y  $A_{\text{control(+)}}$  son las absorbancias de la muestra, del control negativo y del control positivo, respectivamente. El valor de porcentaje de hemólisis obtenido para cada material se comparó con *ASTM F 756-08* para evaluar el comportamiento de hemocompatibilidad<sup>18</sup>.

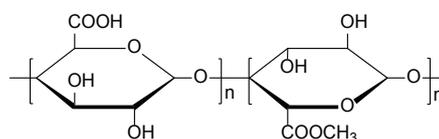
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron de forma independiente al menos tres veces. La media y la desviación estándar se presentan para cada conjunto de datos. Los conjuntos de datos se compararon mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). La diferencia de las medias se comprobó con una prueba de Tukey y fue considerado estadísticamente significativo a nivel de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ANÁLISIS DE LA PECTINA

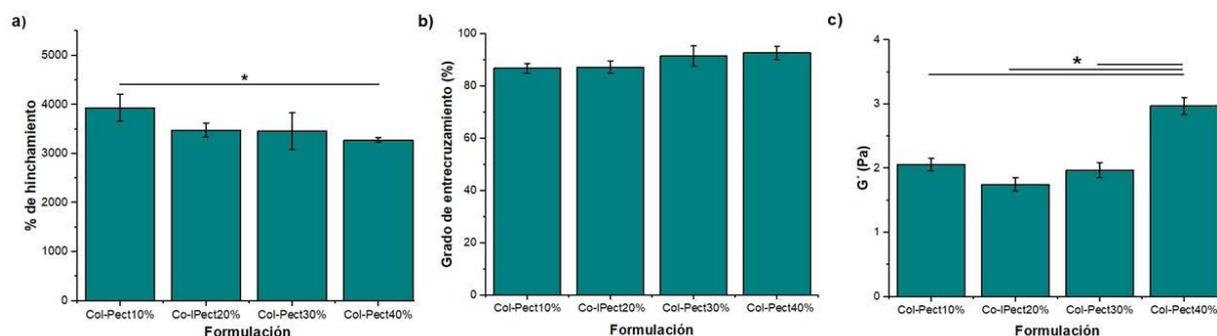
La Figura 1 muestra la estructura de la pectina la cual consiste en una cadena de poli (ácido galacturónico) parcialmente esterificada. Las unidades monoméricas de ácido galacturónico poseen carácter altamente hidrofílico el cual disminuye en aquellas unidades que contienen el éster metílico. La proporción entre unidades metoxiladas y no metoxiladas es de vital importancia para predecir el comportamiento de gelificación de la pectina y su potencial aplicación.



**Figura 1.** Estructura de la Pectina.

**Tabla 2.** Características de la pectina.

PE (mg/meq)	AL (meq/g)	% ME	%GE	%AAG
195.875 ± 23	3.134 ± 0.04	0.578 ± 0.06	0.0167 ± 0.004	70.397 ± 4.3



**Figura 2.** a) Grado de hinchamiento, b) grado de entrecruzamiento y c) módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de los hidrogeles.

La Tabla 2 contiene los resultados obtenidos del análisis de la pectina. El peso equivalente de la pectina es de  $195.875 \pm 23$  mg/meq que corresponde al número de unidades de ácido galacturónico anhidro. El porcentaje de metoxilo es menor al 7% por lo que se puede concluir que es una pectina de bajo metoxilo. Este tipo de pectinas requiere iones de calcio para formar uniones entre cadenas e inducir la gelificación. En la formulación de los hidrogeles de colágeno-poliuretano-pectina no se añadió el ion  $Ca^{2+}$  debido a que la matriz semi-IPN se forma a través del entrecruzamiento del colágeno con el poliuretano formando una red en la cual la pectina permanece inmovilizada mediante uniones de corto alcance tales como puente de hidrogeno y en menor medida uniones covalentes. El porcentaje de ácido anhídrido galacturónico indica la pureza de la pectina. Por lo tanto, la pectina analizada se considera de alta pureza al tener un  $70.397 \pm 4.3\%$  de ácido anhídrido galacturónico<sup>4</sup>.

