

Desarrollo de reticulantes basados en poliuretanos con grupos ionógenos y su aplicación en el diseño de hidrogeles para curación de heridas crónicas

^aMaría Ileana León-Campos*, ^aJesús Alejandro Claudio-Rizo, ^aLuis Enrique Cobos-Puc, ^aDenis Aidée Cabrera-Munguía

^aMateriales Avanzados, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Ing. J. Cárdenas S/N, Saltillo Coahuila, 25280, MÉXICO. ileanaleon@uadec.edu.mx.

Resumen: Una de las principales problemáticas en la curación de una herida crónica tisular, es la contaminación externa. Los hidrogeles son materiales coadyuvantes en el proceso de curación, y requieren propiedades específicas para aplicación exitosa, como ser biocompatibles, no citotóxicos y con la capacidad de inhibir bacterias. Estas propiedades pueden ser propiciadas en el hidrogel con la estructura química del agente reticulante. Este trabajo describe la síntesis de 6 tipos poliuretanos solubles en agua que puedan ser usados como agentes reticulantes, estos se sintetizaron a partir del glicerol etoxilado (1000 g mol⁻¹), diisocianato de hexametileno (HDI) y/o diisocianato de isoforona (IPDI), y los grupos ionógenos en las estructuras de los poliuretanos fueron constituidos por los aminoácidos: L-tirosina (L-T), L-histidina (L-H) y ácido L-glutámico (L-Glut); además, para la síntesis de hidrogeles se utilizó una concentración de 15 y 30 %m del reticulante. La síntesis se llevó a cabo mediante entrecruzamiento químico por formación de enlaces urea/amida. Además, estos hidrogeles muestran una gran capacidad de absorber agua, lo cual fue demostrado usando mediante el experimento de hinchamiento máximo, resultado el hidrogel de P(HDI-T 30) el de mayor hinchamiento el cual presentó un valor de 6105 ± 200 %. La mayoría de las matrices presentan una morfología fibrilar típica de la estructura secundaria del colágeno tipo I. Además, los hidrogeles de este estudio no presentan citotoxicidad en fibroblastos y monocitos, esto se confirmó mediante la prueba de viabilidad celular, beneficiando su proliferación celular.

Introducción (Arial 10 negritas).

Una de las principales problemáticas en la curación de una herida crónica tisular, es la contaminación externa. Los hidrogeles son materiales coadyuvantes en el proceso de curación, y requieren propiedades específicas para aplicación exitosa, como ser biocompatibles, no citotóxicos y con la capacidad de inhibir bacterias. Estas propiedades pueden ser propiciadas en el hidrogel con la estructura química del agente reticulante (Mendoza-Novelo *et al.*, 2014). Este trabajo tiene como objetivo sintetizar novedosos reticulantes basados en poliuretanos con grupos ionógenos a partir de los aminoácidos L-tirosina, L-histidina y L-ácido glutámico, los cuales aportarán propiedades de afinidad tisular,

biodegradabilidad y cicatrización de heridas de los hidrogeles de colágeno.

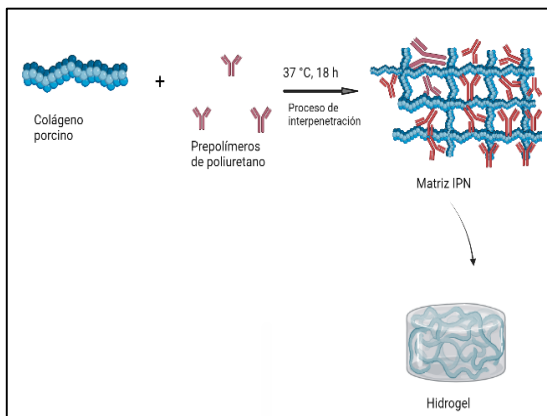
Parte experimental.

Materiales.

Síntesis de los hidrogeles IPN de colágeno-poliuretano con grupos ionógenos

En cada pozo de la placa de cultivo se mezcló 1 mL de solución de colágeno porcino (6 mg mL⁻¹) con 30 μ L del entrecruzante a base de PU, el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 7 con PBS 10 X y la gelificación se llevó a cabo a 37 °C por 18 h (véase esquema 1).

