

Hidrogeles de gelatina-óxido de grafeno para el encapsulamiento de *Kluyveromyces lactis*: prueba de concepto para reactores de lecho empacado altamente eficientes para la producción de ácido láctico.

Eduardo Alejandro Fonseca Niño

Departamento de ingeniería química, Universidad de los Andes, Bogotá D.C, Colombia

Resumen

El ácido láctico se usa ampliamente en la industria, debido a sus características benéficas, que permite que se use en la industria alimenticia como conservante de alimentos y bebidas. En la actualidad se realiza bio producción de este componente, debido a la necesidad de obtener ácido láctico ópticamente puro. La mejor solución para la bio producción a pequeña escala es inmovilizar microorganismos en algún tipo de matriz que permita proteger a la levadura o bacteria, absorber sustrato y liberar metabolito de manera rápida. Estas matrices están principalmente compuestas de biopolímeros donde se destaca principalmente geles de agar, alginato y gelatina. En la búsqueda de mejorar los empaques sin afectar la biocompatibilidad se implementó el uso de nanocompuestos, como el Óxido de grafeno (GO), con el cual se mejoran propiedades como la degradación y estabilidad, manteniendo una buena bio compatibilidad. Los hidrogeles de gelatina-GO, exhibieron mejoras en propiedades como la estabilidad e integridad física mejorando de valores de compresión de 40 Pa a casi 187 Pa, además de mejorar entre 6-12 % los valores de viabilidad y disminuyendo en casi un 49% la porosidad dentro de los nanocomposites. Pruebas de reometría, Texturometría y TGA fueron usadas para observar la mejora en la integridad física en los hidrogeles.

Palabras Clave Óxido de grafeno, Texturometría, integridad, viabilidad y degradación

Abstract

Lactic acid is widely used in industry, due to its beneficial characteristics, which allows it to be used in the food industry as a food and beverage preservative. At present, bio-production of this component is carried out, due to the need to obtain optically pure lactic acid. The best solution for small-scale bioproduction is to immobilize microorganisms in some type of matrix that allows to protect yeast or bacteria, absorb substrate and release metabolite quickly. These matrices are mainly composed of biopolymers where agar, alginate and gelatin gels stand out mainly. In the search to improve the packaging without affecting the biocompatibility, the use of nanocomposites, such as graphene oxide (GO), with which properties such as degradation and stability are improved, maintaining a good bio compatibility was implemented. The gelatin-GO hydrogels exhibited improvements in properties such as stability and physical integrity, improving compression values from 40 Pa to almost 187 Pa, in addition to improving viability values between 6-12% and decreasing by almost 49% the porosity within the nanocomposites. Rheometry, Texturometry and TGA tests were used to observe the improvement in physical integrity in hydrogels

Key words Graphene oxide, Texturometry, integrity, viability and degradation

1. Introducción

El ácido láctico se usa ampliamente en la industria, debido a sus características benéficas, que permite que se use en la industria alimentaria como conservante de alimentos y bebidas, además en farmacia en producción y conservación de medicina, textilera, en la industria del cuero y como precursor de ácido poliláctico, o PLA por sus siglas en inglés, utilizado en la producción de plásticos biodegradables (Martinez et al. 2013)

El ácido láctico se puede obtener por síntesis química o por vía fermentativa. En la actualidad se prefiere la vía fermentativa, debido a la necesidad de obtener ácido láctico ópticamente puro (Waldir et al. 2007), además de usar fuentes alternativas de producción que disminuyan el impacto ambiental de industrias lecheras y petroleras (Zayed y Zahran 1991).

El ácido láctico se puede derivar de varias fuentes ricas en hexosas, ya que es un derivado de la glucólisis, también conocida como la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (Serna-Cock y Stouvenel 2005), la cual es una ruta anaeróbica de producción de energía común en los seres vivos. Una de las fuentes de producción de ácido láctico más conocidas es el suero lácteo el cual tiende a ser altamente contaminante si se desecha a las fuentes hídricas, además de ser rico en los sustratos requeridos para la producción de ácido láctico (Zayed y Zahran 1991).

La producción biotecnológica o bio producción depende del tipo de microorganismo utilizado (bacterias o levaduras), la inmovilización y/o recirculación del microorganismo, el pH del medio, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos (Serna-Cock y Stouvenel 2005).

En la bio producción tenemos dos maneras de disponer de los microorganismos dentro del reactor, la primera es con el microorganismo libre, mientras que en la segunda se inmoviliza la levadura o bacteria dentro de una matriz fabricada a partir de biopolímeros como agar, alginato o gelatina, por mencionar algunas (Serna-Cock y Stouvenel 2005). En el caso de no inmovilizar los microorganismos, se pueden presentar problemas a nivel de inhibición por la presencia de sustrato y metabolito, además de disminuir la actividad de los microorganismos dentro del reactor, lo que lleva a niveles menores de producción (Roohina, Mohammadi, y Najafpour 2016).

Por otro lado se ha observado que la inmovilización mejora la producción y la viabilidad dentro de los reactores, ya que la matriz protege del medio ambiente a los microorganismos y por medio de su porosidad permite establecer las colonias de mejor forma dentro de los empaques (Zayed y Zahran 1991). En el caso de la inmovilización, propiedades como la estabilidad y el hinchamiento del empaque son determinantes en el tiempo y la cantidad de producción, si los empaques se deterioran rápidamente, el microorganismo inmovilizado no tendría tiempo suficiente para producir metabolito, además si no hay una entrada adecuada de sustrato los microorganismos no serían capaces de alimentarse (Serna-Cock y Stouvenel 2005; Zayed y Zahran 1991). Además, las condiciones del medio pueden alterar la química de los geles y acelerar la degradación de los empaques. Por este motivo en la producción de ácido láctico se

usan polímeros que puedan mantener sus propiedades a un pH bajo, como el agar o la gelatina, los cuales suelen entrecruzados químicamente con agentes como el glutaraldehído a concentraciones bajas, menores o iguales al 3%, para no afectar de forma negativa la viabilidad celular dentro de los geles (Patarroyo 2019).

Con lo anterior, se propone realizar la inmovilización de levaduras productoras de ácido láctico, *Kluyveromyces lactis*, en hidrogeles de Gelatina y óxido de grafeno (GO) entrecruzados químicamente con glutaraldehído a bajas concentraciones, que tengan mayor duración y estabilidad dentro del reactor, sin afectar negativamente la viabilidad del microorganismo. Los empaques serán llevados y probados en un biorreactor de bajo costo para producir ácido láctico.

En las pruebas queremos determinar la viabilidad de los cultivos de la levadura *K.lactis* dentro de los hidrogeles de Gelatina-óxido de grafeno (GO), además de observar cambios en la morfología, el hinchamiento y la integridad física del gel, dada la presencia del GO y su implementación dentro del biorreactor.

2. Objetivos

2.1. General

- Desarrollar un potencial material a partir de hidrogeles entrecruzados de Gelatina-Óxido de grafeno, para encapsular la levadura productora de ácido láctico ***Kluyveromyces lactis***.

