

03-008

**DEVELOPMENT OF BIOPOLYMER-BASED HYDROGELS FROM PORK COLLAGEN FOR TISSUE
ENGINEERING.**

Pérez Puyana, Víctor Manuel ⁽¹⁾; Sánchez-Cid, Pablo ⁽¹⁾; Jiménez Rosado, Mercedes ⁽¹⁾; Ayala, Regla ⁽¹⁾;
Romero, Alberto ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidad de Sevilla

The development of biomaterials encompasses three different stages: selection of the raw material, processing technique and characterization of the final product. Among them, hydrogels have been presented as potential candidates in pharmaceutical and biomedical applications due to their physicochemical properties. Most of the studies about hydrogels are based on natural polymers for their excellent biological properties. However, their processing is complex, since several parameters need to be controlled such as gelation time, pH of the solution and gelation temperature. Nevertheless, it is also important to select and characterize the raw material before the fabrication of the hydrogels. Therefore, the objective of the work is to optimize the hydrogel fabrication, evaluating both the raw material to be used and the processing parameters that can influence the process. This evaluation has been carried out by studying its mechanical, morphological and biological properties. Results show how the parameters defined during the hydrogel processing are essential in the final properties obtained. In addition, some of the systems have suitable properties for their potential use in Tissue Engineering.

Keywords: Collagen; hydrogels; rheology; tissue engineering.

**DESARROLLO DE HIDROGELES BIOPOLIMÉRICOS A PARTIR DE COLÁGENO DE CERDO PARA SU USO
EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.**

El desarrollo de biomateriales abarca tres etapas diferentes: selección de materia prima, técnica de procesado y caracterización del producto final. Entre ellos, los hidrogeles se han presentado como candidatos potenciales en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas por sus propiedades fisicoquímicas. La mayor parte de los estudios sobre hidrogeles se basan en polímeros naturales por sus excelentes propiedades biológicas. Sin embargo, su procesado es complejo, puesto que se han de controlar parámetros como el tiempo de gelificación, el pH de la disolución y la temperatura de gelificación. No obstante, también es importante seleccionar y caracterizar adecuadamente la materia prima, ya que afecta a las propiedades de los hidrogeles obtenidos. Por tanto, el objetivo de este trabajo es optimizar el proceso de fabricación de hidrogeles de colágeno, evaluando tanto la materia prima a utilizar como los parámetros de procesado que pueden influir en el proceso. Dicha evaluación se ha llevado a cabo mediante el estudio de sus propiedades mecánicas, morfológicas y biológicas. Los resultados muestran como los parámetros definidos durante el procesado del hidrogel son claves en las propiedades finales obtenidas. Además, algunos de ellos presentan adecuadas propiedades para su potencial uso en Ingeniería de Tejidos.

Palabras claves: Colágeno; hidrogeles; reología; ingeniería de tejidos.

Correspondencia: Víctor Manuel Pérez Puyana vperez11@us.es

Agradecimientos: Este trabajo es parte de un proyecto de investigación (Ref RTI2018-097100-B-C21) del Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación (MCI/AEI/FEDER, EU). Los autores agradecen su apoyo financiero. A los autores les gustaría agradecer también al servicio de microscopía del CITIUS (Universidad de Sevilla) por dar acceso y asistencia técnica durante las medidas de SEM. Finalmente, los autores agradecen a la Universidad de Sevilla y la Junta de Andalucía por el contrato postdoctoral de Víctor M. Pérez Puyana (PAIDI-DOCTOR) y al Ministerio de Educación y Formación Profesional por la beca predoctoral de Mercedes Jiménez Rosado (FPU2017/01718)



1. Introducción

La Ingeniería de Tejidos (IT) es un campo de investigación prometedor y multidisciplinar que incluye una combinación de biología, ciencia de materiales, química, ingeniería y medicina (Lin et al., 2015). El objetivo de la Ingeniería de Tejidos es preservar, recuperar y regenerar órganos o tejidos dañados mediante la combinación de células nativas, materiales biocompatibles y moléculas bioactivas (Aydogdu et al., 2018). Los materiales utilizados en IT reciben el nombre de biomateriales. Es importante mencionar que no todos los materiales pueden actuar como biomateriales para IT, ya que necesitan cumplir unos requerimientos como ser biocompatible, bioactivos o tener una cierta resistencia mecánica y porosidad (Jeong et al., 2017). El desarrollo de un biomaterial abarca tres etapas diferentes: la selección de la materia prima, la técnica de procesado y la caracterización del producto final.