(Caldera-Villalobos *et al.*, 2022) La masa del colágeno siempre se mantuvo como componente mayoritario, con la finalidad de que los hidrogeles conserven una estructura fibrilar, la cual está asociada con la alta biocompatibilidad de este biopolímero



Esquema 1. Síntesis de hidrogeles de colágeno y prepolímeros de poliuretano.

Viabilidad celular

Se evaluó la actividad metabólica de los monocitos humanos o fibroblastos dérmicos en cada reticulante. La viabilidad celular se determinó por la capacidad de las células con metabolismo activo para reducir las sales de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán. Para, esto se sembraron 50 μ L de células en placas de cultivo de 96 pozos y 100 μ L de lixiviados en cada pocillo y se incubaron en una atmosfera humidificada de 95 % de aire y 5 % de CO₂ a 37 °C utilizando medio de cultivo DMEM suplementado con SFB (10 % v/v). Este experimento se realizó durante 24 y 48 h respectivamente (Mosmann, 1983).

Ensayo de proliferación con microscopía de fluorescencia

Para evaluar la citotoxicidad y la viabilidad de fibroblastos porcinos sobre los hidrogeles, las células en contacto con los hidrogeles se tiñeron con calceína-AM componente presente en el kit de Live&Dead. A continuación, se tomaron hidrogeles con pinzas estériles, fueron colocados cuidadosamente en cubreobjetos. Las células se observaron en un (VelabTm) microscopio de epifluorescencia (la calceína se excita con un haz azul de 495 nm (Hassan *et al.*, 2013)

Resultados y discusión.

En la figura 1 se observa en la gráfica que el hidrogel de P(HDI-T 30) presentó el máximo hinchamiento obteniéndose un valor de 6105 \pm 200 %. Esto está relacionado con la composición química del diisocianato empleado, así como con las características de la L-tirosina. Lo cual resulta benéfico para la aplicación de heridas crónicas, dado que tiene gran capacidad para retener agua. De acuerdo con los resultados de capacidad máxima de absorción de agua, es observado que la naturaleza química del diisocianato de partida del PU ionógeno no afecta significativamente en esta propiedad fundamental de un hidrogel; ya que las capacidades de hinchamiento muestran valores mayores al 3500 %, indicando que todas las formulaciones muestran un comportamiento de superhinchamiento (Viswanata *et al.*, 2018)

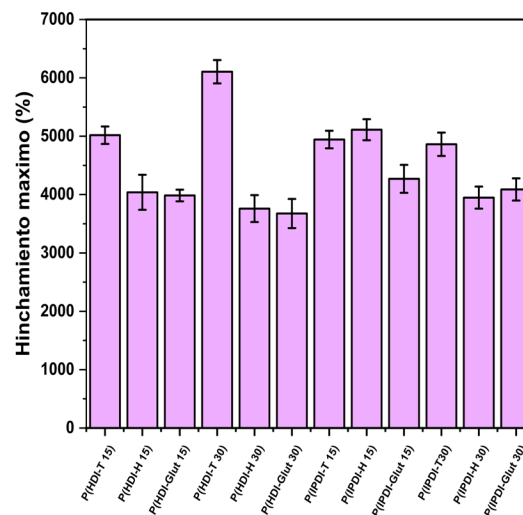


Figura 1. Hinchamiento máximo de los hidrogeles

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la figura 2 se presentan las micrografías de los hidrogeles sintetizados. El hidrogel de P(HDI-T 15) (a) y P(HDI-T 30) (d) presentan una estructura plana con rugosidad debido a la composición química del entrecruzante,

basado en segmentos flexibles con sitios rígidos promovidos por el ciclo fenólico del aminoácido, generando una superficie con baja porosidad y mayor orden semi-cristalino, tal como fue detectado por WAXS. En P(HDI-H 15) (b) y P(HDI-H 30) (e) presentan una morfología caracterizada por un relieve fibrilar, con porosidad irregular interconectada, indicando que la generación de puentes de hidrogeno por los nitrógenos del anillo de imidazol no alteran la estructura fibrilar típica del colágeno, sin embargo, se promueve mayor desorden molecular no mejorando significativamente la reticulación y mejora mecánica. Para P(HDI-Glut) 15) (c) y P(HDI-Glut 30) (f) se observa un relieve rugoso caracterizado por la presencia de fibras de colágeno interconectadas, con porosidad irregular; al incrementar el contenido de este reticulante en esta matriz IPN se aprecia mayor diámetro de fibra lo cual mejora la resistencia a la deformación mecánica de este material, lo cual va acorde a lo estudiado por reología oscilatoria (Xiao *et al.*, 2021).

