

OBTENCIÓN DE COMPOSITOS NANOPARTÍCULAS DE SILICIO Y COLÁGENO

Montiel Carrillo Amy Pamela (1), González-García Gerardo (2)

1 [Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, Bachillerato General] | [Dirección de correo electrónico: ap.montielcarrillo@ugto.mx]

2 [Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [Dirección de correo electrónico: gerardog@ugto.mx]

Resumen

En este trabajo se reporta la obtención de novedosos biocompositos fluorescente basado en colágeno y nanopartículas de silicio. El colágeno se obtuvo de pericardio bovino y fue descelularizado por las siguientes metodologías: *i*) solo tratamiento con surfactante neutro Tritón X-100 y *ii*) tratamiento por cinco ciclos de congelamiento a 77 K y descongelación a temperatura ambiente más un tratamiento con surfactante neutro Tritón X-100. Las nanopartículas de silicio se obtuvieron a partir de *N*-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina (DAMO) y ascorbato de sodio en medio acuoso como agente reductor. El colágeno descelularizado se impregnó con la disolución de nanopartículas de silicio en un medio de disolución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). Los compositos y nanopartículas de silicio se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis elemental de energía dispersiva (EDS) y se comparó la fluorescencia bajo luz ultravioleta ($\lambda = 350$ nm) y luz visible.

Abstract

In this work, we report the preparation of novel fluorescent biocomposites based on collagen and silicon nanoparticles. Collagen was obtained from bovine pericardium and was decellularized by the following methodologies: *i*) only treatment with neutral surfactant Triton X-100 and *ii*) treatment by five cycles of freeze-thaw cycles at 77 K to the room temperature plus treatment with neutral surfactant Triton X-100. The silicon nanoparticles were obtained from *N*-(2-aminoethyl)-3-(trimethoxysilyl)propylamine (DAMO) and sodium ascorbate in an aqueous medium as a reducing agent. The decellularized collagen was impregnated with a dispersed silicon nanoparticle in a phosphate buffered saline solution (PBS). Silicon composites and nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy (SEM), and elemental energy dispersive analysis (EDS) and fluorescence were compared under ultraviolet light ($\lambda = 350$ nm) and visible light.

Palabras Clave

Biocomposite; Pericardio bovino; Matriz extracelular; Silicio; Fluorescencia.

INTRODUCCIÓN

Los materiales híbridos o composites basados en pericardio bovino descelularizado y materiales inorgánicos biocompatibles representan un área de estudio con potencial aplicación en el desarrollo de nuevos materiales en ingeniería de tejidos [1-3]. Por otro lado, se conoce que las nanopartículas de silicio también presentan alta biocompatibilidad y baja toxicidad celular y sus propiedades fluorescentes tienen potencial aplicación en diagnóstico y detección por bio-imágenes médicas [4]. Este estudio combinó nanopartículas de silicio fluorescentes con matriz extracelular de pericardio bovino, con el objetivo de producir un andamio adecuado para la ingeniería del tejido cardíaco con propiedades fluorescentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis por Microscopía Electrónica de Barridos. Todas las imágenes SEM y los análisis EDS se realizaron en a Microscopio Electrónico de Barrido marca Zeiss, EVO HD15 LS (Germany). Las muestras fueron previamente liofilizadas y metalizadas con oro en un equipo Fine Coat Ion Sputter Jeol JFC-1100.

Obtención de Sacos de Pericardio Bovino. El pericardio fue obtenido del rastro municipal de Silao de la Victoria, Gto., inmediatamente después del sacrificio de bovinos adultos. Posteriormente, se enjuagó con agua potable y con una disolución salina amortiguadora pH 7.4 de fosfatos (PBS), con el fin de eliminar la grasa y sangre.

Síntesis de nanopartículas de silicio (Disolución primaria). 1.0 mL de *N*-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina (DAMO) se adicionó a 4.0 mL de agua desionizada, luego 1.25 mL de ascorbato de sodio 0.1 M se adicionaron lentamente y se dejó la mezcla de reacción en agitación por 20 min a temperatura ambiente. Las nanopartículas de silicio fueron dializadas utilizando una membrana de celulosa.

