

# **MEZCLAS DE ALGINATO Y PROTEÍNA DE SOJA PARA EL DESARROLLO DE MATRICES POROSAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR**

**Álvarez-Castillo, Estefanía\*;** **Aguilar, José Manuel;** **Félix, Manuel;** **Guerrero, Antonio**

Tecnología y diseño de productos multicomponentes  
Ingeniería Química. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

\*E-mail: [malvarez43@us.es](mailto:malvarez43@us.es)

## **RESUMEN**

Los biopolímeros, como polisacáridos y proteínas, son materiales extraordinariamente atractivos para la obtención de matrices porosas con potencial aplicación en ingeniería tisular; debido, a la mejor solubilidad en agua, biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de funcionalización que presentan estos biomateriales frente a los polímeros sintéticos. El alginato es un polisacárido de bajo coste, capaz de formar geles estables en presencia de iones divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, también es conocida su pérdida de resistencia mecánica a lo largo del tiempo, lo que ocasiona su desintegración, suponiendo una importante limitación en aplicaciones biomédicas. El objetivo de este estudio ha sido superar este inconveniente mediante el mezclado de alginato con proteína de soja, obteniendo bioplásticos por inyección usando glicerina como plastificante, así como estudiar su posible aplicación como matrices en ingeniería tisular. En el estudio se modificaron las concentraciones de alginato y proteína de soja para observar la variación que esto suponía para las propiedades de los bioplásticos mediante ensayos reológicos de tracción, absorción de agua y pérdida de material soluble. Además, se estudió la influencia de las concentraciones de las disoluciones de  $\text{CaCl}_2$ , utilizadas para promover la retención del alginato en las matrices, las cuales fueron evaluadas mediante ensayos reológicos de compresión.

## **PALABRAS CLAVE**

Matriz, Biodegradable, Ingeniería tisular, Bioplástico.

## ABSTRACT

Biopolymers as polisacharydes and proteins are extremely attractive materials to the obtainment of porous matrixes with a potential application in tissue engineering, because of their better solubility in water, biocompatibility, biodegradability and their capacity of functionalization which those materials present versus the synthetic polymers. Alginate is a low cost polysaccharide. It can form stable gels in the presence of divalent ions as  $\text{Ca}^{2+}$ . However, it is known that its mechanic resistance decreases along time, being that an important limitation to use alginate in biomedicine applications. The principal aim of this study has been overcome this disadvantage mixing alginate with a soy protein isolate, obtaining injected bioplastics using glycerol as plasticizer, study their potential use in tissue engineering. The concentration of alginate and soy protein were modified in blends to observe variations in the properties of bioplastics by means of rheological tests of traction, water uptake and soluble material lost essays. In addition, the influence of different concentrations of  $\text{CaCl}_2$  in aqueous solution, used to promote the retention of alginate in the matrixes, evaluates then by rheological essays in compression tests.

## KEYWORDS

Matrix, Biodegradability, Tissue engineering, Bioplastic.

## **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

La ingeniería tisular trata de la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y ciencias biológicas para el entendimiento de la relación estructura-función en tejidos, y el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de dichos tejidos [1]. Tradicionalmente los materiales sintéticos han sido los más utilizados para la realización de materiales en ingeniería tisular, sin embargo, en las últimas décadas, se ha prestado una mayor atención al uso de formulaciones basadas en macromoléculas presentes en los seres vivos como polisacáridos o proteínas [2]. Este estudio centra su atención en la retención del polisacárido (con  $\text{CaCl}_2$ ) en mezclas de alginato y proteína de soja para la obtención de materiales útiles en este campo.

El alginato es un polisacárido lineal compuesto de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -D-gulurónico (G), que forma parte de la pared celular de las algas marrones. Este compuesto es utilizado comúnmente en la industria farmacéutica y alimentaria, como espesante, gelificante y estabilizante. También en la ingeniería tisular es utilizado, por sus buenas condiciones de biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioestabilidad y su precio asequible.

La proteína de soja es un componente muy utilizado en la industria alimentaria, debido a sus buenas propiedades en la formación de geles, y emulsiones [3]. Además, existen estudios que sugieren que su consumo puede estar asociada a una menor incidencia de ciertas enfermedades crónicas, y cardiovasculares. Aunque un exceso de esta en la dieta puede inducir problemas reproductivos y tiroidales.

