

INFLUENCIA DE GELATINA SOBRE LAS PROPIEDADES DE MEMBRANAS DE NANOFIBRAS OBTENIDAS DE POLÍMEROS SINTÉTICOS

Perez-Puyana, Víctor Manuel^{1*}; Jiménez-Rosado, Mercedes²; Alonso-González, María³; Romero, Alberto³; Guerrero, Antonio²

¹ *Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes (TEP-229). Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química. Universidad de Sevilla.*

² *Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes (TEP-229). Departamento de Ingeniería Química. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.*

³ *Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes (TEP-229). Departamento de Ingeniería Química. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.*

*E-mail: vperez11@us.es

RESUMEN

La técnica de electrohilado es una técnica emergente y relativamente fácil para preparar matrices tridimensionales de micro y nanofibras. Para lograrlo, se utilizan disoluciones acuosas de polímeros de polímeros sintéticos o naturales. De forma general, se tiende a utilizar polímeros sintéticos pues permite un mayor control de las propiedades de las fibras obtenidas, así como una mejor procesabilidad. Sin embargo, estos polímeros sintéticos se suelen combinar con polímeros naturales para mejorar el carácter hidrófilo de las membranas o asemejar las propiedades mecánicas a las óptimas para su posterior respuesta biológica. Por tanto, este estudio evalúa la influencia de un biopolímero sobre las propiedades de andamios de nanofibras obtenidos a partir de polímeros sintéticos. Como polímero natural se ha seleccionado una proteína como la gelatina debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad; mientras que como polímeros sintéticos se han utilizado policaprolactona (PCL) y polivinil alcohol (PVA). Para ello, se llevó a cabo un proceso de electrohilado estándar (15 kV, 0.4 ml/h y 10 cm de distancia de trabajo) para obtener las membranas de nanofibras. La influencia de la adición de gelatina se observó analizando el ángulo de contacto del agua y las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido.

PALABRAS CLAVE

Gelatina, PVA, PCL, Electrohilado, Nanofibras.

ABSTRACT

The electrospinning technique is an emerging and relatively easy technique for preparing three-dimensional membranes with micro and nanofibers. To achieve this, aqueous solutions of synthetic or natural polymers are used. In general, synthetic polymers tend to be used, since it allows greater control of the properties of the fibers obtained, as well as a better processability. However, these synthetic polymers are usually combined with natural polymers to improve the hydrophilic character of the membranes or to resemble the optimum mechanical properties for their subsequent biological treatment. Therefore, this study evaluates the influence of a biopolymer on the properties of nanofiber scaffolds obtained from synthetic polymers. As a natural polymer, a protein such as gelatin has been selected because of its biocompatibility and biodegradability; while polycaprolactone (PCL) and polyvinyl alcohol (PVA) have been used as synthetic polymers. Thus, a standard electrospinning process (15 kV, 0.4 mL/h and 10 cm of working distance) was carried out to obtain nanofibrous membranes. The influence of the addition of gelatin was observed by analyzing the water contact angle and the images obtained by scanning electron microscopy.

KEYWORDS

Gelatin, PVA, PCL, Electrospinning, Nanofibers.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El proceso de electrohilado es relativamente innovador que permite la producción continua de membranas de fibras en un rango de diámetros entre 10 nm y unos pocos micrómetros que se forman en la superficie de un colector [1]. Estas membranas presentan un área de superficie muy alta, lo que hace que estas estructuras sean candidatas adecuadas para biomedicina, en la que se pueden usar como andamios para Ingeniería de Tejidos [2]. Más específicamente, los andamios elaborados a partir de polímeros proporcionan un soporte tridimensional adecuado para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, que es esencial para guiar la formación de tejido [3].

En dicho proceso, existen varios parámetros que están íntimamente relacionados con las propiedades y características de las fibras obtenidas mediante electrohilado, por lo que su control durante la ejecución del proceso es indispensable ya que juegan un papel importante en la formación y estructura de las fibras [4]. Entre ellos destaca el voltaje, aunque genera controversia entre los autores pues algunos afirman que la aplicación de altos voltajes hace que se transporte más fluido en el chorro, lo que da como resultado fibras con diámetros más altos [5], aunque otros afirman que un aumento en el voltaje disminuye el diámetro de las nanofibras [6].