Disolución de Impregnación. 1.0 mL de la primaria se adicionan a 9.0 mL de disolución amortiguadora PBS. En un tubo de ensayo se adiciona esta disolución tres muestras de matriz extracelular de tamaño 1.0 cm x 3.0 cm aproximadamente y se deja un día a 4 °C por un día.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de la matriz extracelular pericárdica

Para la eliminación eficiente de células en el pericardio bovino se empleó un protocolo recientemente reportado por Ning Li, y col. [5] y se basa en emplear ciclos de congelación-descongelación de 77 K (nitrógeno líquido) a temperatura ambiente más un lavado con un surfactante no iónico Tritón X-100. En la Figura 1 se muestran las micrografías de microscopía electrónica de barrido, en donde observa principalmente las estructuras fibrilares de la matriz extracelular pericárdica obtenidas por dos tratamientos: *i*) solo tratamiento con surfactante neutro Tritón X-100 y *ii*) tratamiento por cinco ciclos de congelamiento a 77 K y descongelación a temperatura ambiente más un tratamiento con surfactante neutro Tritón X-100. El análisis elemental EDS muestra la composición química de carbono, nitrógeno y oxígeno debido al origen proteínico del colágeno.

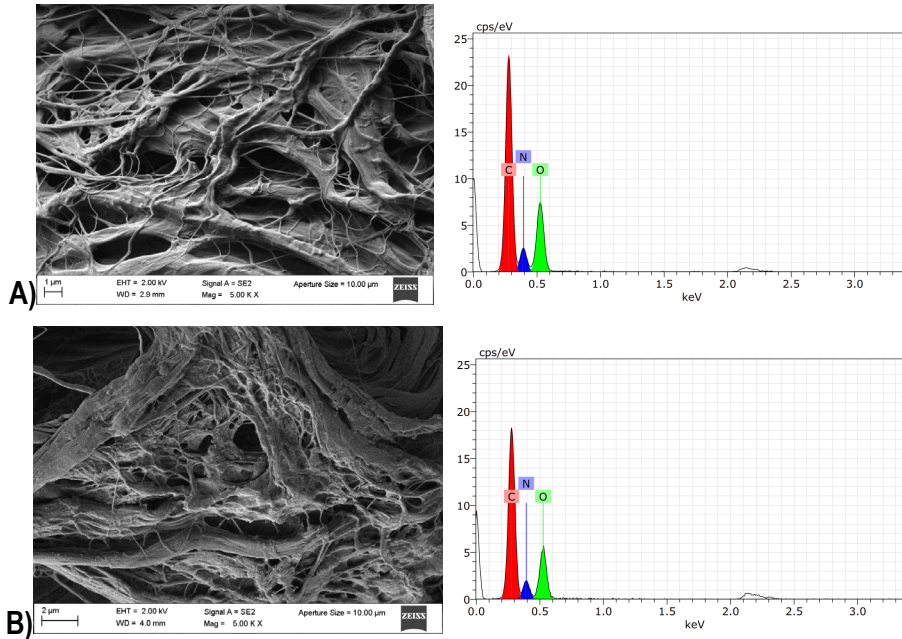


Figura 1. Micrografías SEM de pericardio bovino y análisis elemental EDS de: A) deslaminado con Tritón X-100 y B) deslaminado con Tritón X-100 más cinco ciclos de congelación-descongelación.

Nanopartículas de Silicio

Las nanopartículas de silicio se obtuvieron a partir de *N*-(2-aminoetil)-3-(trimetoxisilil)propilamina (DAMO) y ascorbato de sodio en medio acuoso, utilizando un procedimiento reportado recientemente [1]. La figura 2A se muestra la disolución primaria de nanopartículas de silicio, en medio de PBS y disolución PBS solamente, bajo la luz visible y en la figura 2B se muestran comparativamente bajo la luz ultravioleta. Se puede observar un incremento de la intensidad de la fluorescencia cuando las nanopartículas están en disolución PBS que en la disolución primaria y no se observó fluorescencia en la disolución blanco de PBS.