### GRADO DE ENTRECruzAMIENTO, HINCHAMIENTO Y MÓDULO DE ALMACENAMIENTO DE LOS HIDROGELES

La Figura 2a muestra el porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles formulados. Todos los hidrogeles formulados poseen un grado de hinchamiento superior al 3000% mostrando su capacidad elevada para absorber y retener agua dentro de la red semi-IPN. La capacidad sumamente elevada de los hidrogeles para absorber agua se atribuye a la naturaleza altamente hidrofílica de la pectina. La pectina posee grupos hidroxilo y carboxilato capaces de formar puentes de hidrógeno intermoleculares con el agua. Considerando que la pectina utilizada tiene un grado bajo de metoxilación existe una gran cantidad de grupos hidrofílicos disponibles en este polisacárido que favorecen la retención de agua. Diferencias estadísticamente significativas son observadas al comparar el hidrogel Col-Pect10% con respecto a Col-Pect40%; indicando que el incremento en la concentración de pectina disminuye la capacidad de absorción de agua de los hidrogeles semi-IPN. El grado

de entrecruzamiento de los hidrogeles osciló entre 87 y 93% (Figura 2b). Los resultados mostraron que conforme se incrementa la cantidad de pectina en el hidrogel no hay un incremento estadísticamente significativo en el grado de entrecruzamiento. La pectina al ser un polímero lineal sólo se semi-interpenetra en la matriz colágeno-poliuretano, mediante interacciones de puente hidrogeno y en menor medida por reticulaciones amida, resultado de la reacción del isocianato del poliuretano o aminos primarios del colágeno con los carboxilatos de la pectina; sin embargo, esto último no ocurre en gran medida, ya que las condiciones de reacción ( $37^\circ C$ , pH 7.4) sólo aseguran que el poliuretano se reticule con los aminos primarios del colágeno, y como no se encuentra en exceso este reticulante (15 %m), no existe una parte significativa que reticule a la pectina.

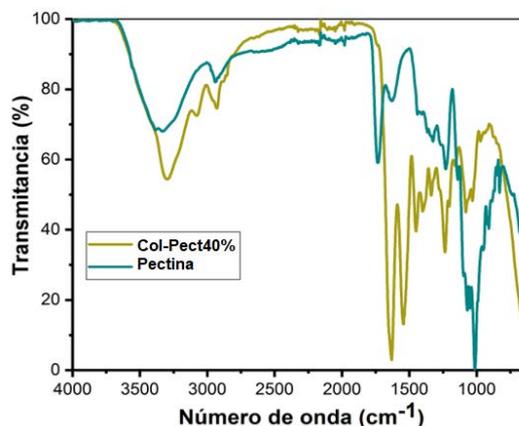
Este ligero incremento en la reticulación fisicoquímica de las matrices semi-IPN permite comprender el hecho de que conforme se incrementa la cantidad de pectina en el hidrogel haya una ligera disminución en la capacidad de hinchamiento. Ya que la capacidad de hinchamiento y el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles se encuentran relacionados de forma inversamente proporcional. Modulos de almacenamiento obtenidos a una frecuencia constante de 0.5 Hz de:  $2.03 \pm 0.2$  Pa,  $1.68 \pm 0.2$  Pa,  $1.96 \pm 0.2$  Pa y  $2.98 \pm 0.2$  Pa son registrados para Col-Pect10%, Col-Pect20%, Col-Pect30% y Col-Pect-40%, respectivamente (Figura 2c). Diferencias estadísticamente significativas son determinadas al comparar la matriz semi-IPN con mayor contenido de pectina con aquellas que tienen menor contenido; evidenciando que las interacciones de corto alcance que la pectina promueve en la red semi-IPN son responsables de incrementar el modulo de almacenamiento del hidrogel semi-IPN, y que esta mejora mecánica en el sistema semi-IPN es dependiente del contenido de pectina.

### CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

La caracterización mediante FTIR (Figura 3) confirmó la formación de redes semi-IPN de colágeno, poliuretano y pectina. En los espectros FTIR obtenidos de

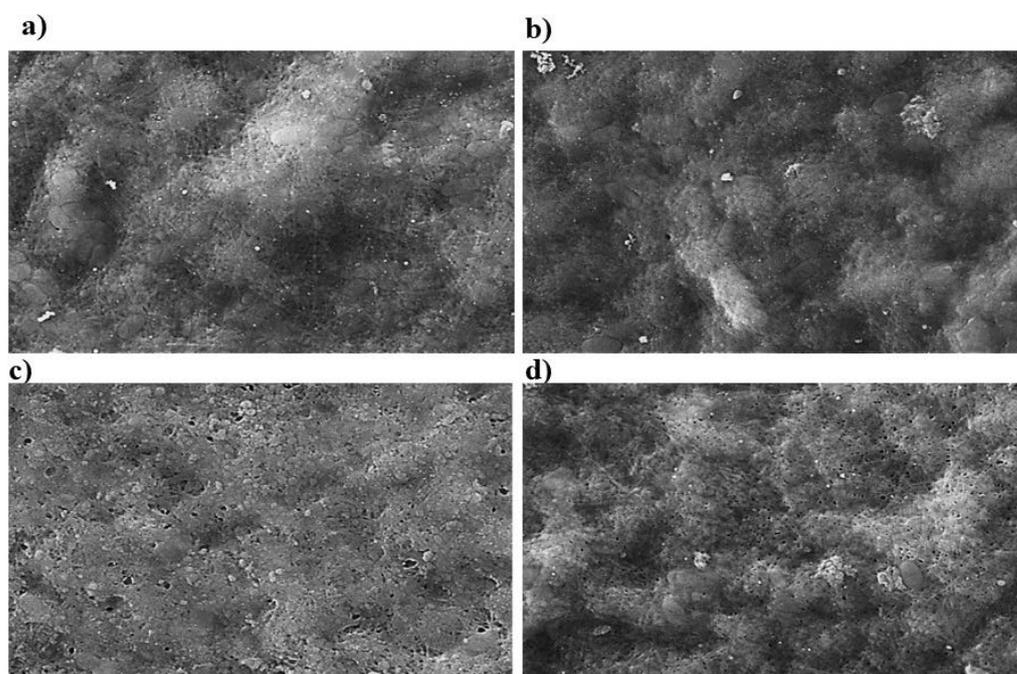
las muestras de pectina (10-40 %m) no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones, ya que no presentan una reticulación sin diferencias estadísticamente significativas. Se utilizó como referencia de las formulaciones a Col-Pect40%. En el espectro de la pectina se observa bandas de absorción entre  $3382\text{ cm}^{-1}$  y  $3337\text{ cm}^{-1}$  atribuidas a las vibraciones  $\nu\text{O-H}$  de alcohol y ácido carboxílico respectivamente. Posteriormente, en  $2936\text{ cm}^{-1}$  se muestra una banda debida a la vibración  $\nu\text{C-H}$  de los metinos del esqueleto del polisacárido. Las bandas  $1732\text{ cm}^{-1}$  y  $1230\text{ cm}^{-1}$  fueron asignadas a las vibraciones  $\nu\text{C=O}$  y  $\nu\text{C-O}$  de ácido carboxílico asociado mediante puentes de hidrógeno respectivamente. Las bandas de absorción en  $1631\text{ cm}^{-1}$  y  $1440\text{ cm}^{-1}$  fueron atribuidas a las vibraciones de elongación y deformación de los grupos carboxilato ( $\text{CO}_2^-$ ) de la pectina. Estas bandas muestran que parte de los grupos ácido carboxílico se encuentran en forma de sales. La banda debida a la elongación de los grupos acetal del esqueleto del polisacárido se observa en  $1140\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, la banda de absorción en  $1015\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la elongación de los enlaces C-O del ácido carboxílico. En el espectro de Col-Pect40% están ausentes las bandas de absorción de  $1732\text{ cm}^{-1}$  y  $1631\text{ cm}^{-1}$  debido a que los grupos ácido carboxílico de la pectina reaccionan con los isocianatos terminales del poliuretano para formar amidas<sup>21,22</sup>, sin embargo, no hay variación significativa de la intensidad de estas bandas indicando que estos enlaces de reticulación son originados en menor medida. Las bandas observadas en  $1630\text{ cm}^{-1}$  y  $1541\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las bandas de amida I y amida II, respectivamente. Además, las bandas de absorción en  $3287\text{ cm}^{-1}$  y  $3071\text{ cm}^{-1}$  fueron asignadas a las vibraciones  $\nu\text{O-H}$  de los grupos alcohol y ácido carboxílico, respectivamente. La banda en  $2926\text{ cm}^{-1}$  fue atribuida a la elongación  $\nu\text{C-H}$  de los metinos y metilenos de la pectina, colágeno y poliuretano. La