Posteriormente para las matrices IPN basadas en reticulantes PU que contienen IPDI se aprecia que P(IPDI-T 15) (g) y P(IPDI-T 30) (j) se observa un relieve con rugosidad caracterizado por fibras interconectadas, al incrementar el contenido de reticulante se aprecian la generación de estructuras dendrimeras, esto se debe a la interacción de las regiones hidrofóbicas propiciadas por el anillo aromático de la T; al comparar con la estructura química del diisocianato, se aprecia que al usar IPDI no se promueve una pérdida de la naturaleza fibrilar del colágeno como en el caso del reticulante P(HDI-T).

En P(IPDI-H 15) (h) y P(IPDI-H 30) (k) presentan una morfología con relieve fibrilar y menor aparición de estructuras dendrimeras al incrementar el contenido de reticulante, indicando un sistema más amorfo debido al contenido de estructuras cicloalifáticas del IPDI que no promueve la reticulación por generación de enlace de hidrogeno por los nitrógenos del anillo de imidazol (Xiao, y otros, Chiral Nematic Cellulose Nanocrystal Films Cooperated with Amino Acids for Tunable Optical Properties, 2021). Por último en P(IPDI-Glut 15) (i) y P(IPDI-Glut 30) (l) se observa un estructura plana con relieve rugoso-fibrilar, al incrementar el contenido de este reticulante la superficie se torna más lisa

y sin agregados dendrimeros; en el hidrogel con 15 %m de dicho reticulante se percibe mayor diámetro de fibra lo cual es asociado con el incremento en la resistencia a la deformación mecánica tal como fue determinado en el estudio del G' de las matrices IPN bajo estudio

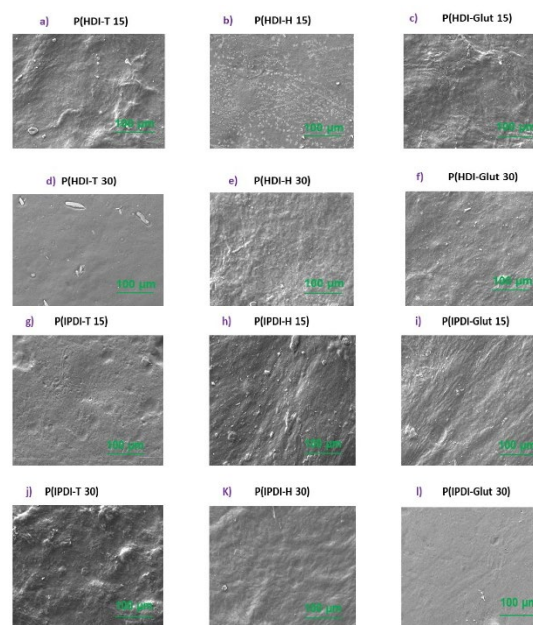


Figura 2. Micrografía SEM de los hidrogeles

Viabilidad celular de monocitos

En la figura 3 los monocitos presentan un metabolismo más activo sobre los poliuretanos basados en HDI. Pasadas las 24 h los monocitos sufrieron un proceso de adaptación, sin embargo, después de las 48 h la viabilidad aumentó en todos los hidrogeles con respecto al control, lo que indica que la composición química de las matrices representa un carácter biocompatible con estas células del sistema inmunológico. El hidrogel de P(HDI-T 30) en las 48 h presenta un 205 % siendo el que obtuvo la mayor viabilidad y el hidrogel que presentó la menor actividad metabólica fue el P(IPDI-T 15) con un porcentaje del 110 % a las 48 h. Sin embargo, no hay evidencia de citotoxicidad ya que se obtuvieron valores mayores al 60 % de actividad metabólica de monocitos (ISO 10993). No se aprecia una relación directa de la estructura química del aminoácido del reticulante en la estimulación de la actividad metabólica de los monocitos (Noorisa *et al.*, 2016).