En la actualidad, la mayoría de los estudios se llevan a cabo utilizando polímeros naturales como materia prima debido a sus excelentes propiedades biológicas. De los polímeros naturales posibles, el colágeno puede destacarse como un polímero versátil, que se ha utilizado para producir biomateriales a partir de varias técnicas diferentes, confiriendo un amplio rango de características finales al biomaterial (Perez-Puyana et al., 2019).

En cuanto a la fabricación de biomateriales, diferentes técnicas de procesado se han ido utilizando a lo largo de la historia. De esta forma, Stratton et al. (2018) muestran el gran avance generado en el desarrollo de biomateriales mediante impresión 3D para IT de tejidos blandos. Por otro lado, Perez-Puyana et al. (2020) desarrollaron biomateriales híbridos de gelatina y quitosano mediante secado por liofilización y Rodríguez-Rodríguez et al. (2019) biomateriales de gelatina, quitosano y PVA mediante la formación de hidrogeles, ambos estudios con la misma finalidad de regenerar tejido blando mediante IT. Entre ellos, la formación de hidrogeles se usa ampliamente para obtener biomateriales a partir de polímeros naturales. Los hidrogeles son sistemas tridimensionales (3D) formados gracias a la capacidad de absorber y retener una gran cantidad de agua que poseen los polímeros hidrófilos, formando una red polimérica y dando lugar a la estructura del hidrogel (Van Vlierberghe et al., 2011). El origen de los hidrogeles es variado aunque particularmente, aquellos fabricados a partir de polímeros naturales, tienen grandes ventajas, como son la no toxicidad y la biodegradabilidad (Li et al., 2019).

Por último se ha de proceder a la caracterización del producto final (en nuestro caso el biomaterial). En este sentido, es importante caracterizar las propiedades mecánicas y la estabilidad de los hidrogeles, así como su morfología, para garantizar una buena comprensión de su estructura. De hecho, como las propiedades finales de los hidrogeles pueden verse afectadas por las propiedades de la materia prima, es importante no solo caracterizar las propiedades de las estructuras finales formadas, sino también seleccionar y caracterizar adecuadamente la materia prima antes de proceder a la fabricación del hidrogel.

En este contexto, la contribución innovadora de este trabajo es el estudio conjunto de la caracterización de la materia prima (colágeno en nuestro caso), además del estudio de la influencia de las diferentes condiciones de procesado (pH y temperatura) sobre las propiedades de los hidrogeles elaborados.

2. Objetivos

El objetivo principal del proyecto consiste en el desarrollo de andamios, con características adecuadas de porosidad y resistencia mecánica, que sean viables para el desarrollo de tejidos musculares y biocompatibles a partir de colágeno tipo I.

Para alcanzar el objetivo global se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización fisicoquímica de la materia prima (colágeno tipo I)
- Desarrollo de hidrogeles con la optimización de las condiciones de procesado: tiempo, pH y temperatura de gelificación
- Selección de los hidrogeles en función de sus propiedades reológicas.
- Caracterización adicional del sistema elegido mediante una evaluación mecánica y morfológica.

3. Metodología

3.1 Materiales

Para este estudio, se ha utilizado un aislado proteico procedente de Essentia Protein Solutions (Dinamarca). La ficha técnica del producto indica que se trata de colágeno tipo I obtenido a partir de cerdo (código T95), con un porcentaje de materia proteica superior al 90%, no aportándose más datos específicos de su composición.