banda de absorción en  $1395\text{ cm}^{-1}$  es debida a la vibración  $\nu\text{C-O}$  del ácido carboxílico. La banda debida a la elongación de los grupos amino provenientes del colágeno se observa en  $1336\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, en  $1233\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda de absorción de la vibración  $\nu\text{C-O-C}$  de los enlaces glucosídicos que forman la pectina.



**Figura 3.** Espectros FTIR de Col-Pect40% y pectina

La figura 4 muestra las micrografías de SEM para hidrogeles formulados. En la Figura 4a se observa la microestructura de la matriz Col-Pect10% en la cual se observan las fibras de colágeno con porosidad interconectada, y agregados granulares que resultan del proceso de semi-interpenetración de las cadenas de pectina con las fibrillas de colágeno reticulado con poliuretano. En Figura 4b se observa que al incrementar el contenido de pectina al 20 %m disminuye la cantidad de fibras de colágeno visibles, mientras se incrementa la cantidad de agregados granulares formados por efecto de la semi-interpenetración polimérica. En la Figura 4 c se observa que al añadir un 30 %m de pectina, la matriz adquiere una microestructura



**Figura 4.** Micrografías SEM de los hidrogeles. a) Col-Pec10%, b) Col-Pec20%, c) Col-Pec30% y d) Col-Pec40%

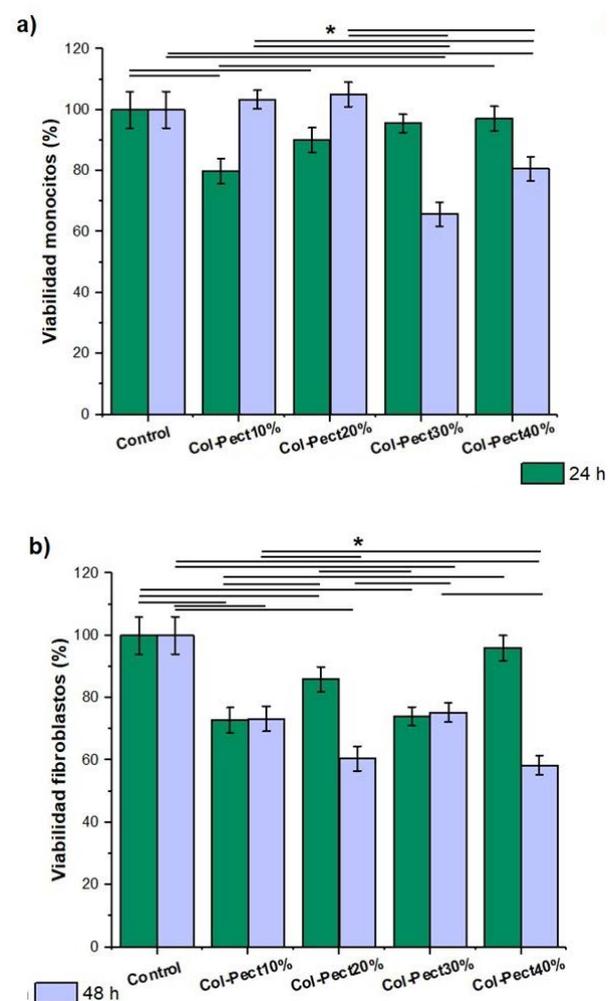
más homogénea, donde la segregación granular de la pectina y presencia de fibras de colágeno disminuyen, generando interfaces planas y porosas. Finalmente, en la Figura 4d (Col-Pect40%) se observa un aumento de regiones granulares de pectina semi-interpenetradas entre las fibrillas de colágeno generando una superficie irregular.