En definitiva, el objetivo principal es el estudio de la influencia de gelatina en las propiedades químicas y estructurales óptimas de andamios elaborados a partir de polímeros sintéticos como PVA y PCL. Para ello, se ha procedido a caracterizar las membranas obtenidas mediante el análisis del ángulo de contacto, así como del tamaño media de sus fibras y su porosidad.

METODOLOGÍA

Proceso de Electrohilado

El proceso de electrohilado se ha llevado a cabo con disoluciones de alcohol polivinílico (PVA) o policaprolactona (PCL) y gelatina (GE), utilizando diferentes ratios para evaluar la influencia de la gelatina en ambos polímeros sintéticos. Tanto el PVA como el PCL han sido suministrados por Sigma-Aldrich (Alemania), mientras que la gelatina ha sido adquirida gracias a la empresa Henan Boom Gelatin Co. (China).

Tabla 1. Sistemas estudiados con mezclas de PVA y PCL con gelatina.

Sistemas con PVA		Sistemas con PCL	
PVA/GE 10/0	PVA (100%)	PCL/GE 10/0	PCL (100%)

Sistemas con PVA		Sistemas con PCL	
PVA/GE 7.5/2.5	PVA (75%) + Gelatina (25%)	PCL/GE 7.5/2.5	PCL (75%) + Gelatina (25%)
PVA/GE 5.0/5.0	PVA (50%) + Gelatina (50%)	PCL/GE 5.0/5.0	PCL (50%) + Gelatina (50%)
PVA/GE 2.5/7.5	PVA (25%) + Gelatina (75%)	PCL/GE 2.5/7.5	PCL (25%) + Gelatina (75%)

Tras la preparación de las disoluciones bajo agitación constante durante toda la noche (para fomentar una buena homogeneización del sistema), se llevó a cabo el proceso de electrohilado. Dicho proceso se llevó a cabo colocando el dispositivo de electrohilado en posición vertical, viéndose favorecido el proceso por la gravedad. La aguja conectada a la jeringa es de calibre 21G (diámetro interno de 0.8 mm), mientras que el caudal impuesto es de 0.4 mL/h. Tanto la temperatura como la humedad del sistema se mantuvieron en 25 °C y 40%, respectivamente.

Caracterización de los sistemas

- **Ángulo de Contacto:** La hidrofobicidad de los andamios se ha evaluado mediante mediciones del ángulo de contacto con el agua (WCA) utilizando el método de gota sésil (gotitas con un volumen aproximado de 5 µL). Se midieron los valores de WCA de los lados derecho e izquierdo de las gotas de agua desionizada y se calculó el valor promedio. El equipo utilizado fue un analizador de forma de gota (Krüss).
- **Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):** El análisis microscópico de los andamios se ha evaluado con un XL 30 (Philips XL Series) a un voltaje de aceleración de 15 kV. Las muestras se cubrieron con una película de Au en un *sputter coater* de alta resolución. Para determinar tanto la porosidad como el tamaño de las fibras se ha utilizado un software de procesamiento digital (ImageJ).

Análisis estadístico

Se ha realizado un triplicado para cada ensayo. Los análisis estadísticos se realizaron con análisis de varianza ($p < 0.05$) utilizando PASW Statistics para Windows (versión 18: SPSS, Chicago, IL). Además, se calcularon desviaciones estándar para los parámetros seleccionados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para seguir el efecto de la gelatina en los andamios producidos, se realizaron mediciones del ángulo de contacto a los sistemas obtenidos con PVA y PCL. La Figura 1 muestra el ángulo de contacto de los diferentes sistemas estudiados con diferentes proporciones de PVA y PCL con gelatina. Se puede destacar cómo el aumento en el contenido de gelatina produce andamios con un menor ángulo de contacto con el agua, siendo más pronunciado este efecto para el caso de PCL, debido a su mayor hidrofobicidad e insolubilidad en agua. Es interesante señalar además cómo una pequeña cantidad de gelatina (2.5%) produce una marcada disminución del ángulo de contacto de los andamios resultantes, obteniendo estructuras más hidrófilas.