2.2. Específicos

- Realizar la caracterización de los hidrogeles de gelatina y óxido de grafeno
- Evaluar los cambios sobre la porosidad e integridad física de los geles, a diferentes concentraciones de óxido de grafeno
- Determinar la viabilidad celular de levaduras *K.lactis* dentro del gel empleando técnicas de microscopía

3. Marco teórico

3.1. Bio producción de ácido láctico

El ácido láctico es un ácido orgánico ampliamente distribuido en la naturaleza. Es el ácido hidroxicarboxílico más simple con un átomo de carbono quiral y presenta dos enantiómeros L y D, como se puede observar en la **ilustración 1**. El comportamiento químico del ácido láctico está determinado por sus propiedades fisicoquímicas, entre las cuales se encuentran el carácter ácido en medio acuoso, reactividad bifuncional asociada con la presencia de un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, lo que le da una gran versatilidad de reacción y actividad óptica asimétrica del carbono 2 (Martinez et al. 2013).

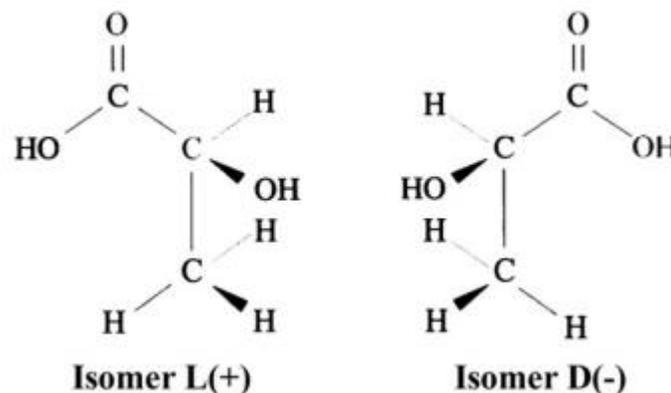


Ilustración 1. Enantiómeros L y D del ácido láctico (Martinez et al. 2013)

La síntesis química de ácido láctico tiene la desventaja de producir una mezcla racémica de D y L ácido láctico ópticamente inactivo, por lo cual el 90% de la producción mundial se basa en la bio producción (Serna-Cock y Stouvenel 2005). La bio producción de ácido láctico sigue la ruta metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas. Esta ruta de naturaleza anaeróbica es tal vez la ruta metabólica más antigua, y por lo tanto está presente en formas de vida como bacterias y levaduras. El producto final de esta ruta es el lactato o ácido láctico, el cual luego debe ser purificado.

En el caso de la bio producción tenemos dos formas para disponer de los microorganismos presentes. La primera es dejarlos libres, y la segunda es inmovilizarlos en algún tipo de matriz que permita absorber sustrato y soltar metabolito (Zayed y Zahran 1991). En el caso de los microorganismos inmovilizados, se ha encontrado que se mejora el proceso metabólico en levaduras y bacterias, además de no ralentizar el proceso de producción de ácido láctico (Zayed y Zahran 1991).

3.2. Microorganismos usados en la producción de ácido láctico

En la producción de ácido láctico los microorganismos usados tienden a ser bacterias y levaduras las cuales sean preferiblemente termófilas, que fermenten rápida y completamente

sustratos baratos, que crezcan en condiciones de valores reducidos de pH y presenten una baja producción de subproductos (Zayed y Zahran 1991).

Las bacterias que pueden utilizarse para la producción de ácido láctico son cocos y bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* y *Weissella*, la mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5, lo que les da ventajas competitivas sobre otras bacterias; la temperatura óptima de crecimiento de estas varía entre géneros y está en un rango de 20°C a 45°C (Serna-Cock y Stouvenel 2005).

En el caso de los hongos se usan mohos y levaduras que pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zymomonas*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, aunque en el caso de los mohos, su uso se ve reducido ya que tienden a preferir vías metabólicas que producen otros subproductos como el etanol y el ácido acético (Serna-Cock y Stouvenel 2005). La fermentación fúngica a base de levaduras tiene la ventaja de requerir un medio simple para producir ácido láctico, pero también tiene requerimientos elevados de aireación y agitación (Serna-Cock y Stouvenel 2005).

Levaduras del género *Rhizopus*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* se tienden a usar en la producción de ácido láctico, pero se tiende a evitar el uso del segundo, ya que produce cantidades importantes de etanol y bajas de ácido láctico (Serna-Cock y Stouvenel 2005). Estas levaduras trabajan a valores de pH de entre 5 y 7, y a temperaturas de entre 30 y 37 °C (Serna-Cock y Stouvenel 2005). En la **Ilustración 2**, podemos observar micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) tomadas a levaduras de la especie *K.lactis*.

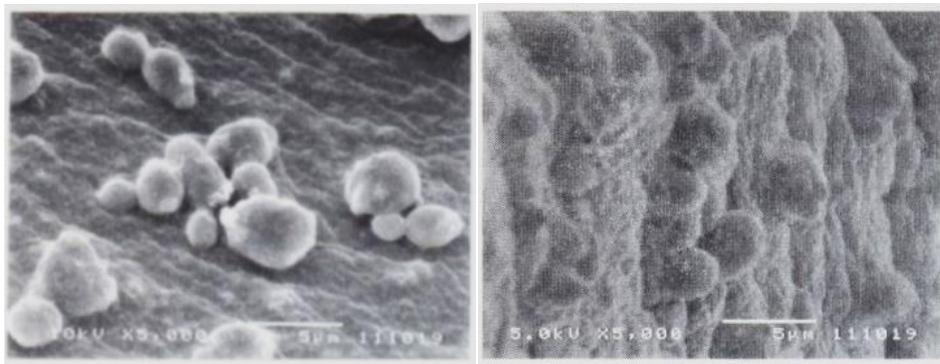


Ilustración 2. Imágenes de SEM de *K.lactis* inmovilizadas en un copolímero de polivinil alcohol (PVA) e hidroxietil metacrilato (HEMA) (El-Batal et al. 2000).

3.3. Hidrogeles en el encapsulamiento de microorganismos para producción de metabolitos

En la búsqueda de mejorar la bioproducción de sustancias como el etanol y el ácido láctico usando microorganismos, se ha estudiado el uso de empaques que permitan inmovilizar células productoras dentro de su matriz, para así mejorar la cantidad de metabolito producido, la viabilidad dentro de los biorreactores y disminuir la cantidad de células que se pierden, y así evitar procesos de recirculación y purificación extras. Casos como el presentado por (Zayed y Zahran 1991), donde se inmovilizaron bacterias productoras de ácido láctico (LAB) de la especie *Lactobacillus casei* en geles de agar, encontraron que inmovilizar las bacterias las protegió del medio ambiente y mejoró la cantidad de ácido producido.

Un segundo ejemplo se puede ver en el trabajo presentado por (Roohina, Mohammadi, y Najafpour 2016), donde se inmovilizaron levaduras de la especie *Kluyveromyces marxianus* en un polímero de carboximetil celulosa (CMC) dentro de un reactor Batch, para la producción continua de etanol mediante la fermentación de desechos lácticos. En este se encontró que propiedades como la alta biocompatibilidad, la capacidad de metabolitos de atravesar la matriz del gel y la absorción de agua ofrecen un gran potencial como medios de inmovilización celular.