## VIABILIDAD CELULAR CON MONOCITOS Y FIBROBLASTOS

La biocompatibilidad de los hidrogeles formulados se evaluó a través del ensayo de viabilidad celular con sales de tetrazolio (MTT). La figura 5a muestra que la viabilidad de monocitos evaluada a las 24 h alcanzó valores superiores al 80% con todas las formulaciones evaluadas. A las 48h se observó una disminución en la viabilidad de monocitos para aquellas formulaciones que contienen 30 y 40 %m de pectina. Sin embargo, los valores de viabilidad se mantienen por encima del 60% mostrando que ninguna de las formulaciones evaluadas posee carácter citotóxico para estas células del sistema inmune. Diferencias estadísticamente significativas son determinadas a ambos tiempos de cultivo al comparar las formulaciones Col-Pect10% y Col-Pect20% con respecto a Col-Pect30% y Col-Pect40%; indicando que contenidos mayores al 20 %m de pectina generan superficies semi-IPN que disminuyen el metabolismo de los monocitos. Esta disminución en el metabolismo de estas células del sistema inmune, creciendo sobre superficies semi-IPN con alto contenido de pectina, se asocia con que las interacciones de corto alcance generadas en estas superficies semi-IPN impiden la difusión de nutrientes y gases, limitando la capacidad de reducir las sales de tetrazolio. De esta manera, las formulaciones con bajo contenido de pectina (10 %m y 20 %m) presentan buen desempeño, no alterando el metabolismo de monocitos. En la figura 5b se aprecia que la viabilidad de fibroblastos es mayor a 74 % para todas las formulaciones evaluadas a 24 h de incubación, disminuyendo la actividad metabólica respirante de los fibroblastos a 48 h de incubación.

Diferencias estadísticamente significativas son encontradas al comparar los valores de viabilidad de fibroblastos con el control y los sistemas semi-IPN que incluyen pectina para ambos tiempos de cultivo; evidenciando que las interacciones superficiales que experimentan los fibroblastos sobre estas matrices semi-IPN repercuten en alentar su metabolismo para la reducción de las sales de MTT, pero no produciendo superficies citotóxicas ya que valores mayores al 60 % son determinadas en todas las formulaciones. Similarmente que con el estudio de los monocitos, la viabilidad de fibroblastos para sistemas con alta concentración de pectina (Col-Pect40%) a 48 h de incubación disminuye significativamente, debido a la modificación superficial de la matriz de colágeno reticulado con poliuretano; asociada con la alta presencia de segregaciones granulares que la pectina promueve por semi-interpenetración en esta matriz, impidiendo un correcto transporte de nutrientes y gases que disminuye la actividad metabólica de los fibroblastos.

Estudios previos realizados en polisacáridos ricos en ácido galacturónico han mostrado efectos beneficiosos como la actividad antiinflamatoria<sup>23</sup>. Además, se ha reportado que los productos de hidrólisis de la pectina poseen un amplio espectro de actividades biológicas como inmunoestimulante, antibacteriana, antiadhesiva, antiinflamatoria y prebiótica<sup>24</sup>. Por lo tanto, podemos afirmar que la composición de los hidrogeles semi-IPN de colágeno, poliuretano y pectina es idónea para generar una respuesta biológica positiva durante el tratamiento de heridas graves. De este modo, durante el proceso de biodegradación, los hidrogeles liberan al medio sustancias útiles para la regeneración del tejido que incluyen aminoácidos, oligopéptidos y unidades monoméricas y oligoméricas de ácido galacturónico que pueden contribuir en el proceso de reparación tisular.



