

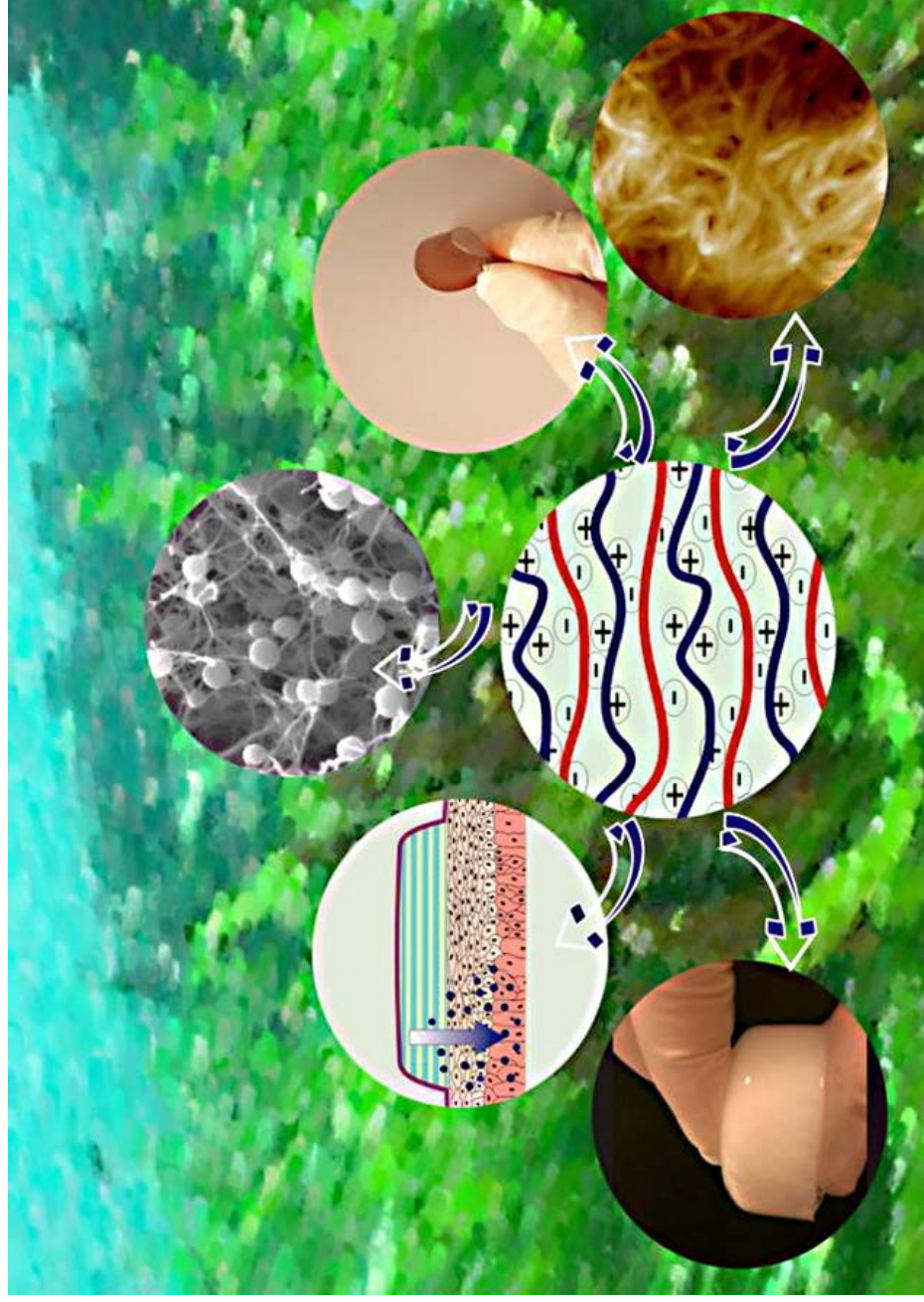
# Polielectrolitos de origen natural: nuevas rutas de procesado verde para la obtención de biomateriales

**Autoras:** Jimena Gonzalez<sup>1,2</sup>, Carmen Mijangos<sup>2</sup>, Rebeca Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP-CSIC), Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, España.

<sup>2</sup> Materiales Compuestos Termoplásticos (CoMP), INTE-MA (CONICET-UNMGP), Av. Colón 10890 (B7608FLC), Mar del Plata – Argentina.