También está el caso de la investigación realizada por (de Alteriis et al. 2004), donde se inmovilizaron levaduras de la especie *K.lactis* en empaques de alginato de calcio para la producción de la enzima glucoamilasa dentro de un reactor de lecho fluidizado, usando como sustrato una mezcla de YEB y glucosa. En esta se encontró que el uso de empaques, no sólo mejora la cantidad producida de enzima, sino que permite mayores tiempos de residencia dentro del reactor y mayor viabilidad de las células dentro del lecho.

Por último, el trabajo presentado por (Bajpai y Margaritis 1985), donde se inmovilizaron levaduras de la especie *K.marxianus* en un lecho de gelatina-alginato de calcio entrecruzado con glutaraldehído a una concentración del 0.01 M, se encontró que no había decaimiento de la actividad celular después de 30 días dentro de las células inmovilizadas en gelatina a condiciones de refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente.

3.4. Hidrogeles de gelatina- glutaraldehído

El glutaraldehído es un compuesto de la familia de los aldehídos, el cual se utiliza normalmente (solo o en combinación con otros productos), para la limpieza, desinfección y esterilización de material clínico delicado y de superficies (Farrás, 1997). Aunque desde el punto de vista químico, el glutaraldehído es un producto muy reactivo que se polimeriza en agua, el cual es especialmente estable en pH ácido, mientras que en pH básico este químico es capaz de desnaturalizar proteínas (Farris, Song, y Huang 2009).

El glutaraldehído es usado a menudo en la preparación de hidrogeles de gelatina como agente entrecruzante, ya que este reacciona con los grupos amino del colágeno, lo que permite mejorar la resistencia mecánica y la resistencia al agua de la estructura obtenida, evitando efectos citotóxicos cuando se usa a una concentración muy baja (Farris & Song, 2010). El

mecanismo mostrado en la **ilustración 3** da como resultado la formación de nuevos enlaces covalentes entre las moléculas de gel de gelatina hidrolizado a escala intramolecular (corto alcance) o intermolecular (largo alcance). Los puentes de larga distancia se forman a través de la polimerización del glutaraldehído en solución acuosa o reacción de condensación aldólica como se puede ver en **la ilustración 4**.

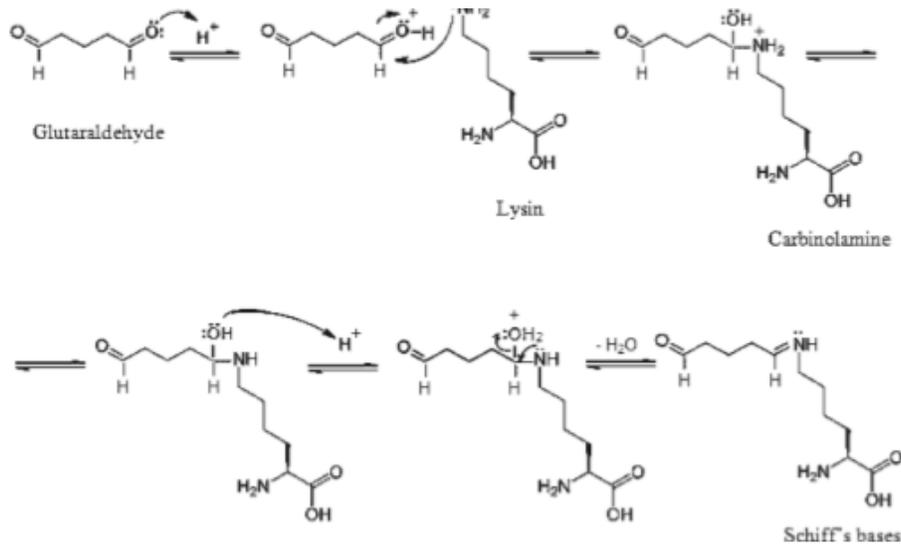


Ilustración 3. Mecanismo de reacción entre grupos amino de lisina y grupos carbonilo de glutaraldehído para la formación de la base de Schiff (Tomado de Farris & Song, 2010).

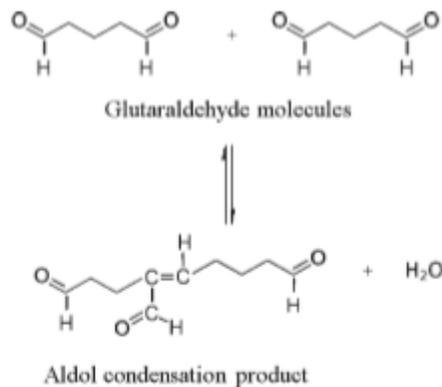


Ilustración 4. Esquema de la reacción de condensación aldólica (Tomado de Farris & Song, 2010).

Debido a sus muchas propiedades únicas, que incluyen hinchamiento/deshinchamiento, efecto de amortiguación, capacidad de respuesta estimulante, rendimiento de biocompatibilidad y adsorción, los hidrogeles de polímeros son prometedores en varios campos, como la ingeniería de tejidos, la administración de fármacos y el tratamiento de aguas residuales (Xiaoqiang & Jia, 2018). Sin embargo, la mayoría de los hidrogeles convencionales son débiles (10kPa) o frágiles con una tenacidad baja (energías de desgarre de 1–10 J/m²), lo que limita

seriamente sus aplicaciones adicionales a los campos con demanda de resistencia mecánica (Xiaoqiang & Jia , 2018).

A pesar de los recientes avances en el diseño de hidrogeles resistentes y duros, todavía es un desafío lograr un constructo de alto módulo compatible con el entorno celular (Jaiswal & Xavier, 2015). Teniendo en cuenta lo anterior, autores como Jaiswal, han propuesto métodos que mejoran de forma eficaz el comportamiento de hidrogeles de colágeno usando concentraciones extremadamente bajas de un agente de refuerzo de nano particulado, el cual actúa como epicentro de entre cruzamiento (Jaiswal & Xavier, 2015).

3.5. Materiales nanocompuestos de grafeno u óxido de grafeno

El óxido de grafeno (GO) ha surgido recientemente como un nuevo material a nanoescala a base de carbono que también proporciona una ruta alternativa al grafeno. La solubilidad del óxido de grafeno en agua y otros solventes permite que se deposite de manera uniforme sobre sustratos de amplio rango en forma de películas delgadas o redes que lo hacen potencialmente útil para la macroelectrónica (Mkhoyan et al. 2009). Debido a que es un material biocompatible y posee propiedades antimicrobianas, además de organizarse a nivel molecular cuando está en la presencia de campos eléctricos, lo cual permite cambiar las cualidades físicas y mecánicas de materiales que contienen GO, lo anterior lo hace un candidato para el uso médico(Mkhoyan et al. 2009)

El óxido de grafeno es un aislante, pero la reducción controlada proporciona la capacidad de ajuste de las propiedades electrónicas y mecánicas, incluida la posibilidad de acceder al grafeno de banda cero mediante la eliminación completa de los enlaces C-O. La estructura de GO a menudo se supone de manera simplista que es una lámina de grafeno unida a oxígeno en forma de grupos carboxilo, hidroxilo o epoxi (Mkhoyan et al. 2009)

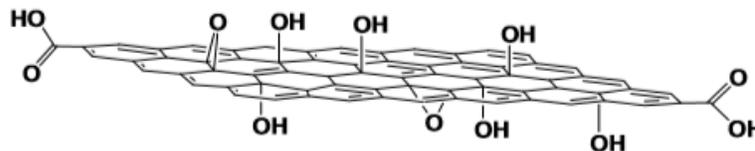


Ilustración 5. Estructura del Oxido de grafeno (GO) (Yongzhe, 2017)