Además, el ácido acético que se utilizó como disolvente es un ácido carboxílico formado por una cadena de dos átomos de C. El ácido acético utilizado fue suministrado por PANREAC.

3.2 Procesado de hidrogeles

Para la elaboración de los distintos sistemas se ha seguido la técnica de formación de hidrogeles. Para ello, se prepara una disolución de colágeno (10 mg/mL) en ácido acético 0,05 M que se centrifuga a 12000 rpm, manteniendo la temperatura de la disolución a 4 °C. A continuación, se lleva a cabo una etapa de gelificación.

Se han estudiado sistemas diferentes variando cada uno de los parámetros de procesado con la finalidad de comprobar la influencia de las condiciones de fabricación sobre el resultado final del andamio (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de procesado de hidrogeles

Estudios	pH	Tiempo de gelificación	Temperatura de gelificación
Estudio combinado del pH y la temperatura de congelación	3	2 h	4 °C
	6		
	10		
	3		
	6		
	10		
			20 °C

3.3 Métodos de caracterización

3.3.1 Caracterización de la materia prima

- Composición Química:

En primer lugar, el contenido proteico se ha determinado por cuadruplicado usando un microanalizador LECO CHNS-932 (Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA) utilizando la relación con un % N x 5,95. La técnica de análisis consiste en la combustión de las muestras para convertir los distintos elementos en gases que permiten una determinación cuantitativa.

La cuantificación de los lípidos se realizó a partir del método Soxhlet. Esta técnica consiste en el calentamiento y volatilización de un disolvente (hexano) y su posterior condensación para que se ponga en contacto con la muestra extrayendo los lípidos de la misma. El contenido en lípidos de la muestra se mide por la pérdida de peso de la muestra, es decir, se calcula por diferencia de pesada de la muestra antes y después de la extracción siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lípidos} = (\text{Peso Inicial} - \text{Peso Final}) / (\text{Peso Inicial}) \cdot 100 \quad (1)$$

El contenido en cenizas se obtiene calcinando la muestra. Esto se realiza mediante un tratamiento térmico a 550 °C en un horno mufla durante 4-5 h. La cantidad de cenizas se calculará por diferencia de pesada de la muestra proteica antes y después del protocolo.

Para obtener la humedad de la materia prima se tratan unos 1,5-2,0 g de muestra en estufa a 105 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, la muestra solamente habría perdido su contenido en agua sin haberse desnaturalizado. El cálculo del porcentaje de humedad puede obtenerse, de forma similar a los lípidos usando la ecuación 1.

- Potencial-Z:

Se prepararon muestras al 1% en peso con buffers a diferentes valores de pH. Para el análisis, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Sorvall RC5C (Sorvall Instruments, EEUU). Después de eso, las muestras se midieron por triplicado a 20 °C en un Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido).

- Espectroscopía Infrarroja:

El espectro de infrarrojos se obtuvo utilizando unos 2 mg aprox. de muestra por medio del espectrofotómetro FTIR-4100 desde 4000 a 600 cm^{-1} y se procesaron por medio del programa Jasco Spectra ManagerTM.

3.3.2 Caracterización de los hidrogeles

- Evaluación reológica:

Los hidrogeles se evaluaron mediante ensayos de barrido de deformación y frecuencia a 25 °C en un reómetro de esfuerzo controlado AR 2000 (TA Instruments, EE. UU.). Se llevaron a cabo barridos de deformación (0,10 y 100%) con una frecuencia de 1 Hz. Este ensayo permite determinar el intervalo viscoelástico lineal, así como la deformación crítica. La deformación crítica es un parámetro fundamental, ya que es la transición desde el estado elástico al plástico del sistema. Por otro lado, se realizaron barridos de frecuencia (entre 0,1 y 10 Hz), a una deformación específica dentro del intervalo viscoelástico lineal.

- Evaluación morfológica:

La evaluación morfológica de los hidrogeles se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de crio-barrido (Crio-SEM) usando un Zeiss EVO (Zeiss, EE. UU.) a un voltaje de aceleración de 10 kV. Antes de ser observadas por el microscopio, las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se cubrieron con una película de Au-Pd en una máquina de recubrimiento por pulverización catódica de alta resolución (Leica, EE. UU.).