**Figura 5.** Viabilidad celular a las 24 y 48 h de incubación a) monocitos y b) fibroblastos

## ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

El ensayo de hematocompatibilidad de los hidrogeles mostró que el porcentaje de hemólisis de todas las formulaciones está por debajo del 5% (tabla 3). Por lo tanto, ninguna de las formulaciones evaluadas presenta capacidad hemolítica, lo cual puede ser aprovechado en estrategia de ingeniería tisular y biomedicina

en contacto con fluidos sanguíneos evitando así la formación de coágulos y alteración del flujo sanguíneo, demostrando nuevamente que la estructura química de los hidrogeles semi-IPN estudiados es compatible con eritrocitos, permitiendo su crecimiento y difusión.

**Tabla 3.** Porcentaje de hemolisis de los hidrogeles.

Muestra	Hemolisis (%)
Control (-)	0
Control (+)	100 ± 3
PBS-1X	55.3 ± 1
Col-Pect10%	2.2 ± 0.2
Col-Pect20%	1.8 ± 0.2
Col-Pect30%	0.04 ± 0.05
Col-Pect40%	2.3 ± 0.2

## CONCLUSIÓN

Se sintetizaron y caracterizaron fisicoquímicamente hidrogeles de redes semi-IPN a base de colágeno-poliuretano-pectina, generando superficies con una microestructura caracterizada por fibras y agregados granulares semi-interpenetrados con una porosidad característica, el contenido de pectina no muestra afectar significativamente el grado de reticulación; mientras que disminuye significativamente el hinchamiento e incrementa significativamente el módulo de almacenamiento de la matriz semi-IPN. Los hidrogeles demostraron no poseer carácter citotóxico para monocitos y fibroblastos creciendo sobre los hidrogeles hasta por 48 h, además presentaron ser materiales con alta hemocompatibilidad, por lo cual podrían ser aprovechados en áreas de biomedicina e ingeniería tisular.

## AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo para el desarrollo del proyecto ciencia de frontera 2019 FORDECYT/PRONACES/6666.

## REFERENCIAS

- Mendoza-Vargas, L., Jiménez-Forero, J. & Ramírez-Nino, M. Evaluación de la pectina extraída enzimáticamente a partir de las cáscaras del fruto de cacao (*Theobroma cacao* l.) *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, **2017**, 20(1), 131-138.
- Thakur, B. R., Singh, R. K. & Handa, A. K. Chemistry and uses of pectin--a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1997**, 37(1), 47-73.
- Lara-Rico, R., Claudio-Rizo, J. A., Muzquiz-Ramos, E. M. & López-Badillo, C. M. Hidrogeles de colágeno acoplados con hidroxiapatita para aplicaciones en ingeniería tisular. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, **2020**, 23, 1- 12.
- Chai, Q., Jiao, Y., & Yu, X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*, **2017**, 3(1), 6.
- Ramirez, A., Benítez, J. L., Rojas de Astudillo, L. & Rojas de Gáscue, B. Materiales polímeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, **2016**, 36(2), 108-130.
- Rojas de Gáscue, B., Prín, J. L., Ramirez, M., García, A., Arenas, F., Bejarano, L., Aguilera, R. & Katime I. Síntesis y caracterización de hidrogeles copoliméricos obtenidos a partir de acrilamida, ácido maleico y ácido acrílico. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **2008**, 9(3), 158-163.
- Navarro-Arias, D. K., Tavares-Negrete, J. A. & Quintero-Ortega, I. A. Síntesis y caracterización de hidrogel con aplicaciones en medicina regenerativa. *Jóvenes en la Ciencia*, **2018**, 4(1), 2632-2636.
- Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Yallapu, M. M. & Sadiku R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Materials Science and Engineering: C*, **2017**, 79, 958-971.
- Bajpai, S. K. & Swarnkar M. P. New Semi-IPN Hydrogels Based on Cellulose for Biomedical Application. *Journal of Polymers*, **2014**, 376754.
- Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen Structure and Stability, *Annual Review of Biochemistry*, **2009**, 78, 929-958.
- Giusto, G., Vercelli, C., Comino, F., Caramello, V., Tursi, M. & Gandini, M. A new, easy-to-make pectin-honey hydrogel enhances wound healing in rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **2017**, 17, 266.
- Mendoza-Novelo, B., Mata-Mata, J. L., Vega-González, A., Cauich-Rodríguez, J. V. & Marcos-Fernández, A. Synthesis and characterization of protected oligourethanes as crosslinkers of collagen-based scaffolds. *Journal of Materials Chemistry B*, **2014**, 2, 2874-2882.
- Arredondo-Peñaranda, A. & Londoño-López, M.E. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*, **2008**, 3(5), 83-94.
- Hinderer, S., Layland, S. L. & Schenke-Layland, K. ECM and ECM-like materials — Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2016**, 97, 260-269.
- Cheema, U., Ananta, M. & Mudera, V. Collagen: Applications of a Natural Polymer in Regenerative Medicine. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials, Intechopen*, **2011**, 287-300.
- Claudio-Rizo, J. A., González-Lara, I. A., Flores-Guía, T. E., Cano-Salazar, L. F., Cabrera-Munguía, D. A. & Becerra-Rodríguez, J. J. Study of the polyacrylate interpenetration in a collagen-polyurethane matrix to prepare novel hydrogels for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2020**, 156, 27-39.
- Muñoz-González, P. U., Rivera-Debernardi, O., Mendoza-Novelo, B., Claudio-Rizo, J. A., Mata-Mata, J. L., Delgadillo-Holtfort, I., Carriles, R., Flores-Moreno, M., González-García, G., Cau-