\*rhernandez@ictp.csic.es



## Resumen

En los últimos años, la utilización de polímeros sintéticos obtenidos a partir de fuentes fósiles genera una gran controversia a nivel mundial debido a su origen no renovable y a su destino final: residuos no degradables que contaminan y se acumulan en nuestros océanos. En este contexto, la búsqueda de polímeros biodegradables de origen natural y que además permitan la obtención de materiales funcionales a través de rutas de procesado verde es cada vez más intensa. Los polímeros de origen natural son candidatos adecuados para el desarrollo de biomateriales debido a sus características intrínsecas de

biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los más utilizados son: alginato, quitosano, gelatina, pectina, entre otros. Muchos de los polímeros naturales son polielectrolitos, es decir, presentan grupos ionizables (polianiones o poliacationes) que pueden disociarse en disolventes polares como el agua quedando las cadenas cargadas y liberando los contraiones a la disolución. La mezcla de disoluciones de polianiones y poliacationes conduce directamente a la formación de complejos polielectrolitos (PECs). En este trabajo se describen las últimas tendencias en procesado de PECs a través de rutas verdes y sus posibles formas: filmes, hidrogeles y membranas teniendo en cuenta su aplicación en el área biomédica.

**Palabras clave:** hidrogeles, alginato, quitosano, complejo polielectrolito, capa a capa, ruta de procesado verde

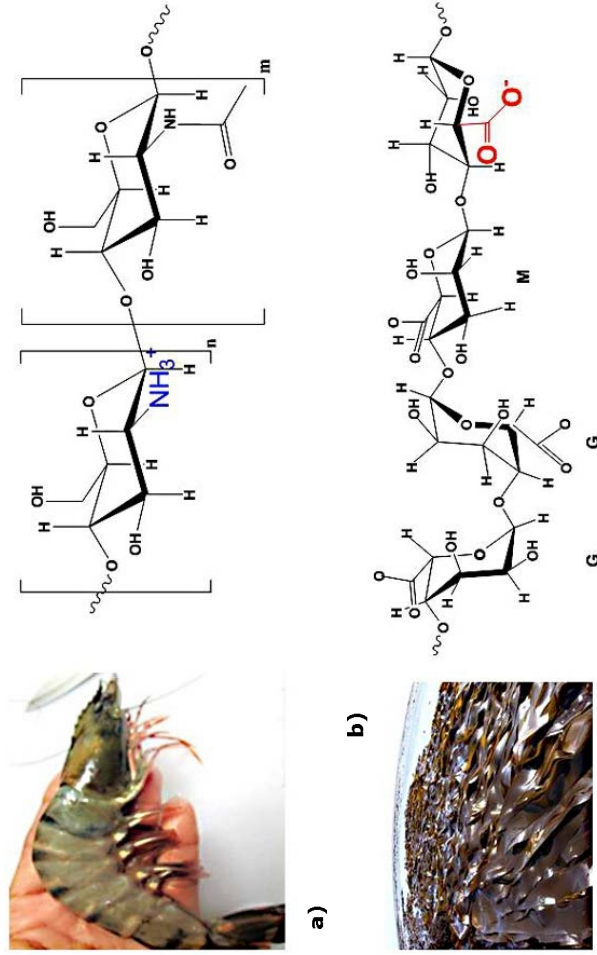
## Abstract

Over the last years, the employment of synthetic polymers obtained from fossil resources is controversial worldwide due to the non-renewable origin and to their end-of life: non-degradable residues highly pollutant and that are accumulated in our oceans. Within this context, intensive research is being carried out in order to develop biodegradable polymers from renewable resources that can be processed into functional