Una de las aplicaciones mas estudiadas sobre el uso del GO, es el entrecruzamiento con otros materiales para aumentar su estabilidad estructural, como en el caso expuesto por Ghorai (Ghorai et al. 2019), el cual mejora las propiedades mecánicas de scaffolds de hidroxapatita, poliuretano y espermina, haciendo uso de GO en el material (Ghorai et al. 2019). Ya que en dosis bajas no es tóxico para los osteoblastos y aumenta la capacidad de mineralización de apatita, aunque en la mayoría de artículos se ha agregado una cantidad relativamente alta de GO que corresponde entre el 1-10% del peso total del material (Ghorai et al. 2019)

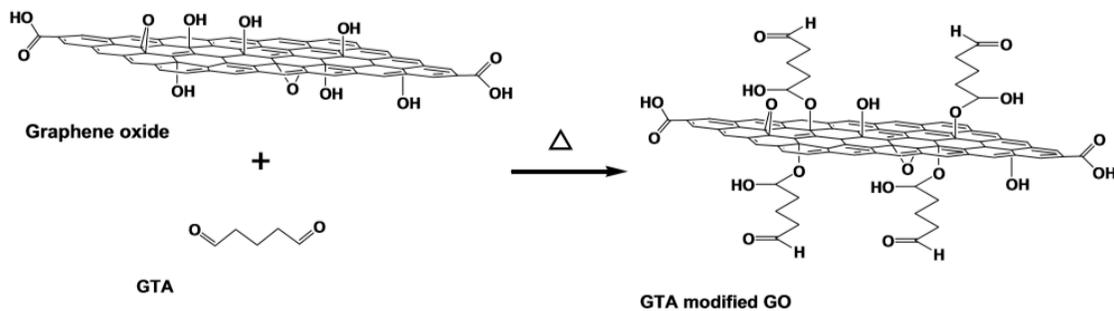


Ilustración 6. Mecanismo de enlace entre el óxido de grafeno (GO) y el glutaraldehído (GTA) (Yongzhe, Synthesis and mechanical properties of double cross-linked gelatin-graphene oxide hydrogels, 2017)

3.6. Biocompatibilidad de nanocompuestos de óxido de grafeno

En estudios como el realizado por (Marrella et al. 2017), en donde se analiza un material de alginato-GO, se ha observado que existe una mejora significativa en la viabilidad celular dentro de los nanocompuestos de GO, además de la ausencia de síntomas citotóxicos por parte de las hojas de GO suspendidas en el hidrogel. Otro caso es expuesto por (Cha et al. 2014), en donde el autor realiza un análisis sobre hidrogeles de gelatina-GO, donde encuentra que no sólo mejora propiedades como la resistencia e integridad física en los hidrogeles, sino que observa que existe una mejora en la viabilidad y la proliferación celular llegando a valores de viabilidad cercanos al 100%.

En la encapsulación de microorganismos como levaduras y bacterias, tenemos el ejemplo presentado por Karnit Bahartan, en donde se realiza el encapsulamiento de la levadura productora de etanol *Saccharomyces cerevisiae* en un hidrogel de GO, donde se encontró que los microorganismos sobrevivieron y crecieron en el GO durante 15 días, y que su actividad bio catalítica se mantuvo durante el mismo periodo de tiempo (Bahartan et al. 2012).

Otro estudio es presentado por Sung Ho Yang, en donde se realiza el encapsulamiento de levaduras, usando óxido de grafeno reducido (rGO), en donde las nano hojas de GO con cargas opuestas se revuelven alternativamente sobre las células de levadura individuales mientras se preserva la viabilidad de la levadura, lo que proporciona un medio de interconexión entre el grafeno y las células de levadura vivas (S. H. Yang et al. 2012). Este enfoque se expande integrando otros polímeros orgánicos o nanopartículas inorgánicas a las células hibridando las entradas con nanopartículas GO (Bahartan et al. 2012; S. H. Yang et al. 2012). Está demostrado que las nanopartículas de óxido de hierro incorporadas pueden proporcionar propiedades magnéticas a los sistemas biológicos, permitiendo la integración de nuevas funciones físicas y químicas para las células vivas con una combinación de nano hojas de GO (Bahartan et al. 2012; S. H. Yang et al. 2012).

4. Materiales y Metodología

4.1. Materiales

Para la fabricación de los hidrogeles se usó gelatina tipo A, los cuales se entrecruzaron químicamente glutaraldehído al 25%; para el refuerzo del hidrogel se hizo uso de el óxido de grafeno (GO), el cual se obtuvo usando el método establecido en el departamento de ingeniería biomédica; en la realización de las pruebas de integridad y viabilidad, se usó YNB (base nitrogenada de levadura), lactosa y L-histidina para la fabricación del medio donde se pusieron los microorganismos a crecer; Para la tinción de las levaduras se usó yoduro de propidio y estas se lavaron con PBS (buffer de solución salina). Por último, se hizo uso de impresión 3D en la impresora de la marca Makerbot del departamento de ingeniería biomédica y el material de impresión fue PLA color naranja de la misma marca.

4.2. Metodología

4.2.1. Biorreactor de bajo costo

El biorreactor que se puso en marcha para realizar las pruebas de estabilidad, integridad física y viabilidad consistió en un sistema cerrado con una base impresa en 3D usando como material PLA, en la parte superior se recirculaba el aire, por medio de un tubo plástico, el cual estaba incrustado en la tapa superior. La base inferior, poseía un agujero por el cual se podía inyectar el aire/nitrógeno, para burbujear y agitar los empaques fabricados (Patarroyo 2019). El biorreactor se puede ver en la **ilustración 7**. Para las pruebas de integridad se usaron discos de 1 cm de radio por 1 cm de altura, mientras que las pruebas de viabilidad se usaron semi esferas de 2 cm de diámetro.

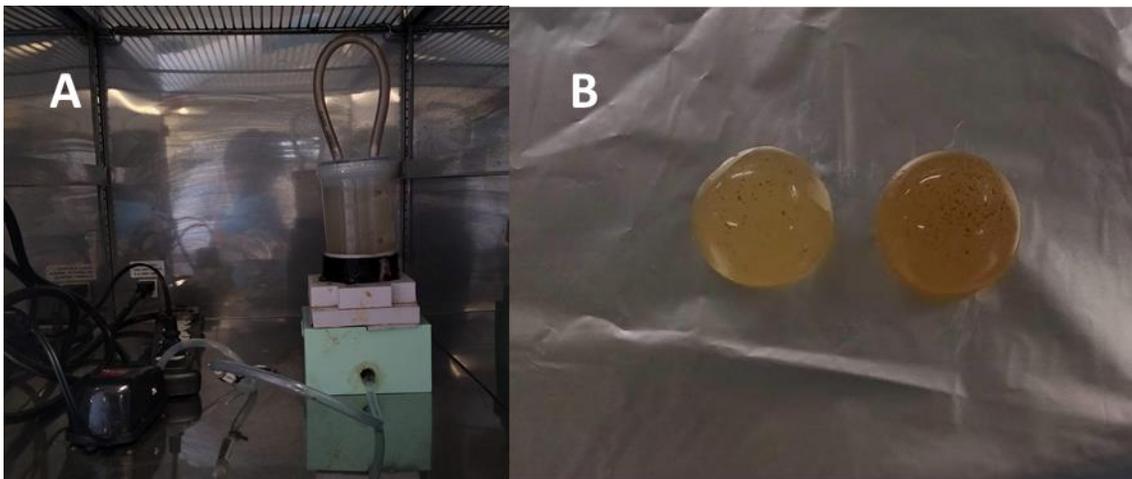


Ilustración 7. A) Biorreactor usado en la experimentación dentro de la incubadora a 32°C y B) geometría de las semiesferas de gelatina-GO.