3.4 Análisis estadístico

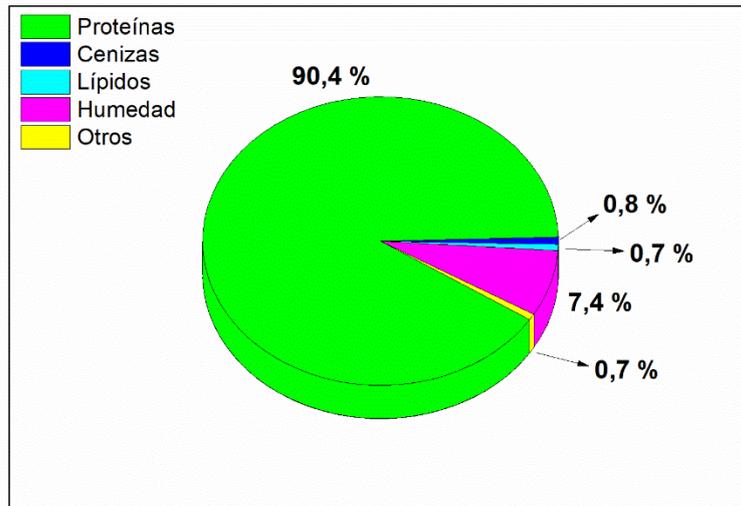
Se realizaron al menos tres mediciones de cada muestra. El análisis estadístico se realizó comparando los valores medios (t de Student). Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) utilizando el paquete estadístico SPSS 18. Las desviaciones estándar de algunos parámetros seleccionaron se utilizaron para comparar los sistemas.

4. Resultados y Discusión

4.1 Caracterización de la materia prima

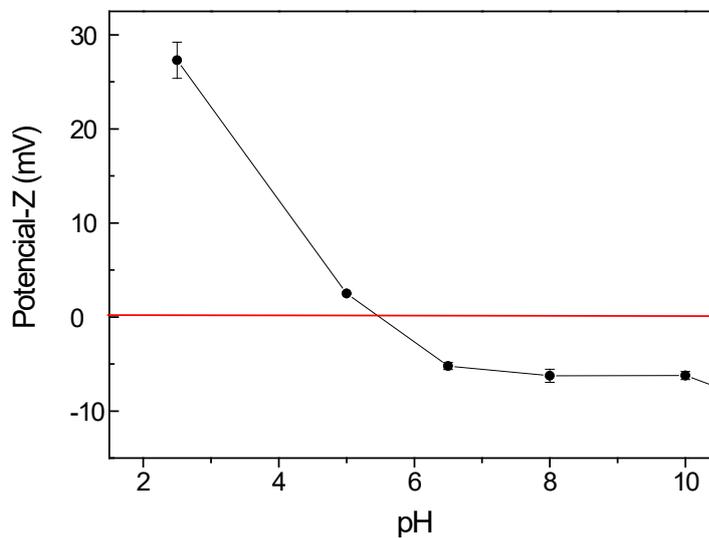
La Figura 1 muestra la composición del colágeno tipo I utilizado como materia prima. En la presente composición se destaca el alto porcentaje de proteína. Como la concentración de proteína presente es de más de un 90%, se puede considerar como un aislado proteico según la clasificación de Pearson (1983). Por otro lado, y utilizando los métodos expuestos en la parte experimental se llegan a encontrar bajos porcentajes de lípidos y cenizas.