Índice

Noticias



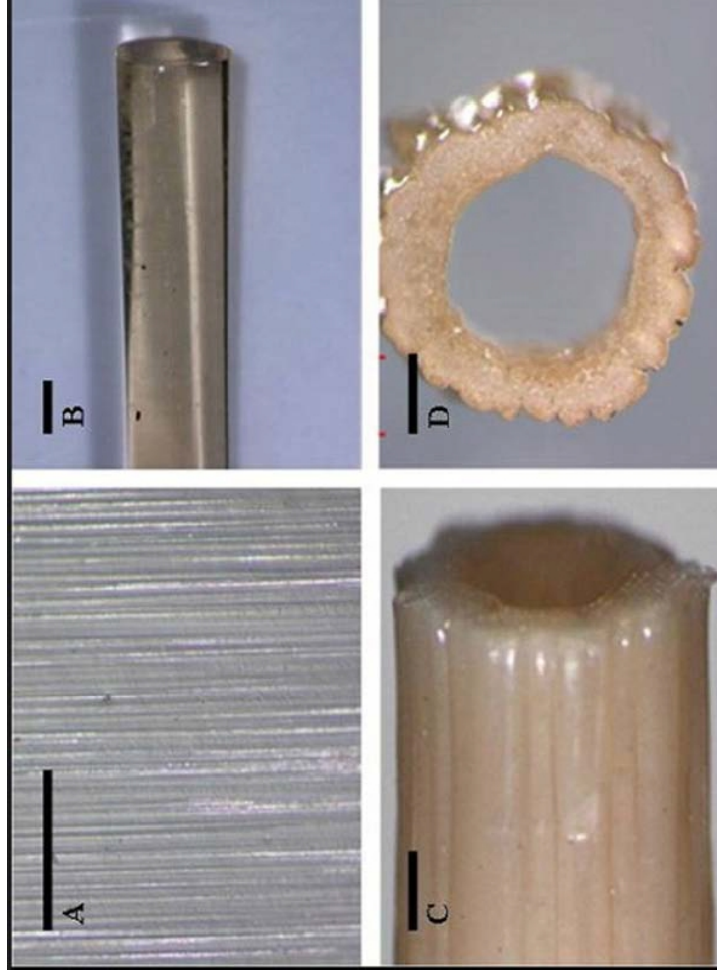
**Figura 1.** Estructura química del quitosano (a) y del alginato (b).

materials through green processing routes. Polymers from renewable sources are important candidates for the development of biomaterials due to their intrinsic characteristics of biocompatibility and biodegradability. The most employed are alginate, chitosan, gelatin or pectin among others. Many of the natural polymers are polyelectrolytes, that is, they present ionizable groups (polyanions or polycations) that can be dissociated in polar solutions like water resulting in charged polymer backbones and releasing counterions to the solution. Blending of aqueous solutions of polyanions and polycations leads to the formation of polyelectrolyte complexes (PECs). In this work, we describe the last trends in PECs processing of natural polymers through green routes and the resulting materials: films, hydrogels and membranes with special focus in their applications in the biomedical field.

**Keywords:** hydrogels, alginate, chitosan, polyelectrolyte complex, layer by layer, green process

### Introducción

En la actualidad, muchos esfuerzos en investigación dentro del campo de los materiales poliméricos se dirigen a diseñar y desarrollar materiales poliméricos bajo criterios de sostenibilidad medioambiental con el objetivo de reducir la dependencia de las materias primas del petróleo y eliminar residuos plásticos. En este contexto, surge la investigación en polímeros biodegradables, tanto en polímeros derivados de petróleo (principalmente de tipo poliéster) como en aquellos obtenidos de fuentes renovables entre los que destacan los extraídos de la biomasa, polisacáridos o polímeros naturales [1]. Los polímeros naturales son candidatos adecuados para



**Figura 2.** Complejos polielectrolitos compactos (CoPECs) obtenidos a partir de PDADMA/PSS por extrusión en diferentes formas (A) cinta, (B) varilla, (C) tubo y su sección transversal (D). Barra de escala 0.5mm [10].

el desarrollo de biomateriales debido a sus características intrínsecas de biocompatibilidad y biodegradabilidad. De hecho, los productos de degradación de los materiales naturales son a menudo azúcares simples, aminoácidos o minerales que pueden ser reconocidos por el cuerpo humano y procesados a través de rutas metabólicas establecidas [2].

Muchos de los polímeros naturales son polielectrolitos, es decir, presentan grupos ionizables (polianiones o polycationes) que pueden disociarse en disolventes polares como el agua quedando las cadenas cargadas y liberando los contraiones a la disolución. La mezcla de disoluciones de polianiones y polycationes

conduce directamente a la formación de complejos polielectrolitos (PECs) que son estructuras amorfas estabilizadas por entrecruzamientos iónicos. El proceso depende de varios factores: concentración salina, densidad de carga, temperatura, pesos moleculares relativos y velocidad y orden de mezclado. Uno de los ejemplos más relevantes de formación de PECs a partir de polímeros naturales es la combinación de los polisacáridos quitosano y alginato [3]. El quitosano es un copolímero de 2-acetamida-2-deoxi-D-glucopiranososa y 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa (**Figura 1a**). Los grupos amino presentes en el esqueleto polimérico confieren el carácter catiónico