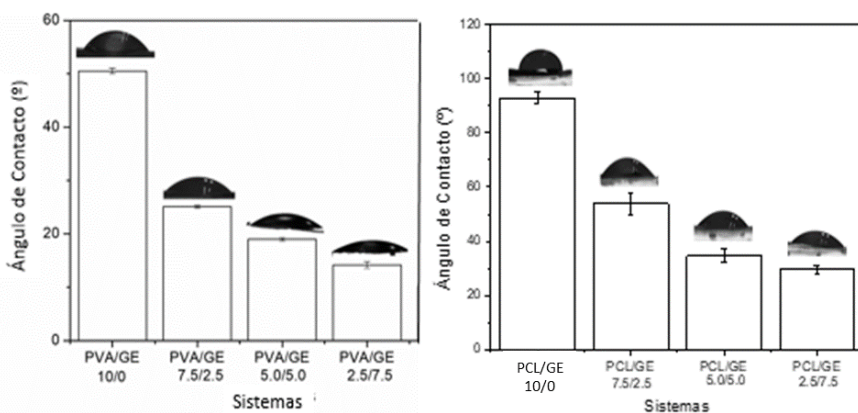


Figura 1. Ángulo de contacto de los sistemas mixtos de PVA y PCL con gelatina. (Fuente: Perez-Puyana [7]).

Además de las medidas de ángulo de contacto, se tomaron imágenes de SEM para comprobar la morfología de los sistemas estudiados. La evolución de los sistemas de PVA con la adición de gelatina puede comprobarse en la Figura 2. Cabe destacar que una disminución en la concentración de PVA se traduce en una evolución de una matriz homogénea a una matriz formada por micropartículas esféricas, conectadas entre sí a través de nanofibras.

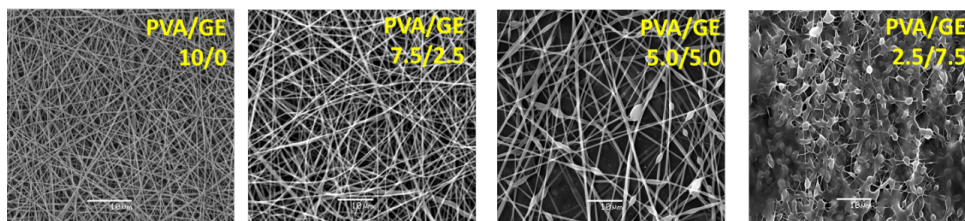


Figura 2. Imágenes de SEM de los sistemas elaborados con PVA y gelatina. (Fuente: Perez-Puyana [7]).

Por otro lado, la adición de gelatina provoca un descenso del tamaño de las fibras que, por ende, produce un aumento de la porosidad del sistema (Tabla 2).

Tabla 2. Tamaños de fibra y porosidad de andamios obtenidos con PVA y gelatina. Valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Sistemas con PVA	Tamaño de fibras (nm)	Porosidad (%)
PVA (100%)	462 ^a	60 ^A
PVA (75%) + Gelatina (25%)	414 ^{ab}	68 ^{AB}
PVA (50%) + Gelatina (50%)	303 ^b	71 ^B
PVA (25%) + Gelatina (75%)	*	*

Por otra parte, aquellos sistemas elaborados con mezclas de PCL y gelatina pueden verse en la Figura 3. Puede comprobarse como la adición de una pequeña cantidad de gelatina provoca una mejora significativa de las fibras formadas durante el proceso de electrohilado ya que el 100% de PCL da lugar a una membrana basada en esferoides.