- ich-Rodríguez, J. V., Delgado, J. & Castellano, L. E. Design of Silica-Oligourethane-Collagen Membranes for Inflammatory Response Modulation: Characterization and Polarization of a Macrophage Cell Line. *Macromolecular Bioscience*, **2018**, 18(9), 1800099.
18. Claudio-Rizo, J. A., Mendoza-Novelo, B., Delgado, J., Castellano, L. E. & Mata-Mata, J. L. A new method for the preparation of biomedical hydrogels comprised of extracellular matrix and oligourethanes. *Biomedical Materials*, **2016**, 11(3):035016.
  19. Claudio-Rizo, J. A., Rangel-Argote, M., Muñoz-González, P. U., Castellano, L. E., Delgado, J., Gonzalez-García, G., Mata-Mata, J. L & Mendoza-Novelo, B. Improved properties of composite collagen hydrogels: protected oligourethanes and silica particles as modulators. *Journal of Materials Chemistry B*, **2016**, 4, 6497-6509.
  20. Claudio-Rizo, J. A., Hernández-Hernández, N. G., Cano, Salazar, L. F., Flores-Guía, T. E., De la Cruz-Durán, F. N., Cabrera-Munguía, D. A. & Becerra-Rodríguez, J. J. Novel semi-interpenetrated networks based on collagen-polyurethane-polysaccharides in hydrogel state for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, **2020**, 138, 1- 16.
  21. Blagbrough, I. S., Mackenzie, N. E., Claudio Ortiz & Scott, A.I. The condensation reaction between isocyanates and carboxylic acids. A practical synthesis of substituted amides and anilides. *Tetrahedron Letters*, **1986**, 27(11), 1251- 1254.
  22. Gertzmann, R. & Gürtler, C. A catalyst system for the formation of amides by reaction of carboxylic acids with blocked isocyanates. *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46(39), 6659- 6662.
  23. Wu, Y., Cui, S. W., Tang, J., Wang, Q. & Gu, X. Preparation, partial characterization, and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. *Carbohydrate polymers*, **2007**, 70(4), 437-443
  24. Ding H. & Cui, S. W. *Pectin Bioactivity. Pectin: Technological and Physiological Properties*. Springer, Cham. **2020**, 167-178