Índice

Noticias



al quitosano. Se obtiene por hidrólisis alcalina de la quitina que, a su vez, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. La quitina es el componente orgánico más abundante del exoesqueleto de muchas clases de invertebrados, tales como los artrópodos y los moluscos y el principal componente polimérico de la pared celular de los hongos y algas. Por lo tanto, la quitina constituye un material importante obtenido a partir de fuentes naturales renovables [4]. Los alginatos son las sales del ácido alginico, polisacárido lineal constituido por dos unidades monoméricas, el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) (**Figura 1b**). El alginato es un componente de la pared celular de las algas pardas y se encuentra formando un complejo insoluble de ácido alginico y sus sales cálcica, magnésica y de metales alcalinos en varias proporciones. Este polímero debe su carácter aniónico a los grupos carboxilo que aparecen en la cadena polimérica [5]. Tanto el quitosano como el alginato son biocompatibles, biodegradables y biofuncionales. La combinación de ambos da lugar a la formación de biomateriales con diferentes morfologías: nanopartículas, filmes e hidrogel [6, 7]. Destacan además los materiales obtenidos por técnicas de ensamblaje capa a capa (LbL) en forma de recubrimientos, filmes finos o membranas poliméricas y su combinación con nanopartículas inorgánicas [8, 9].

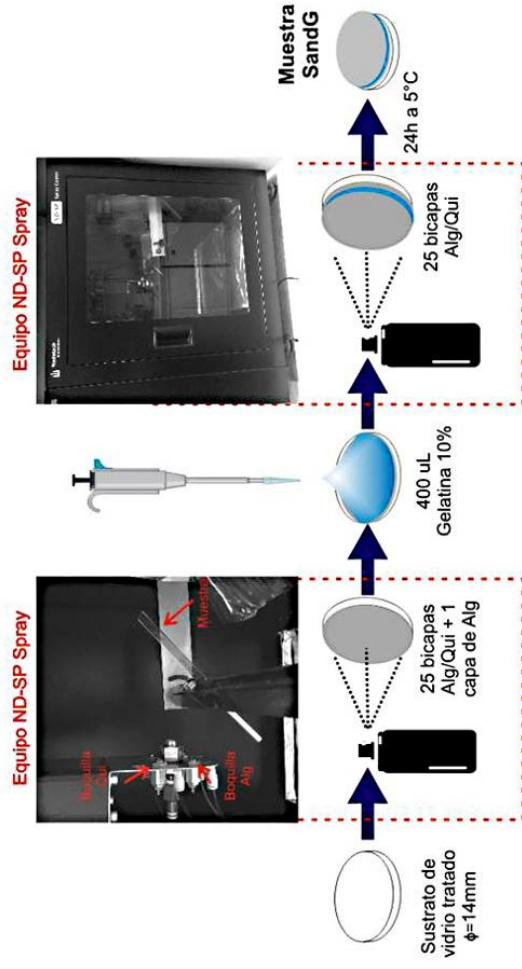
En 2009, Schlenhoff introdujo el concepto de complejos polielectrolitos compactos (CoPECs) que también denominó materiales saloplásticos (*saloplastic materials*). Este tipo de materiales se forman a partir del mezclado de disoluciones acuosas de un polianión y un poliacación en presencia de sal y se procesan mediante ultracentrifugación o extrusión. El apantallamiento que produce la sal en las interacciones electrostáticas, conduce a procesos de reorganización, generándose materiales en los que se puede controlar el grado de agregación de los complejos por la cantidad de sal añadida. La **Figura 2** muestra materiales saloplásticos preparados a partir de sulfonato de poliestireno (PSS) utilizado como polianión y *poly(4-vinilpirrolidona)* (PDADMA)

utilizado como poliacación procesados por extrusión lo que abre un amplio abanico de aplicaciones para este tipo de materiales [10].

La investigación acerca de la obtención de materiales saloplásticos a partir de polímeros naturales es muy reciente y plantea numerosos retos. De hecho, tanto el quitosano como el alginato son polielectrolitos débiles, por tanto, el rango de condiciones de procesamiento que da lugar a materiales saloplásticos es mucho más limitado que en el caso de los polímeros sintéticos comúnmente utilizados para la preparación de estos materiales [11, 12]. Este artículo describe la formación de complejos polielectrolíticos (PECs) mediante diferentes rutas de procesamiento de biomateriales obtenidos por combinación de alginato y quitosano con especial énfasis en recubrimientos obtenidos por técnicas de ensamblaje capa a capa (LbL) y los recientes desarrollos publicados acerca de hidrogel y membranas obtenidas a partir de CoPECs.