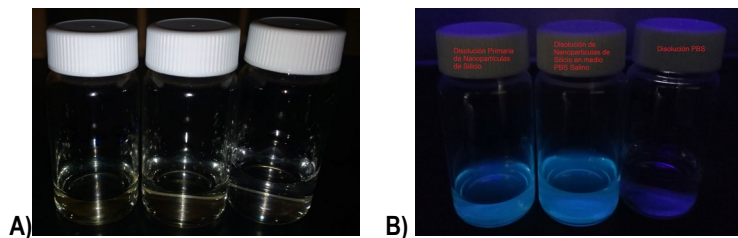


Figura 2. Disoluciones acuosas de nanopartículas de silicio primarias, en disolución PBS y disolución blanco de PBS bajo luz visible y B) bajo luz ultravioleta.

Las disoluciones de nanopartículas primarias fueron dializadas utilizando una membrana de celulosa y una muestra se dispersó sobre una película de carbono para posteriormente ser analizada por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis elemental EDS (Figura 3). Comprobando la presencia de silicio y otros iones elementos presentes muy probablemente en forma de sales.

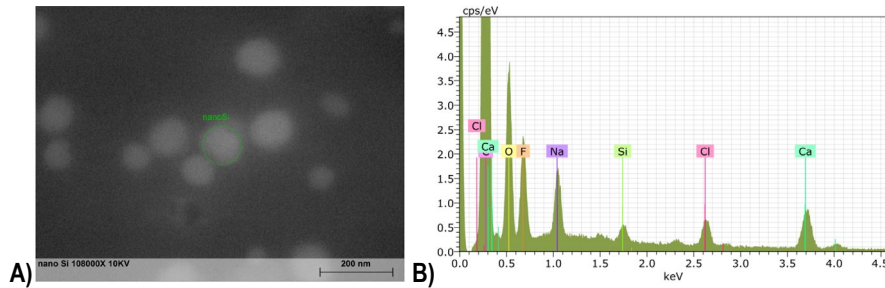


Figura 3. Micrografía SEM de las nanopartículas de silicio primarias dializadas y B) Análisis elemental EDS.

Las disoluciones de nanopartículas primarias, nanopartículas en disolución PBS se utilizaron para la impregnación de las nanopartículas de silicio sobre una matriz extracelular de pericardio bovino. Cada muestra de matriz extracelular pericárdica fue tratada con una disolución de nanopartículas de silicio dispersas en un amortiguador de fosfatos salina (PBS), por un día a 4 °C. Posteriormente se liofilizaron y se analizaron por SEM y EDS. La Figura 4A se observa el aspecto los tejidos después de la impregnación y posterior liofilizado. La Figura 4B se muestra la fluorescencia de los biocomposites bajo la luz ultravioleta.

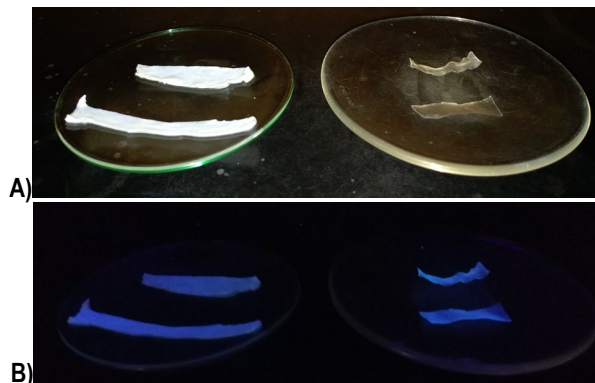


Figura 4. A) Aspecto de la matriz extracelular pericárdica (Izquierda) después de impregnación de nanopartículas de silicio y Derecha) después de liofilizado. Abajo) descellularizado con Tritón X-100 y Arriba). descellularizado con Tritón X-100 más cinco ciclos de congelación-descongelación. B) Fluorescencias de los biocomposites bajo la irradiación de luz ultravioleta.

Las micrografías SEM de los biocomposites (Figura 5) revelan una compactación de las fibras de colágeno para ambos tratamientos de descellularización. El análisis elemental EDS comprueba la presencia del alrededor del 4 % de silicio en la matriz extracelular pericárdica.