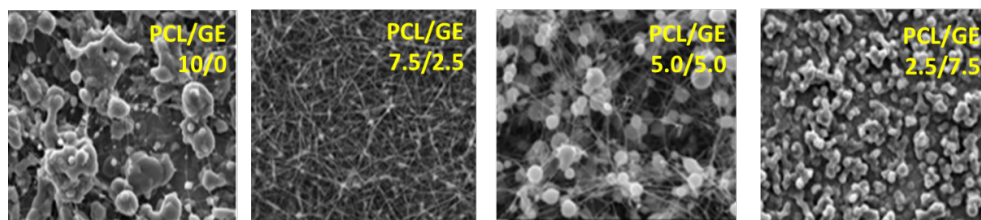


Figura 3. Imágenes de SEM de los sistemas elaborados con PCL y gelatina.

Además, la adición de gelatina provoca un ligero descenso de la porosidad de los sistemas, mientras que el tamaño de sus fibras, no correspondientes a los esferoides, no sufre cambios significativos (Tabla 3). Cabe destacar que los sistemas con mayor concentración de gelatina no pudieron someterse al proceso de electrohilado o dieron lugar a membranas no constituidas por fibras (sistema PCL 2.5% y GE 7.5%).

Tabla 3. Tamaños de fibra y porosidad de andamios obtenidos con PCL y gelatina. Valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Sistemas con PCL	Tamaño de fibras (nm)	Porosidad (%)
PCL (100%)	186 ^a	62 ^A
PCL (75%) + Gelatina (25%)	147 ^{ab}	59 ^{AB}
PCL (50%) + Gelatina (50%)	203 ^b	57 ^B
PCL (25%) + Gelatina (75%)	*	*

CONCLUSIONES

Como conclusión general, andamios de nanofibras con diferentes concentraciones de PVA y PCL con gelatina se han obtenido mediante electrohilado, lo que presenta un gran potencial para sus aplicaciones en Ingeniería de Tejidos.

La adición de gelatina provoca un descenso en el ángulo de contacto de los andamios, lo que se traduce en un aumento de la hidrofilia de los sistemas tanto para aquellos obtenidos a partir de PVA como de PCL, siendo este efecto más pronunciado para este último.

La sustitución del polímero sintético (ya sea PVA o PCL) por gelatina produce una evolución en la morfología de los andamios: de un sistema compuesto por nanofibras cilíndricas a otro compuesto de esferoides interconectados. En cualquier caso, parece que pequeñas adiciones de gelatina conduce a fibras con tamaños de fibras más pequeños. Además, la formación de esferoides aumenta con la concentración de proteínas.

Por último, respecto a la porosidad, tienen lugar dos efectos opuestos. Por un lado, la adición de gelatina provoca un aumento de la porosidad de los sistemas elaborados a partir de PVA; mientras que para los sistemas obtenidos con PCL, no existen diferencias significativas en la porosidad.

En cualquier caso, la adición de gelatina a polímeros sintéticos (PVA o PCL) puede ser positiva para diseñar membranas de nanofibras con determinada microestructura controladas composicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto recibido por parte del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Ref: CTQ2015-71164P, MINECO/FEDER, UE). Los autores también agradecen a la Universidad de Sevilla y al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por las becas predoctorales de Víctor M. Pérez Puyana (VPPI-US) y de Mercedes Jiménez Rosado (Ref. FPU17/01718).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Mogoşanu, G.D., Grumezescu, A.M., Mogoantă, L., Bejenaru, L.E., y Bejenaru, C. (2016). *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*.
- [2] Gautam, S., Dinda, A.K., y Mishra, N.C. (2013). Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering C*, 33(3), p. 1228.

- [3] de la Portilla, F., Pereira, S., Molero, M., De Marco, F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A., y Romero, A. (2016). Microstructural, mechanical, and histological evaluation of modified alginate-based scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 104(12), p. 3107.
- [4] Jacobs, V., Anandjiwala, R.D., y Maaza, M. (2010). The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 115(5), p. 3130.
- [5] Ramakrishna, S., Huang, Z.M., y Kotaki, M. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composite Science Technology*, 63(15), p. 2223.
- [6] Correia, D.M. y Sencadas, V. (2012). Determination of the parameters acting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydrate Polymers*, 87, p. 1295.
- [7] Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., y Guerrero, A. (2018). Development of PVA/gelatin nanofibrous scaffolds for Tissue Engineering via electrospinning. *Materials Research Express*, 5, p. 03401.