Figura 1. Composición del colágeno Tipo I utilizado como materia prima



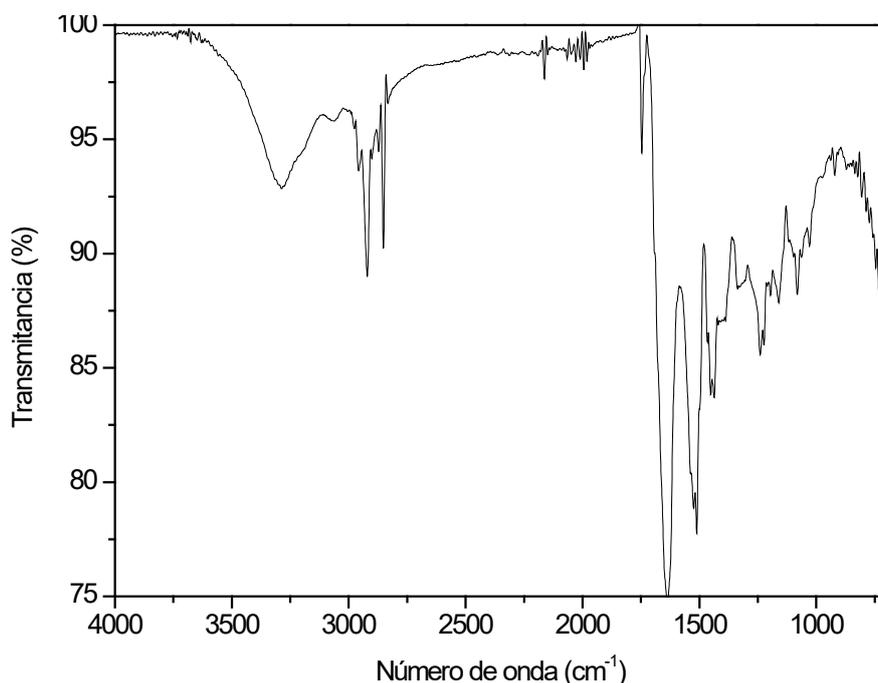
La Figura 2 muestra la evolución del Potencial-Z en función del pH para el colágeno utilizado. Se observa un descenso en los valores del potencial, pasando de 25 mV (pH 3) a -6 mV (pH 10). El punto isoeléctrico de la proteína se corresponde con el pH en el que el valor del potencial es 0, ya que se trata del pH al cual la carga total neta es nula. De acuerdo con el perfil observado en la figura, el punto isoeléctrico de la proteína se encuentra en el intervalo entre 4-6.

Figura 2. Evaluación del Potencial-Z con el pH para el colágeno tipo I utilizado



Por otra parte, la Figura 3 muestra el espectro de infrarrojos de la materia prima. En él pueden verse los picos más característicos de proteínas, destacando la señal a $3400-3300\text{ cm}^{-1}$, referida a la tensión N-H, y las señales que aparecen en el rango entre 1650 y 1500 cm^{-1} , relacionadas con la tensión C=O y la flexión N-H acoplada con la tensión C-N, respectivamente.

Figura 3. Espectro FTIR del aislado proteico de colágeno



4.2 Caracterización de los hidrogeles

La caracterización de los hidrogeles se llevó a cabo mediante un estudio reológico de sus propiedades viscoelásticas. Para ello, se realizaron barridos de deformación para obtener su intervalo viscoelástico lineal, así como su deformación crítica. De forma general, a pH bajos la temperatura más baja (4 °C) favorece la deformabilidad mientras que a valores de pH más elevados (10) no hay diferencias significativas. Los valores de deformación crítica obtenidos para los distintos sistemas analizados se muestran en la Tabla 2:

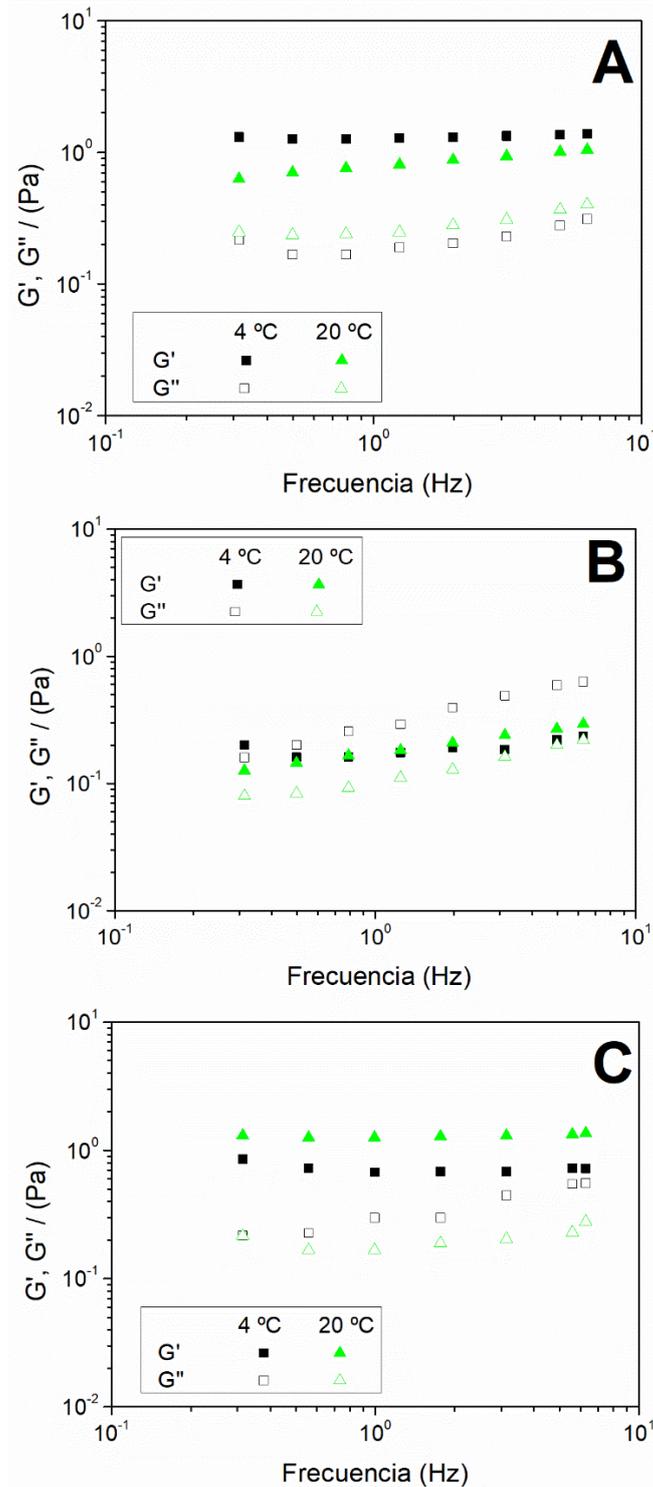
Tabla 2. Deformación crítica de los distintos hidrogeles estudiados

Temperatura	pH	Deformación crítica (%)
4 °C	3	1,01 ± 0,05
	6	0,69 ± 0,10
	10	1,01 ± 0,03
20 °C	3	0,42 ± 0,08
	6	0,27 ± 0,05
	10	1,01 ± 0,21

Además, también se llevaron a cabo barridos de frecuencia (Figura 4). Tal y como puede observarse, a una temperatura de gelificación de 4 °C los perfiles muestran una evolución

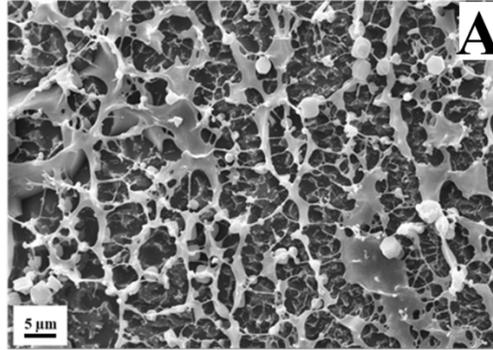
desde un sistema más estructurado a pH 3 o pH 10 (Figuras 4A y 4C) a otro con un carácter más fluido cuando se trabaja a pH intermedios (6). En contraposición, todos los sistemas producidos a 20 °C presentan unos valores de G' por encima de G'' , destacando el carácter sólido de estos sistemas en todo el rango de pH estudiado.