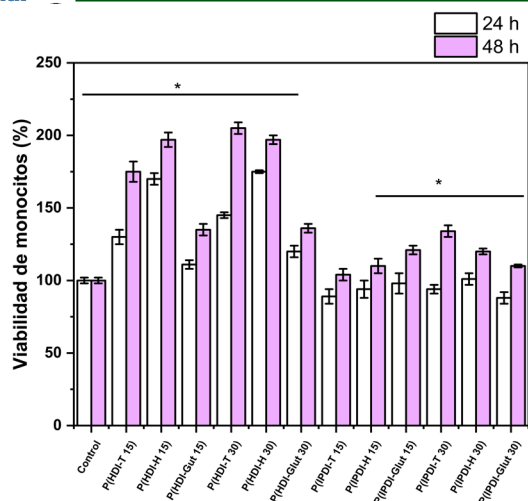


Figura 3. Viabilidad de monocitos

Viabilidad de fibroblastos

En la figura 4 se observa el porcentaje de viabilidad celular relacionado con la actividad metabólica de células de fibroblastos en los hidrogeles después de las 48 h para los hidrogeles de P(HDI-H 30) fue de 220 % siendo los que alcanzaron el mayor porcentaje con respecto al control. La viabilidad celular aumento significativamente en todos los hidrogeles después de las 48 h de incubación. En el caso de los hidrogeles de P(IPDI-H 15) fueron los que presentaron los menores porcentajes de viabilidad celular en las 24 y 48 h del ensayo.

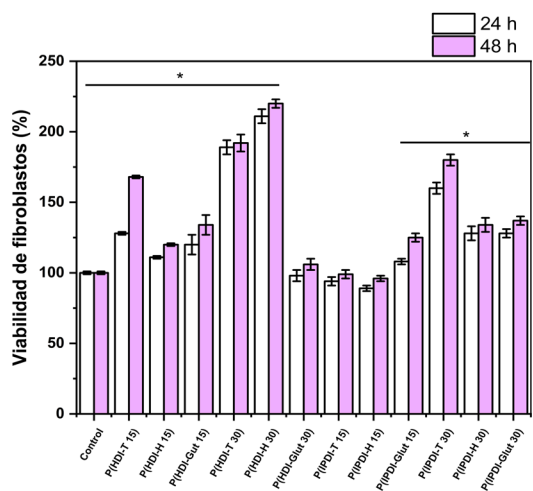


Figura 5. Viabilidad de los fibroblastos

Proliferación de monocitos

Se llevó a cabo un ensayo de proliferación de monocitos utilizando un kit fluorescente live&dead; las micrografías se muestran en la figura 6. Todas las micrografías muestran colonias de monocitos que crecen y proliferan en presencia de estos nuevos hidrogeles; debido a la producción de calceína altamente fluorescente debido a la alta actividad de esterasas en monocitos vivos; sin embargo, se aprecia un mayor contenido de poblaciones celulares (regiones verdes) en los hidrogeles de P(HDI-H 15), P(HDI-Glut 15), P(HDI-T 30), y en P(IPDI-T 15) esto está de acuerdo con lo evaluado en el ensayo de citotoxicidad con MTT. Demostrando que las superficies no son citotóxicas y que permiten la replicación de monocitos (DeBerardinis *et al.*, 2018).

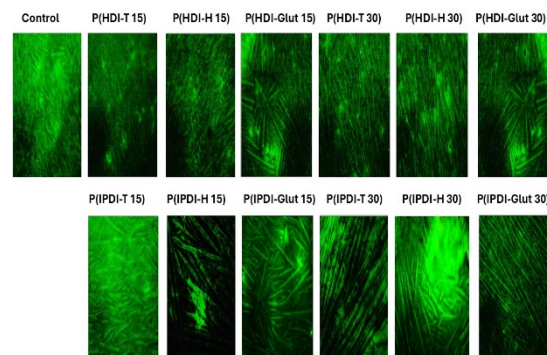


Figura 6. Imágenes de microscopia fluorescente de monocitos

Proliferación de fibroblastos

Todas las imágenes muestran densas y grandes poblaciones (regiones rojas) de fibroblastos en contacto con las matrices, demostrando una gran proliferación al igual que en el control, lo que confirma que los fibroblastos proliferan en este tipo de matrices con composición química novedosa, y que podrían aplicarse como apósitos para la cicatrización de heridas. Los hidrogeles con reticulantes basados tanto en tirosina como glutamato, independientemente de la estructura química del disocianato, promueven la presencia de poblaciones más densas de fibroblastos proliferando; ya que se aprecian mayores contrastes de zonas rojas fluorescentes

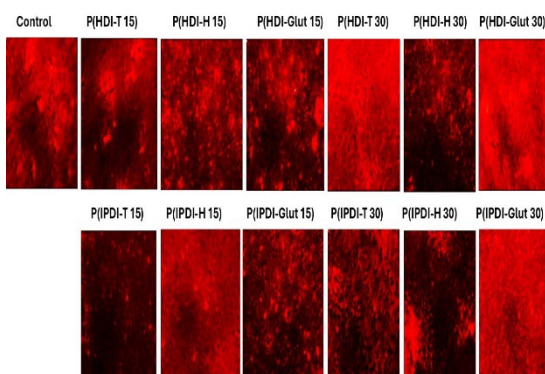


Figura 7. Imágenes de microscopía fluorescente de fibroblastos.