4.2.2. Fabricación de los geles

Para la fabricación de los geles se hace uso de gelatina como matriz estructural, óxido de grafeno como material de refuerzo y glutaraldehído como entrecruzante entre fibras de colágeno y el GO. En la **ilustración 8** se puede observar el proceso de fabricación de los hidrogeles.

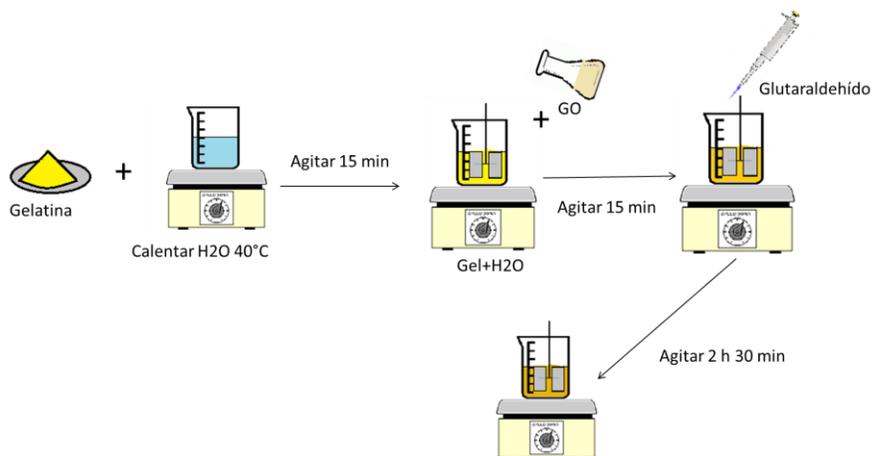


Ilustración 8. Protocolo de fabricación de hidrogeles gelatina-óxido de grafeno

El orden de adición de los componentes se determinó usando como base el protocolo de fabricación de Jorge Patarroyo, el cual es diluir la gelatina y luego entrecruzarla químicamente con el glutaraldehído, pero para asegurar que el GO también se entrecruce con la gelatina se adicione antes del glutaraldehído.

Para el diseño experimental se fabricaron 3 geles variando la concentración del GO en las muestras, manteniendo la concentración de glutaraldehído y gelatina expuestas como las adecuadas en la investigación de Jorge Patarroyo (Patarroyo 2019), y el GO se mantuvo a bajas concentraciones teniendo en cuenta que a concentraciones superiores a 0.3 mg/mL puede llegar a cambiar de forma negativa condiciones de viabilidad e hinchamiento (Huang et al. 2012; Patarroyo 2019; Yan et al. 2018), las composiciones de estos geles se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones de nanocompuestos de gelatina-GO (óxido de grafeno)

Gel	Concentración de glutaraldehído (% w/w)	Concentración de colágeno (%w/w Total)	Concentración de GO (mg/mL)
Blanco	3	7.5	0
Formulación 1			0,1

Formulación 2			0,2
----------------------	--	--	-----

4.2.3. Pruebas de mecánicas e integridad física

4.2.3.1. Hinchamiento:

En las pruebas de integridad física, se realiza un protocolo de experimentación simulando las condiciones en el biorreactor a pH ácidos y básicos. Para lo anterior, se genera el diseño experimental que se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de experimentación para las pruebas de integridad física

Concentración de GO (mg/ml)	pH
0	3
	7
	10
0,1	3
	7
	10
0,2	3
	7
	10

El diseño experimental tiene evalúa las 3 concentraciones de GO a 3 niveles de pH, para un total de nueve experimentos, lo cuales tienen replica por triplicado. La experimentación consiste en medir el hinchamiento del gel a las 24 horas tomando el peso del gel antes y después de someterse a la solución dentro de una incubadora, las muestras se pasaron por papel de arroz antes de pesar, para evitar el exceso de agua en la muestra. Las soluciones se prepararon usando HCL para la solución a pH 3, NaOH para la solución a pH 10 y se usó agua tipo II para la solución a pH 7. En la **ilustración 9**, se puede observar de forma resumida el protocolo de evaluación de hinchamiento.

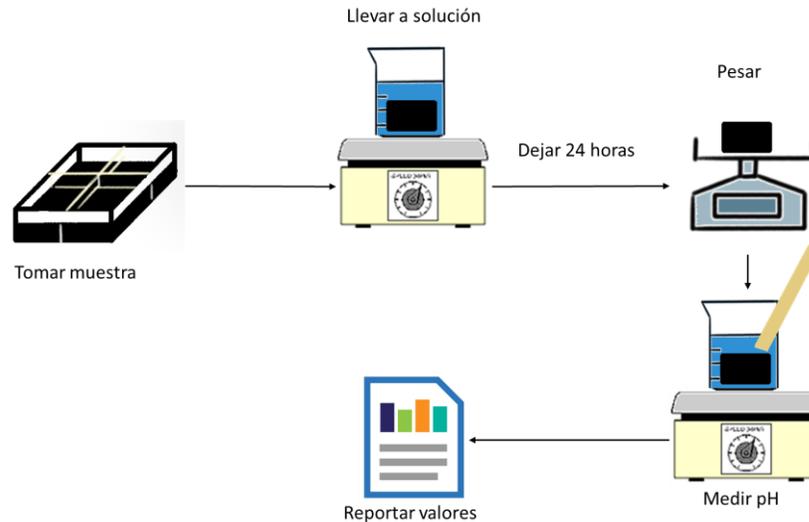


Ilustración 9. Protocolo de experimentación de las pruebas de hinchamiento

4.2.3.2. Reometría

Se realizó un análisis reológico para observar los cambios en la rigidez del material debido al entrecruzamiento entre el glutaraldehído-Gelatina-GO, y determinar la solidez de los geles. En este estudio, se realizó un barrido en frecuencia, en el cual observamos el módulo de almacenamiento (G') y de pérdida (G''). El procedimiento se realiza a 25°C , a un esfuerzo de 1000 Pa, con un rango de frecuencias de 0.1-100 rad/s; se preparó un disco de la muestra de 2 cm de diámetro y 1 mm de espesor. El equipo usado es el reómetro *Discovery HR-1*, con una geometría de platos paralelos.



Ilustración 10. Test reométrico de platos paralelos.