Figura 4. Barridos de frecuencia para los hidrogeles preparados a 4 y 20 °C y (A) pH 3, (B) pH 6 y (C) pH 10.



En base a los resultados obtenidos, el uso de un pH ácido (pH 3) a baja temperatura (4 °C) se presenta como la mejor opción para la obtención de hidrogeles de colágeno. Por tanto, se selecciona este sistema para llevar a cabo una caracterización más exhaustiva desde el punto de vista morfológico. De esta forma, se ha evaluado la morfología del sistema mediante microscopía electrónica de crio-barrido (Crio-SEM) (Figura 5).

Figura 5: Imagen de Crio-SEM de los sistemas preparados a pH 3 y 4 °C



A partir de la imagen de Crio-SEM pudo observarse que el hidrogel estaba menos ramificado y poseía una estructura macroporosa con tamaños de poros que van desde 0,8 hasta 17,2 μm .

5. Conclusiones

Como conclusión general, se ha conseguido desarrollar una matriz proteica de colágeno (andamio) mediante un proceso de gelificación controlando la temperatura, el tiempo y el pH. Además, se han evaluado los diferentes sistemas procesados a distintas condiciones de gelificación, presentando algunos de ellos propiedades adecuadas para su potencial aplicación en Ingeniería de Tejidos.

La caracterización de la materia prima revela que se trata de un aislado proteico pues presenta un contenido superior al 90% en peso de proteínas, encontrándose su punto isoeléctrico en el intervalo de pH de 4 a 6.

El estudio del procesado de hidrogeles demuestra que las condiciones más adecuadas para su fabricación es un pH ácido (pH 3) y una temperatura baja (4 °C). Además, la caracterización morfológica de los hidrogeles seleccionados revela que la elaboración de hidrogeles elaborados a pH ácido genera una estructura macroporosa con un rango de tamaño de poro entre 0,88 y 17,14 μm .

Referencias

- Aydogdu, M.O., Oner, E.T., Ekren, N., Erdemir, G., Kuruca, S.E., Yuca, E., Bostan, M.S., Eroglu, M.S., Ikram, F., Uzun, M., & Gunduz, O. (2018). Comparative characterization of the hydrogel added PLA/ β -TCP scaffolds produced by 3D bioprinting. *Bioprinting*, 46, 1-10.
- Jeong, K.-H., Park, D., & Lee, Y.-C. (2017). Polymer-based hydrogel scaffolds for skin tissue engineering applications: a mini-review. *Journal of Polymer Research*, 24, 112.

- Li, L., Yu, F., Zheng, L., Wang, R., Yan, W., Wang, Z., Xu, J., Wu, J., Shi, D., Zhu, L., Wang, X., & Jiang, Q. (2019). Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application. *Journal of Orthopaedic Translation*, 17, 26-41.
- Lin, X., Huang, J., Shi, Y., & Liu, W. (2015). Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Applied Research: A Year in Review of 2014. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 21, 177–186.
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Guerrero, A., & Romero A. (2019). Crosslinking of hybrid scaffolds produced from collagen and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 2362-269.
- Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J., Jiménez-Rosado, M., Guerrero, A., & Romero A. (2020). Alternative processing methods of hybrid porous scaffolds based on gelatin and chitosan. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 102, 103472.
- Rodríguez-Rodríguez, R., García-Carvajal, Z.Y., Jiménez-Palomar, I., Jiménez-Avalos, J.A., & Espinosa-Andrews, H. (2019). Development of gelatin/chitosan/PVA hydrogels: Thermal stability, water state, viscoelasticity, and cytotoxicity assays. *Journal of Applied Polymer Science*, 136, 47149.
- Stratton, S., Manoukian, O.S., Patel, R., Wentworth, A., Rudraiah, S., & Kumbar, S.G. (2018). Polymeric 3D printed structures for soft-tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 135, 45569.
- Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., & Schacht, E. (2011). Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 12, 1387–1408.

Objetivos de Desarrollo Sostenible

El objetivo de Desarrollo Sostenible que se persigue en este trabajo es “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades” (Objetivo 3):