El objetivo de este estudio ha sido la obtención de bioplásticos y matrices para conocer su alcance como materiales para ser utilizados en ingeniería tisular. Para ello se obtuvieron mezclas compuestas por glicerina, proteína de soja y alginato; a partir de las cuales se prepararon bioplásticos por inyección, y matrices por liofilización de estos. Las variables estudiadas han sido la relación Alginato/Proteína de soja y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  en la disolución en la que se sumergieron los bioplásticos, previamente a la obtención de matrices. El estudio de las propiedades de distintas formulaciones de bioplásticos se llevó a cabo mediante ensayos reológicos de tracción dinámica y estacionaria, y de la determinación de sus capacidades de absorción de agua y de pérdida de material soluble. Por otro lado, se realizaron ensayos reológicos de compresión dinámica a las matrices.

## METODOLOGÍA

### Materiales

El alginato (ALG) utilizado es una sal sódica de ácido algínico proveniente de algas marrones, de la casa comercial Sigma, de viscosidad media. El aislado de soja (SPI) utilizado fue obtenido por Protein Technologies International (Bélgica) y suministrada por PROANDA (España). Como platificante se empleó glicerina<sub>2</sub> suministrada por la casa comercial PANREAC. Además, para fijar el alginato en la matriz proteica se empleó cloruro de calco de la casa comarcial PANREAC.

### Métodos

#### *Preparación de probetas*

Este proceso tiene dos etapas diferentes; en la primera, las materias primas son introducidas en un reómetro mezclador HAAKE POLYLAB (Thermo Scientific, Alemania) con una cámara mezcladora en la que se sitúan dos rotores tipo delta que giran en sentido contrarrotatorio que se encarga de mezclar los componentes hasta obtener una masa homogénea. Se utilizó una velocidad de 50 rpm durante 30 minutos a temperatura constante, considerando que estas condiciones eran suficiente para obtener mezclas completamente uniformes. La segunda etapa para la obtención de los bioplásticos inyectar las masas anteriores en un molde usando una inyectora Mini Jet II (Haake-Thermo Scientific, Alemania). Los parámetros de inyección seleccionados fueron: tiempo de inyección (300 s), presión de inyección (500 bar), temperatura en el cilindro: 40 °C, temperatura en el molde: 70 °C. Se realizaron bioplásticos con diferentes proporciones de ALG, SPI y GL. La relación ALG+SPI/GL se mantuvo constante, siendo igual a 1,33, mientras que la relación ALG/SPI se modificó entre 0/2, 1/2 y 2/2 (esta nomenclatura será la utilizada para nombrar a las muestras, ya sea bioplástico o matriz, ya que es el único parámetro que diferencia unas de otras).

#### *Caracterización de los bioplásticos*

##### **Absorción de agua y pérdida de material soluble:**

Este método se realizó conforme a la norma ASTM D570, 2001. En un primer momento se pesan las muestras a ensayar, posteriormente se introducen en el horno (50 ± 2 °C) hasta alcanzar un peso constante (peso seco inicial), tras la etapa de acondicionamiento, las muestras se introducen en agua durante 24 horas y se determina su masa (peso húmedo). Para calcular la absorción de agua y la pérdida de material soluble de las muestras se utilizaron las fórmulas que siguen:

$$\% \text{ Absorción de agua} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco inicial}}{\text{Peso seco inicial}} \quad (1)$$

$$\% \text{ Pérdida Soluble} = \frac{\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco final}}{\text{Peso seco inicial}} \quad (2)$$

### Ensayos reológicos a probetas:

La caracterización reológica se llevó a cabo en un equipo de análisis mecánico dinámico (TA Instruments, USA). Los ensayos reológicos a los que se sometieron las probetas (dimensiones: 60x10x1 mm<sup>3</sup>) fueron ensayos dinámicos de tracción en un rango de frecuencia entre 0,02-20 Hz para una deformación inferior a la deformación crítica (aprox. 60%), la cual fue determinada previamente mediante barridos de deformación realizados entre 0,02- 2% a una frecuencia de 1 Hz); las probetas también fueron ensayadas mediante deformación hasta rotura, con una velocidad de 0,01 mm/s.

### Preparación de matrices:

Para la obtención de las matrices se introdujeron las probetas de bioplásticos en un horno a 50 ± 2 °C durante 24 horas. Tras este tiempo se introdujeron en agua o en una disolución de CaCl<sub>2</sub>, según corresponda durante el mismo periodo. Finalmente se introdujo la probeta mojada e hinchada en un congelador a -40 °C, durante aproximadamente dos horas, para posteriormente liofilizarlas en un liofilizador Telstar LyoQuest, durante 24 horas.