Conclusiones.

Se lograron sintetizar de forma exitosa los hidrogeles por medio de interpenetración polimérica usando concentraciones de 15 y 30 % m del agente de reticulación.

Además, estos hidrogeles muestran una gran capacidad de absorber agua, lo cual fue demostrado usando mediante el experimento de hinchamiento máximo, resultado el hidrogel de P(HDI-T 30) el de mayor hinchamiento el cual presentó un valor de 6105 ± 200 %.

En el ensayo de actividad metabólica con monocitos el hidrogel de P(HDI-T 30) en las 48 h presenta un 205 % siendo el que obtuvo la mayor viabilidad y el hidrogel que presentó la menor actividad metabólica fue el P(IPDI-T 15) con un porcentaje del 110 % a las 48 h.

En los fibroblastos la actividad metabólica después de las 48 h para los hidrogeles de P(HDI-H 30) fue de 220 % siendo los que alcanzaron el mayor porcentaje con respecto al control. No se presentó citotoxicidad en las formulaciones.

En el ensayo de proliferación celular, en células de monocitos se aprecia un mayor contenido de poblaciones celulares (regiones verdes) en los hidrogeles de P(HDI-H 15), P(HDI-Glut 15), P(HDI-T 30), y en P(IPDI-T 15) esto está de acuerdo con lo evaluado en el ensayo de citotoxicidad con MTT.

En fibroblastos todas las imágenes muestran densas y grandes poblaciones (regiones rojas) de fibroblastos en contacto con las matrices, demostrando una gran proliferación al igual que en el control.

Agradecimientos.

Agradecemos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por su apoyo en los proyectos FORDECYT-PRONACES-6660 y CF-2023-G-1348.

Referencias.

- Caldera-Villalobos, M., Cabrea-Munguía, D., Becerra-Rodríguez, J., Claudio-Rizo, J. Tailoring biocompatibility of composite scaffolds of collagen/guar gum with metal-organic frameworks. *RSC Adv*, **2022** 12, 3672-3686.
- DeBerardini, R., Lum, J., Hatzivassiliou, G., Thompson, C. (2018). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. **2018**, 7(1), 11-20.
- Hassan, W., Dong, Y., Wang, W. Encapsulation and 3D culture of human adipose-derived stem cells in an in-situ crosslinked hybrid hydrogel composed of PEG-based hyperbranched copolymer and hyaluronic acid. *Stem Cell Res Ther*. **2013**, 4(2), 32.
- Mendoza-Novelo, B., Mata-Mata, J., Vega-González, A., Cauch-Rodríguez, J., Marcos-Fernández, A. Synthesis and characterization of protected oligourethanes as crosslinkers of collagen-based scaffolds. *J. Mater. Chem. B*. **2014** 2(19), 2874-2882.
- Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*. **1983**, 65(1-2), 55-53.
- Noorisa, F., Razmjou, A., Emami, N., Low, Z., Korayem, A., Kajani, A. Surface modification of polyurethane via creating a biocompatible superhydrophilic nanostructured layer: role of surface chemistry and structure. *Journal of Experimental Nanoscienc*. **2016** 11(14), 1087-1109.
- Viswanatha Reddy, G., Sivagangi Reddy, N., Nag, K. Synthesis of pH Responsive Hydrogel Matrices from Guar gum and Poly(acrylamide-co-acrylamidoglycolic acid) for Anti-Cancer Drug Delivery. *JAPS*. **2018** 8(8), 084-091.
- Xiao, X., Chen, J., Ling, Z., Guo, J., Huang, J., Ma, J., Jin, Z. Chiral Nematic Cellulose Nanocrystal Films Cooperated with Amino

AgOs for Tunable Optical Properties.
Polymers (Base). 2021 13(24), 4389.