4.2.3.3. Texturometria (test de firmeza):

Se realizó una prueba usando el texturometro *TA. HD plus C*, con el fin de analizar la integridad física de los geles, cuando son sometidos a las condiciones presentadas dentro del reactor, las cuales son:

- Temperatura= 30°C
- pH=5,5 - 6.
- Con burbujeo constante

El intervalo de evaluación se determina teniendo en cuenta el tiempo que el hidrogel tendrá que durar dentro del biorreactor, que en este caso son 72 horas. En la **ilustración 11**, se puede observar cómo se realiza esta experimentación.

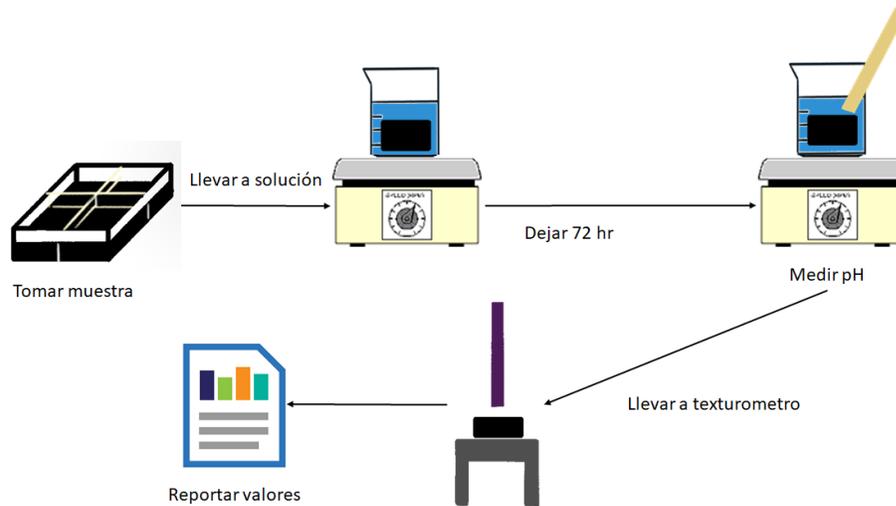


Ilustración 11. Preparación de muestras y prueba de firmeza

El protocolo de experimentación se basa en el proceso de medición de firmeza, el cual es usado para realizar mediciones de compresibilidad en geles para el cultivo de microorganismos, el cual es una prueba que se encuentra estandarizada dentro del equipo *TA-XT plus*, además también es usado para analizar la degradación en geles de alginato en el trabajo de Oju Jeon (Jeon et al. 2009). En este protocolo, se fabrican discos de 2 cm de diámetro y 10 mm de espesor, los cuales son llevados al texturometro *TA-XT plus* usando la geometría de cilindro ancho, en las fotos mostradas en la **ilustración 12**, se ve el desarrollo y fabricación de los discos necesarios para esta prueba

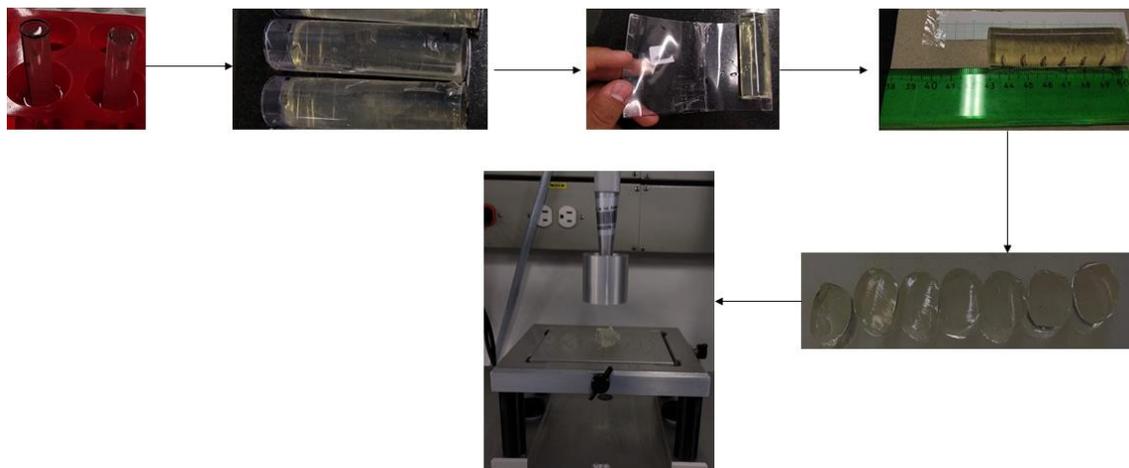


Ilustración 12. Protocolo de fabricación de discos para la prueba de firmeza para antes y después del reactor

Otros discos se llevaron al reactor durante las 72 hrs, y se realizó de nuevo el protocolo presentado en las **ilustraciones 11 y 12**. Lo anterior se puede ver en la **ilustración 13**.



Ilustración 13. Montaje del reactor con los discos de hidrogel Gelatina-GO

Cabe aclarar que el reactor estuvo dentro de una incubadora a 30°C y fue burbujeado durante la totalidad de la prueba, además el medio donde los geles se colocan consiste en una solución de YNB (extracto de levadura) con lactosa, glucosa y L-histidina, suspendidas en agua tipo 2 previamente auto clavada, para evitar contaminación dentro del reactor. Las concentraciones de la solución se presentan en la **tabla 3**.

Tabla 3. Concentración de componentes en medio de cultivo para la evaluación de hidrogeles gelatina-GO

Sustancia	Concentración en g/L
YNB	6.8
Lactosa	20
Glucosa	20
L-histidina	0,02

Los resultados reportados, presentan los valores de las curvas de firmeza, y se encuentra el módulo elástico a compresión, usando los valores de deformación hasta un 10% y luego realizando una regresión lineal sobre los valores, la pendiente de esta regresión es el valor del módulo de compresión.

4.2.4. TGA y DTG (termogravimetría)

Un análisis termogravimétrico o TGA por sus siglas en inglés, es un proceso experimental, en el cual se observa el cambio en el peso de distintos materiales como función de la temperatura. En el proceso de evaluación de integridad física y caracterización de los hidrogeles, estudiar el perfil térmico de los geles nos mostró el efecto del GO dentro del hidrogel. Esta prueba también se hizo para el material expuesto al reactor durante 72 horas lo cual nos mostró información sobre los cambios que provoca el ambiente del reactor dentro de las muestras de estudio. Este estudio se realizó con el equipo de análisis TGA Q600 TA

instruments, desde los 24°C hasta los 500°C, con una rampa de 10°C/min y una atmosfera de aire. También se hizo el análisis del DTG (análisis termogravimétrico diferencial), el cual es la derivada del TGA, para complementar el análisis y observar a que temperatura se dan los picos de perdida de masa.

4.2.5. Porosidad de los geles

En este estudio analizamos la morfología microscópica de los geles y su variación con la presencia de GO. Para lo anterior, se usa la microscopia electrónica de barrido o SEM, con la cual analizamos el tamaño de poro del gel a un aumento de 1000x tomando entre 5 y 6 imágenes por muestra. Cabe aclarar, que en este protocolo de experimentación se hace uso de una platina de enfriamiento, para mantener los geles solidos sin perder humedad. Para realizar el análisis de estas imágenes se hizo uso del programa ImageJ.

Para medir los poros en ImageJ, se usó la medida estándar en cada imagen, luego usando la equivalencia de pixeles a micras, se media desde los puntos lejanos en las estructuras presentes, y ese se tomaba como el tamaño de poro en la estructura. En la ilustración 14 b, se puede observar el cómo se media el tamaño de poro.