### *Caracterización de las matrices*

### Ensayos reológicos a probetas:

Se realizaron ensayos reológicos dinámicos a compresión en mismo reómetro utilizado para los bioplásticos, con un sensor placa-placa de 8 mm de diámetro, se realizaron barridos de deformación y frecuencia con los mismos parámetros utilizados anteriormente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

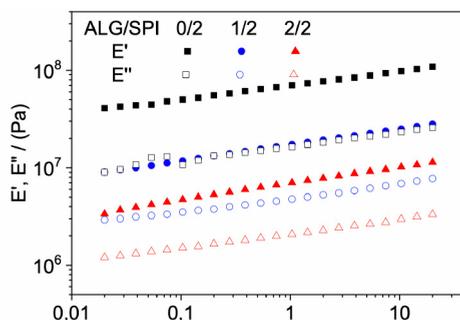
### Mezclado e inyección

En la etapa de mezclado no se observó ningún aumento en torque ni temperatura en el interior de la cavidad mezcladora, por tanto, se deduce que las proteínas en el interior de la mezcladora no han sufrido un importante entrecruzamiento que dificultaría el hinchamiento de la matriz.

Las tres mezclas obtenidas fueron perfectamente inyectables y como condiciones de inyección se utilizaron: temperatura de cilindro de 50 °C, temperatura de molde de 70 °C, una presión y tiempo de inyección de 500 bar y 220 s, respectivamente.

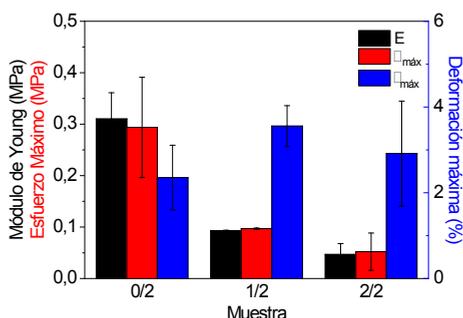
### *Caracterización reológica y mecánica de las probetas ALG/SPI/GL*

En la Figura 1 podemos observar como para todas las muestras se obtuvieron valores de  $E'$  superiores a los de  $E''$ , mostrando espectros paralelos, lo que indica una  $\delta$  serán inferiores a la unidad y permanecerán prácticamente constantes en el intervalo de frecuencias estudiado, mostrando, por tanto, un comportamiento más similar a un sólido que un líquido. Como puede apreciarse se obtienen módulos viscoelásticos menores conforme se aumenta la cantidad de ALG en la muestra, lo que indica que la consistencia de las mismas disminuye conforme aumenta la proporción de alginato presente en los bioplásticos.



**Figura 1.** Barridos de deformación de las probetas con distinto ratio ALG/SPI.

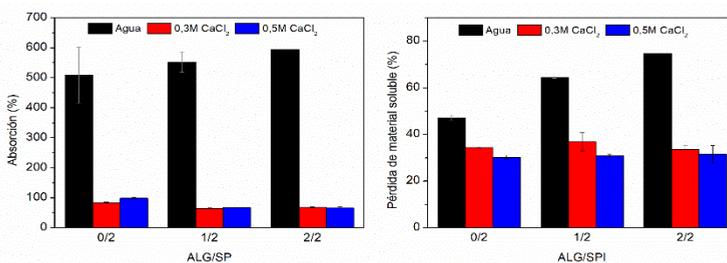
Ensayos de tracción a rotura se llevaron a cabo en las probetas, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 2. Se puede observar cómo una disminución en el módulo de Young y en el esfuerzo máximo cuando se incrementa la composición de ALG en la probeta, mientras que no se observó una evolución clara en la deformación máxima.



**Figura 2.** Parámetros obtenidos a partir del ensayo hasta rotura para probetas con distinto ratio ALG/SPI.

### Absorción de agua y pérdida de material soluble

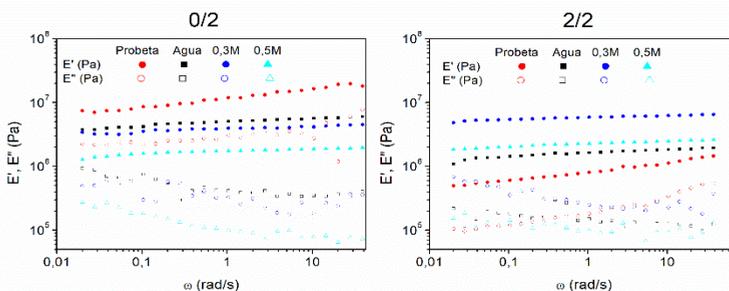
Para cuando las muestras fueron introducidas en agua, se observó un ligero aumento de su capacidad absorbente conforme aumenta el ratio ALG/SPI, mostrando valores superiores al 500 % para cualquiera de las muestras estudiadas (Figura 3). La evolución de la pérdida de material soluble si es más clara y aumenta con la cantidad de alginato contenida en la muestra, ya que para las muestras que contienen el alginato, además de perderse la glicerina contenida en la muestra, se pierde gran cantidad del alginato que poseen. Para evitar esta pérdida de ALG durante el ensayo de absorción, se utilizó como líquido de inmersión una disolución de  $\text{CaCl}_2$  en dos distintas concentraciones 0,3 y 0,5 M.