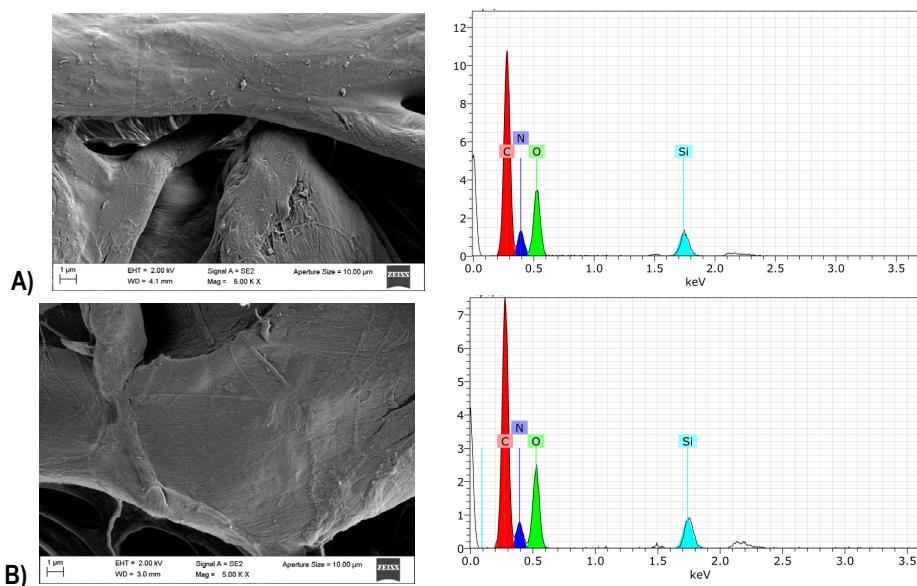


Figura 5. Micrografías SEM de pericardio bovino y análisis elemental EDS de: A) desceldularizado con Tritón X-100 y B) desceldularizado con Tritón X-100 más cinco ciclos de congelación-descongelación. Después de la impregnación con nanopartículas de silicio.

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló una metodología para obtener novedosos biocomposites de colágeno fluorescente, basados en nanopartículas de silicio y una matriz extracelular de pericardio bovino.

AGRADECIMIENTOS

APMC agradece apoyo económico por la Universidad de Guanajuato a través del Programa Verano de la Investigación Científica 2018. Se agradece el apoyo de la Dra. Paulina Lozano y el Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular (CONACYT-México, Project: 123732) para la caracterización por SEM y EDS.

REFERENCIAS

- [1] Mendoza-Novelo B., González-García G., Mata-Mata J. L., Castellano L. E., Cuéllar-Mata P. & Ávila E. E. (2013). A biological scaffold filled with silica and simultaneously crosslinked with polyurethane. *Materials Letters*, 106, 369–372. Doi: 10.1016/J.MATLET.2013.05.088.
- [2] Claudio-Rizo J. A., Rangel-Argote M., Muñoz-González P. U., Castellano L. E., Delgado J., González-García G. & Mendoza-Novelo B. (2016). Improved properties of composite collagen hydrogels: Protected oligourethanes and silica particles as modulators. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(40), 6497–6509. Doi: 10.1039/c6tb01673a.
- [3] Muñoz-González P. U., Rivera-Debernardi O., Mendoza-Novelo B., Claudio-Rizo J. A., Mata-mata J. L., Delgadillo-Holtfort I., Carriles R., Flores-Moreno M. González-García G. Cauich-Rodríguez J.V. Delgado, J. & Castellano, L. E. (2018). Design of Silica-Oligourethane-Collagen Membranes for Inflammatory Response Modulation: Characterization and Polarization of a Macrophage Cell Line, 1800099(130), 1–11. doi: 10.1002/mabi.201800099.
- [4] Wang J., Ye D.-X., Liang G.-H., Chang J., Kong J.-L. & Chen J.-Y. One-step synthesis of water-dispersible silicon nanoparticles and their use in fluorescence lifetime imaging of living cells. (2014). *J. Mater. Chem. B*, 2(27), 4338–4345. doi: 10.1039/c4tb00366g.
- [5] Li N., Li Y., Gong D., Xia C., Liu X. & Xu, Z. Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility. (2018). *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 26(5), 768–776. doi:10.1093/icvts/ivx416.