### Recubrimientos obtenidos por ensamblaje capa a capa (LbL)

El ensamblaje capa a capa (*layer by layer*, LbL) es una técnica sencilla y versátil que permite la formación de filmes poliméricos mediante adsorción secuencial de poliacaciones y polianiones sobre un sustrato funcionalizado. Cuando el polielectrolito se adsorbe en el sustrato, la carga superficial cambia de signo (de positiva a negativa o de negativa a positiva, dependiendo del material). Este proceso cíclico continúa hasta conseguir el número de capas deseado [13]. En la actualidad, existe un gran interés en el uso de la técnica LbL asistida por spray, para la preparación de nuevos materiales nanoestructurados a partir de biopolímeros [14]. En esta técnica, la fabricación de las capas poliméricas tiene lugar mediante la pulverización por medio de un aerosol de una disolución acuosa de un poliacación y un polianión de forma alternante o simultánea sobre un sustrato [15, 16]. El proceso de fabricación es más rápido que en el caso de la deposición por capas llevada a cabo por inmersión debido a la disminución de los tiempos en la pulverización y la necesidad del lavado por el exceso de solución.



**Figura 3.** Representación esquemática del método de fabricación de geles de gelatina recubiertos de alginato/quitosano mediante la técnica de deposición por capas asistida por spray.

La pulverización por spray puede llevarse a cabo perpendicularmente a la superficie del sustrato, lo que permite la eliminación del exceso de la solución por acción de la gravedad. Además, esta técnica permite el control sobre la distancia de la boquilla del spray de pulverización y la superficie de la muestra, el control sobre el caudal y el volumen de la solución a pulverizar [17, 18].

El empleo de la técnica LbL para el desarrollo de biomateriales a partir de polímeros naturales se ha enfocado principalmente a la puesta a punto de recubrimientos bioactivos. Esto es debido a la versatilidad de la técnica LbL que permite modular características fisicoquímicas de superficies poliméricas tales como composición química de la última capa depositada, rugosidad o rigidez que influyen en la respuesta celular [19]. En aplicaciones de liberación controlada, la utilización de recubrimientos LbL permite el diseño de mate-

riales para la coencapsulación y liberación de diferentes fármacos cuya cinética de liberación se puede controlar mediante la arquitectura del filme polimérico [20]. Por otro lado, los recubrimientos LbL constituyen materiales organizados en capas que, en muchos casos, reproducen la organización de tejidos vivos y sus propiedades mecánicas. Recientemente, se ha publicado una metodología para la obtención de recubrimientos LbL de hidrogel de gelatina (GL) que da lugar a materiales estructurados que reproducen la morfología del disco intervertebral [21]. La gelatina es una proteína con propiedades anfotéricas que se obtiene mediante hidrólisis del colágeno, un componente fundamental de la matriz extracelular en los tejidos conectivos. El método de preparación consistió en la deposición secuencial de capas de sulfato de condroitina (ChS) y gelatina sobre un núcleo de gelatina mediante la técnica de inmersión LbL. Me-

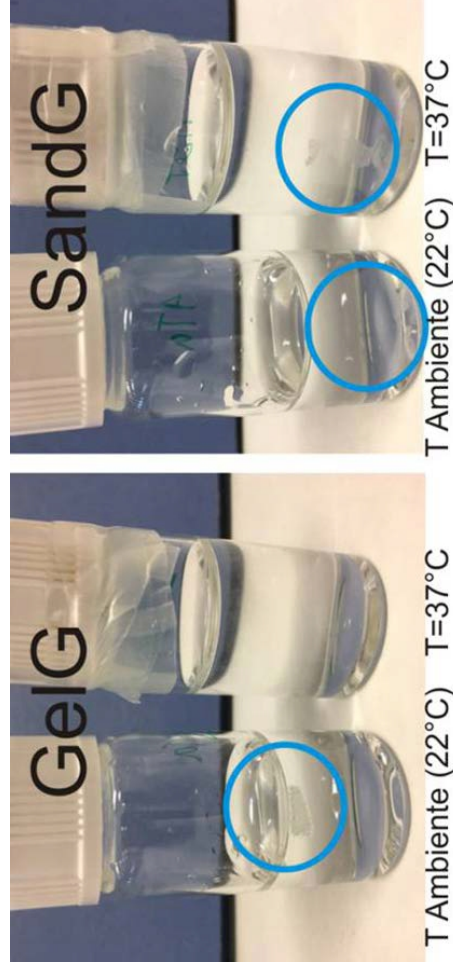
dante la variación de las concentraciones de gelatina y sulfato de condroitina, se pudieron obtener geles denominados de doble membrana consistentes en un núcleo de gelatina recubierto por capas de ChS y GL.