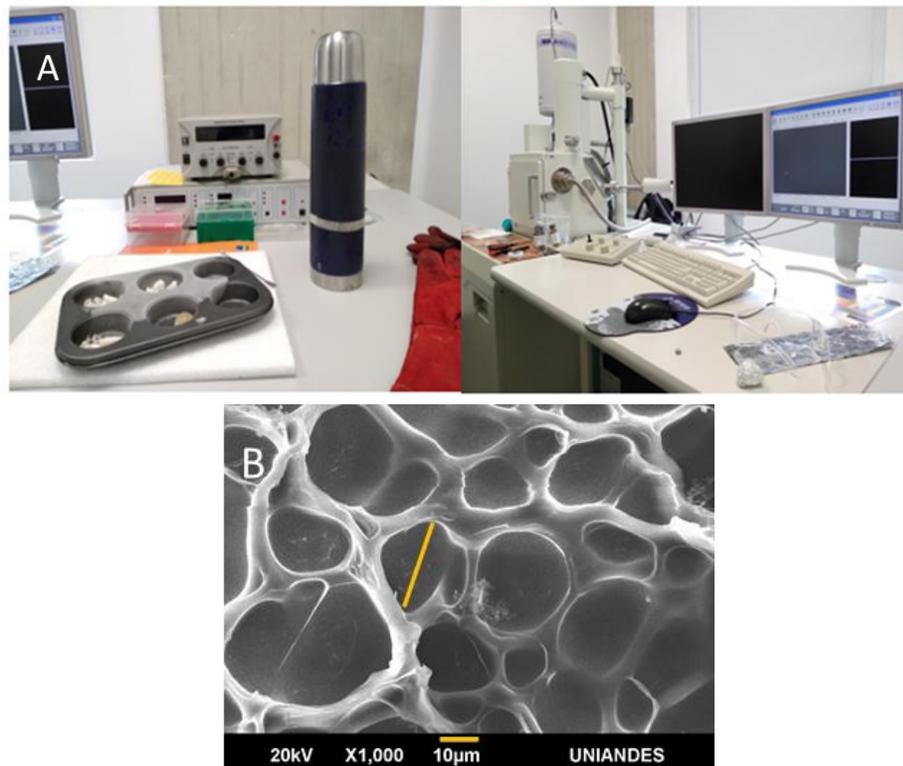


Ilustración 14 . A) Equipo de SEM e implementos usados para el manejo de los hidrogeles y **B)** imagen demostrativa ImageJ.

4.2.6. Pruebas de viabilidad en los geles

Para evaluar la viabilidad, las células dentro de la matriz se tiñeron con yoduro de propidio el cual solo tiñe células muertas y se observaron bajo el microscopio confocal, luego se contaron para estimar la relación muerto/totales, usando la ecuación 1 se calcula la viabilidad.

$$Viabilidad (\%) = 100 \% - Mortalidad(\%) \text{ Ec. 1}$$

Para preparar las muestras, se hicieron secciones transversales finas de cada hidrogel, a las que se aplicó una solución de yoduro de propidio 1:10 como marcador fluorescente, la muestras se incubaron durante 30 minutos; Luego, se lavaron dos veces con solución de PBS, para remover el excedente de yoduro de propidio; La adquisición de imágenes se realizó en el microscopio de escaneo láser confocal Olympus FV1000; Finalmente, el conteo de células se realizó usando el software de análisis de imágenes ImageJ. Este procedimiento se hizo para las muestras antes y después de su exposición en el biorreactor.

4.2.7. FTIR Espectroscopia por transformada de Fourier

Las pruebas de FTIR se realizaron para observar la presencia de los enlaces que comúnmente se encuentran en los hidrogeles de gelatina-GO, los cuales permiten caracterizar la muestra y analizar el entrecruzamiento de los geles. El espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se obtuvo por el espectrofotómetro ALPHA-Eco (FT-IR) en el rango de 4000 a 600 cm^{-1} (Patarroyo 2019). La medida de referencia fue agua tipo I.

4.2.8. HPLC cromatografía líquida de alta resolución

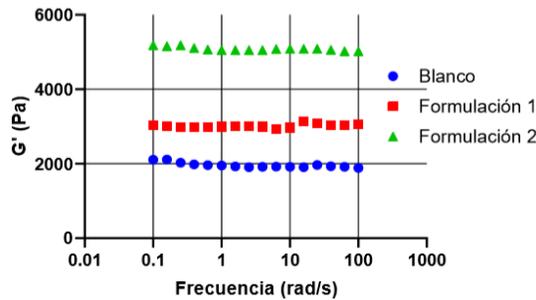
Se usó una columna Aminex HPX-87H para la detección de ácidos orgánicos, azúcares y alcoholes con ácido sulfúrico 5 mM, en solución con agua tipo I como fase móvil con flujo de elución de 0,6 ml / min. La fase móvil se filtró con vacío usando un filtro de 0,22 μm y posteriormente se desgasificó en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Se prepararon soluciones estándar para cuantificar los metabolitos producidos (Patarroyo 2019). Las soluciones estándar y las muestras para analizar se filtraron con un filtro de jeringa de 0,22 μm . Finalmente, aproximadamente 1,5 ml de las soluciones se transfirieron a viales para su análisis en el equipo (Patarroyo 2019).

5. Resultados

5.1.1. Reometría

Con las pruebas reométricas se buscaba evaluar los cambios en los módulos de almacenamiento y pérdida, debido al entrecruzamiento con el GO, en estas se encontraron valores de módulo más altos para los geles que tenían una mayor cantidad de GO, lo cual se puede ver en la **ilustración 15**.

A Módulo de almacenamiento de hidrogeles para distintas cantidades de GO



B Módulo de pérdida de hidrogeles para distintas cantidades de GO

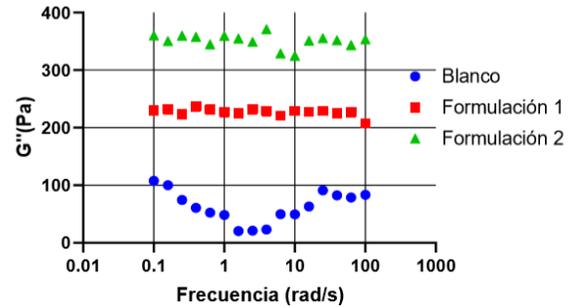


Ilustración 15. A) Módulo de almacenamiento y B) Módulo de pérdida, para distintas composiciones de GO

5.1.2. Hinchamiento

En las pruebas de hinchamiento se realizaron 3 réplicas por valor de pH y se extendieron hasta las 24 horas de evaluación, en la **ilustración 16**, se pueden observar los resultados de las pruebas de hinchamiento, por valor de pH y por formulación de GO dentro de los geles.