**Figura 3.** Resultados de absorción de agua (A) y pérdida de material soluble (B) para muestras con distinto ratio ALG/SPI y sumergidas en distintas soluciones de  $\text{CaCl}_2$ .

### Caracterización reológica de las matrices liofilizadas

Las matrices tratadas con el proceso deshidrotérmico fueron sometidas a ensayos de compresión dinámicos de baja amplitud, ilustrados en la Figura 4. Se observó de nuevo como los valores de  $E'$  son superiores a los de  $E''$  para cada muestra.



**Figura 4.** Barridos de frecuencia realizado a matrices provenientes de bioplásticos con distinto ALG/SPI y sumergidas en Agua o disolución de  $\text{CaCl}_2$  (0,3 M y 0,5 M).

Los módulos viscoelásticos de las matrices fueron notablemente menores a los obtenidos del bioplástico inicial cuando las muestras no contenían alginato, independientemente de cual sea el líquido de inmersión (Figura 4A); mientras que

para las muestras cuyo ratio ALG/SPI fue 2/2 (Figura 4B) los resultados obtenidos fueron diferentes, mostrando que todas las matrices obtenidas tuvieron módulos elásticos mayores, acompañado de un mayor comportamiento tipo gel que el del bioplástico del que provenían. Los módulos viscoelásticos de estas últimas aumentaron ostensiblemente cuando fueron sumergidas en una disolución de  $\text{CaCl}_2$ , estos resultados respaldan la hipótesis de que el alginato permanece fijado dentro de la estructura, formando un complejo con los iones  $\text{Ca}^{+2}$ , conformando una matriz más estructurada que aquella formada exclusivamente por SPI. Además, los resultados obtenidos ponen de manifiesto dos efectos contrapuestos: la sustitución de SPI por ALG debilita la estructura en ausencia de iones  $\text{Ca}^{+2}$ . La formación de puentes de calcio produce un reforzamiento estructural que conduce a tener matrices más consistentes, para los sistemas con mayor proporción de ALG. Debe señalarse que la matriz es menos porosa cuando existe  $\text{CaCl}_2$  en el medio, por ello aumenta sus propiedades mecánicas, a la vez que dificultan su hinchamiento con la consiguiente absorción de agua.

## CONCLUSIONES

Las propiedades mecánicas de los bioplásticos ALG/SPI/GL tienen una clara dependencia de la proporción alginato/proteína, de modo que se produce una disminución del módulo de Young y del esfuerzo máximo necesario antes de la rotura cuando la proporción de alginato aumenta en las muestras. Además, se produce una disminución de los módulos viscoelástico al aumentar también la cantidad de alginato en las probetas.

La capacidad de absorción de agua para estos bioplásticos se sitúa alrededor del 500 % y es independiente de la relación alginato/proteína, aunque la pérdida de material soluble aumenta sustancialmente al incrementarse el alginato en la muestra. Al introducir los bioplásticos en una disolución de  $\text{CaCl}_2$  la capacidad de absorción disminuye considerablemente, al igual que la pérdida de material soluble, debido a que el  $\text{CaCl}_2$  retiene el alginato en la muestra

En lo que respecta a las matrices, cuando estas son sumergidas en agua, sus módulos viscoelásticos disminuyen con el contenido en la muestra, mientras que aquellas que fueron obtenidas a partir de las probetas de bioplástico sumergidas en un fluido de inmersión que contiene  $\text{CaCl}_2$ , muestran un incremento en los módulos viscoelásticos cuando la cantidad de alginato utilizado para la obtención de las mismas fue mayor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen el apoyo financiero recibido para la realización de este estudio por parte del Ministerio de Economía y Competitividad y el programa FEDER (Para el proyecto con Referencia: CTQ2015-71164-P).

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Vacanti, J. P. (2014). Preface. *Principles of Tissue Engineering*, p. xxix.
- [2] Volić, *et al.* (2018). Alginate/soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery. *Carbohydrate Polymers*, 200, pp. 15–24.
- [3] Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F. y Guerrero, A. (2016). Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: Soybean versus egg albumen. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(6).