En nuestro grupo de investigación hemos dado un paso adelante en el desarrollo de recubrimientos de geles de gelatina a base de polímeros naturales mediante la puesta a punto de la técnica LbL asistida por spray para su fabricación en un equipo automatizado (ND-Spray, Nadetech Innovations). Una representación esquemática del método de fabricación se muestra en la **Figura 3**. En primer lugar se depositan 25 bicapas de alginato y quitosano a partir de disoluciones con pH 3 y 5 respectivamente y una última capa de alginato sobre un sustrato de vidrio previamente funcionalizado con polietilenoimina. Posteriormente, se deposita sobre las bicapas 400  $\mu\text{L}$  de una disolución de gelatina a 50  $^{\circ}\text{C}$  al 10 % g/mL. El material resultante se enfría a 5  $^{\circ}\text{C}$  durante 2h para que tenga lugar la gelificación de la gelatina. Una vez solidificado, se aplican 25 bicapas de alginato/quitosano a modo de recubrimiento. Terminado todo el proceso, la muestra se almacena a 5  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

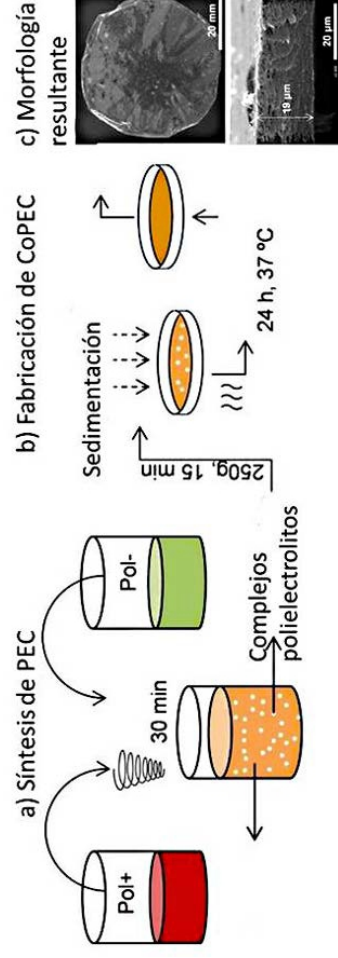
El recubrimiento de Alginato/Quitosano sobre geles de gelatina da lugar a un aumento de la estabilidad dimensional del gel resultante en respuesta a la temperatura. Tal y como se puede observar en la **Figura 4**, tanto el gel de gelatina (GelG) como el gel recubierto (SandG) a temperatura ambiente conservan su estabilidad dimensional a temperatura ambiente. A 37  $^{\circ}\text{C}$ , el gel de gelatina funde, mientras que el gel recubierto (SandG) mantiene su estabilidad dimensional. Estos resultados son prometedores de cara al desarrollo de aplicaciones para estos materiales en liberación controlada de fármacos.

### Membranas e hidrogeles obtenidos a partir de COPECs.

Tal y como se ha mencionado en el apartado de introducción, el mezclado de polianiones y poliacetones en disolución da lugar a la formación de complejos polielectrolitos. Los



**Figura 4.** Fotografía de los geles a temperatura ambiente y a 37  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 5.** Representación esquemática del método de fabricación de CoPECs de alginato y quitosano en forma de membranas. Fotografía de membrana resultante y sección transversal. Adaptado de referencia [23].

PECs forman dos fases, una pobre y otra rica en polielectrolitos. La fase rica, se denomina coacervado y se compone de cadenas poliméricas débilmente asociadas. Cuando los coacervados se secan, el resultado es un material opaco y rígido difícil de procesar. Sin embargo, la adición de cosolutos y el empleo de sales para plastificar dichos coacervados, unidos a un procesado basado en ultracentrifugación o extrusión dan lugar a los denominados complejos polielectrolitos compactos (CoPECs) o materiales saloplásticos [22].

Recientemente se han preparado y caracterizado materiales saloplásticos obtenidos a partir de alginato y quitosano en forma de membranas a través de un procedimiento verde en dos etapas que se muestra esquemáticamente en la **Figura 5**. En una primera etapa se sintetizaron los PECs mediante el mezclado simultáneo de volúmenes iguales de disoluciones acuosas de quitosano y alginato y posterior centrifugación de la dispersión resultante (**Figura 5a**). En una segunda etapa, se obtuvieron CoPECs por un proceso de sedimentación y secado de los PECs en una placa Petri (**Figura 5b**). Tal y como se puede observar en la imagen SEM correspondiente a la sección transversal de una membrana preparada a partir de disoluciones acuosas de alginato y quitosano con una concentración 0,15 M de NaCl, las membranas obtenidas son compactas, no porosas y homogéneas en todo su espesor (**Figura 5c**) [23].

La estabilidad de las membranas se determinó a través de ensayos de degradación *in vitro* llevados a cabo en soluciones tampón fosfato salino en presencia de la enzima lisozima, que cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos del quitosano. Tras 90 días, las membranas CoPECs perdieron menos de un 10% en peso. Por otro lado, es bien conocido que tanto el quitosano como el alginato son polielectrolitos débiles y por tanto susceptibles a variaciones en el pH. Sin embargo, las membranas CoPECs pueden soportar condiciones agresivas de pH debido a que presentan un pK diferente al de los polímeros de partida. La estabilidad de las membranas de CoPECs al pH y a condiciones enzimáticas hace que





**Figura 6.** Hidrogel formado a partir de PECs de alginato y quitosano con propiedades de moldeabilidad y autorreparación. Figura tomada de referencia [25].

se pueda anticipar su aplicación como materiales para liberación controlada de fármacos tales como parches cutáneos para liberación de antibióticos o antiinflamatorios o reservorios de factores de crecimiento para modular la diferenciación de células madre.

La formación de PECs de alginato y quitosano mediante el método de ultracentrifugación da lugar a materiales que se comportan como geles macroscópicos con un alto grado de entrecruzamiento y módulo de Young estimado de 12 MPa, en el rango de tejidos biológicos como la epidermis o el tejido óseo [24]. Este mismo año se ha publicado el desarrollo de una nueva generación de hidrogeles denominados 4D que son materiales con un alto contenido en agua, capaces de transformar su forma, composición y propiedades físicas tras su fabricación [25]. Los hidrogeles 4D exhiben un comportamiento similar a la 'plastilina' ya que pueden deformarse a bajos esfuerzos y recuperan rápidamente sus características de sólidos viscoelásticos lo que les permite adoptar formas determinadas. La **Figura 6** muestra las propiedades de un hidrogel 4D preparado a partir de PECs de quitosano y alginato donde se muestra la posibilidad de unir tres fragmentos diferentes de hidrogel en una sola pieza que, a su vez, puede adoptar diferentes formas (en la figura, forma de donuts).

El procedimiento de formación empleado, basado solamente en la formación de PECs, es compatible con la encapsulación de células en condiciones suaves, por tanto, estos materiales presentan potenciales aplicaciones como matrices para diferenciación celular. Además, sus propiedades de tixotropía y moldeabilidad hacen que estos materiales puedan utilizarse

como materiales de relleno de defectos tisulares con morfologías complejas o parches que se adapten a diferentes formas en aplicaciones tópicas dérmicas. Por último, el hecho de que fragmentos diferentes de gel se puedan unir en una sola pieza puede ser beneficioso para la preparación de dispositivos de cultivo celular.

### Conclusiones

La combinación de quitosano y alginato conduce a la formación de complejos polielecrolitos. Mediante rutas sencillas de procesamiento, se pueden obtener materiales tipo film o geles recubiertos con el método capa a capa e hidrogeles o membranas con el método de ultracentrifugación o extrusión de PECs con propiedades modulables y prometedoras aplicaciones biomédicas. Sin embargo, estos materiales se obtienen solo bajo condiciones muy estrictas y limitadas de pH y concentración. Por tanto, la búsqueda de nuevas condiciones y métodos de procesado plantea numerosos retos que permiten anticipar un amplio universo de biomateriales basados en complejos polielecrolitos.

### Agradecimientos:

Las autoras agradecen la financiación económica del MINECO (MAT2017-83014-C2-2-P). Jimena González agradece al CONICET, Universidad Nacional de Mar del Plata y ANPCYT (PICT 2016-1905).

### Referencias

1. Averous L, Pollet E. Biodegradable polymers. London: Springer-Verlag London; 2012.
2. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007; **32**(8): 762-98.

13. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 1997; **277**(5330): 1232-7.
14. Criado M. Layer-by-layer assembly of natural polymer for biomedical applications: Unirreversible Completeness de Madrid; 2017.
15. Crouzier T, Boudou T, Picart C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2010; **15**(6): 417-26.
16. Criado M. Tesis doctoral: Layer-by-Layer assembly of natural polymers for biomedical applications. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2017.
17. Criado M, Mijangos C, Hernández R. Procesos de fabricación y aplicaciones avanzadas de filmes poliméricos nanoestructurados capa a capa *Revista de Plásticos Modernos* 2015; **110**(706): 13-7.
18. Richardson JJ, Björnmalm M, Caruso F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *Science* 2015; **348**(6233).
19. Szunerits S, Boukherroub R. Heat: A Highly Efficient Skin Enhancer for Transdermal Drug Delivery. *Frontiers in Biotechnology and Biotechnology* 2018; **6**(15).
20. Keeney M, Jiang XY, Yamane M, Lee M, Goodman S, Yang F. Nanocoating for biomolecule delivery using layer-by-layer self-assembly. *Journal of Materials Chemistry B* 2015; **3**(45): 8757-70.
21. Criado M, Rey JM, Mijangos C, Hernandez R. Double-membrane thermoresponsive hydrogels from gelatin and chondroitin sulphate with enhanced mechanical properties. *RSC Advances* 2016; **6**(107): 105821-6.
22. Porcel CH, Schlenoff JB. Compact Polyelectrolyte Complexes: "Saloplastic" Candidates for Biomaterials. *Biomacromolecules* 2009; **10**(11): 2968-75.
23. Costa RR, Costa AMS, Caridade SG, Mano JF. Compact Saloplastic Membranes of Natural Polysaccharides for Soft Tissue Engineering. *Chemistry of Materials* 2015; **27**(21): 7490-502.
24. Phoeung T, Spanedda MV, Roger E, et al. Alginate/Chitosan Compact Polyelectrolyte Complexes: A Cell and Bacterial Repellent Material. *Chemistry of Materials* 2017; **29**(24): 10418-25.
25. Oliveira MB, Bastos HXS, Mano JF. Sequentially Moldable and Bondable Four-Dimensional Hydrogels Compatible with Cell Encapsulation. *Biomacromolecules* 2018.

3. Buriuli M, Verma D. Polyelectrolyte Complexes (PECs) for Biomedical Applications. In: Tripathi A, Melo JS, eds. *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications*. Singapore: Springer Singapore; 2017: 45-93.
4. Peniche C, Argüelles-Monal W, Goycoolea FM. Chapter 25 - Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. In: Belgacem MN, Gandini A, eds. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Amsterdam: Elsevier; 2008: 517-42.
5. Dragnet KI, Smidsrod O, Skjak Braek G. Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes Weinheim: VCH Verlag; 2002.
6. Verma D, Desai MS, Kulkarni M, Langrana N. Characterization of surface charge and mechanical properties of chitosan/alginate based biomaterials. *Materials Science and Engineering: C* 2011; **31**(8): 1741-7.
7. Quiñones JP, Peniche H, Peniche C. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery. *Polymers* 2018; **10**(3): 235.
8. Criado M, Sanz B, Goya GF, Mijangos C, Hernandez R. Magnetically responsive biopolymeric multilayer films for local hyperthermia. *Journal of Materials Chemistry B* 2017; **5**(43): 8570-8.
9. Criado M, Rebolter E, Nogales A, et al. Quantitative Nanomechanical Properties of Multilayer Films Made of Polysaccharides through Spray Assisted Layer-by-Layer Assembly. *Biomacromolecules* 2017; **18**(1): 169-77.
10. Shamoun RF, Reisch A, Schlenoff JB. Extruded Saloplastic Polyelectrolyte Complexes. *Advanced Functional Materials* 2012; **22**(9): 1923-31.
11. Fu J, Wang Q, Schlenoff JB. Extruded Superparamagnetic Saloplastic Polyelectrolyte Nanocomposites. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2015; **7**(1): 895-901.
12. Andreas R, Patricia T, Emilie R, et al. Compact Saloplastic Poly(Acrylic Acid)/Poly(Allylamine) Complexes: Kinetic Control Over Composition, Microstructure, and Mechanical Properties. *Advanced Functional Materials* 2013; **23**(6): 673-82.



Índice



Noticias