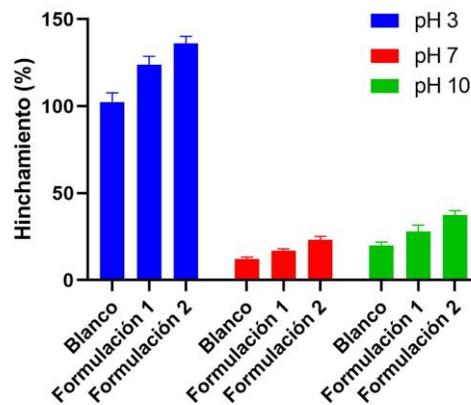


Ilustración 16. Valores de hinchamiento, después de 24 horas a distintos valores de pH

En la imagen anterior podemos observar que, para valores iguales o por encima de pH 7, el valor de hinchamiento es bajo, mientras que para valores de pH cercanos a 3 se logran valores de hinchamiento más altos, partiendo de valores promedio del 12% para pH 7, subiendo hasta un 120% a pH 3 y bajando de nuevo a 28% en pH 10.

Además, podemos ver que el agregar GO aumenta la cantidad de solución absorbida por el material, llegando a valores en promedio para la formulación 1 del 124% y para la formulación 2 del 136%, con respecto al blanco el cual logra valores del 102% a pH 3. Este fenómeno también se puede observar para los otros valores de pH. En el caso de

la solución a pH 7, pasando de un 12% en el blanco a un 23 % en la formulación 2, y en la solución a pH 10, yendo de un 19,9% en el blanco a un 30% en la formulación 2.

5.1.3. Textuometria

En esta prueba se compararon los valores de firmeza de geles a diferentes valores de óxido de grafeno (blanco, formulación 1 y formulación 2). Por medio de esta prueba, también se realizó el análisis de los geles a las 0 horas y a las 72 horas dentro del reactor, y de esta manera se observó la disminución de la fuerza de compresión de los geles antes y después de estar en el reactor. Estas gráficas se pueden observar en la **ilustración 17**.

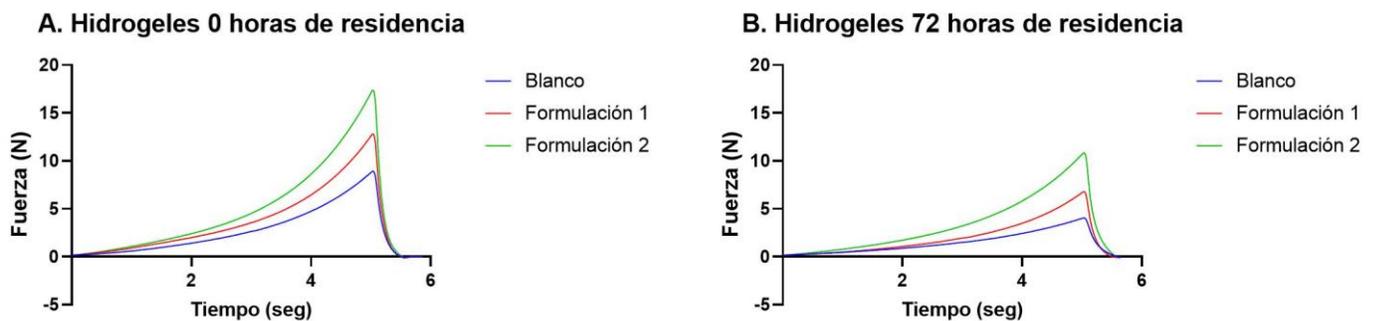


Ilustración 17. Resultados de la prueba de firmeza a diferentes concentraciones de GO, A) 0 horas y B) 72 horas

En las pruebas de firmeza, se puede ver que el valor disminuye con el tiempo de residencia dentro del reactor. Pasando de 17 N a 12 N para la formulación 2. Además, podemos observar que entre más grafeno haya, mas firme es el gel, pasando de un valor de 8 N para los blancos a valores de 17 N para los geles con GO. Por último, se puede observar que el valor de firmeza baja con la residencia en el reactor, en un 50% para los blancos, en un 40% en caso de la formulación 1 y en un 30 % para la formulación 2.

También se realizó el estudio del módulo de elasticidad a compresión de los geles, los cuales se analizan tomando los datos de esfuerzo vs deformación hasta llegar a un valor del 10% de deformación, para obtener el valor del módulo se realiza una regresión lineal sobre los datos. Este análisis se hace para los geles antes y después de someterse al ambiente del reactor. En la **ilustración 18**, se puede observar las graficas con sus respectivas regresiones.

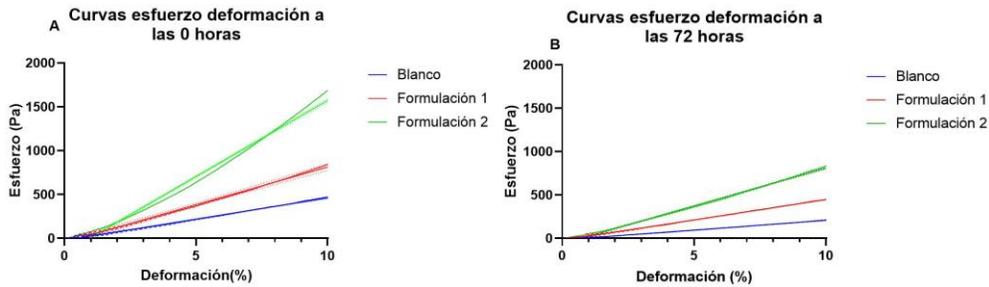


Ilustración 18. Curvas de esfuerzo deformación a compresión con diferentes cantidades de GO A) 0 horas y B) 72 horas.

Los valores de esfuerzo se obtuvieron dividiendo el valor de las curvas de firmeza sobre el área transversal de los discos. Los discos tienen un radio de aproximadamente 1 cm con una altura de 1 cm, por lo tanto, su área transversal es de 3.14 cm^2 .

La comparativa entre los valores de módulos se pueden ver en la **ilustración 19**. En donde podemos observar que los valores de estos módulos bajan con el tiempo de residencia dentro del reactor, llegando a bajar en promedio casi un 50 % con respecto a los discos que no fueron sometidos al reactor

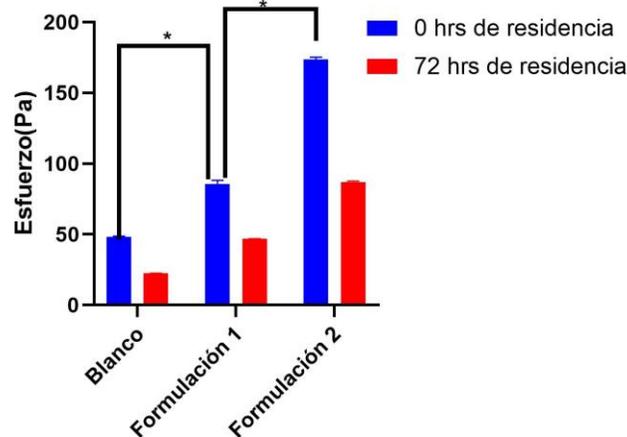


Ilustración 19. Valores del módulo elástico a compresión para distintas concentraciones de GO, para 0 y 72 horas de residencia dentro del reactor (N=3), p-value = 0.05

5.1.4. TGA y DSC

En el protocolo de TGA-DSC se analizaron las muestras antes y después de ser sometidos al ambiente del reactor, los resultados de la experimentación se pueden observar en las **ilustraciones 20 a, 20 b, 20 c, 20 d, 20 e y 20 f**.

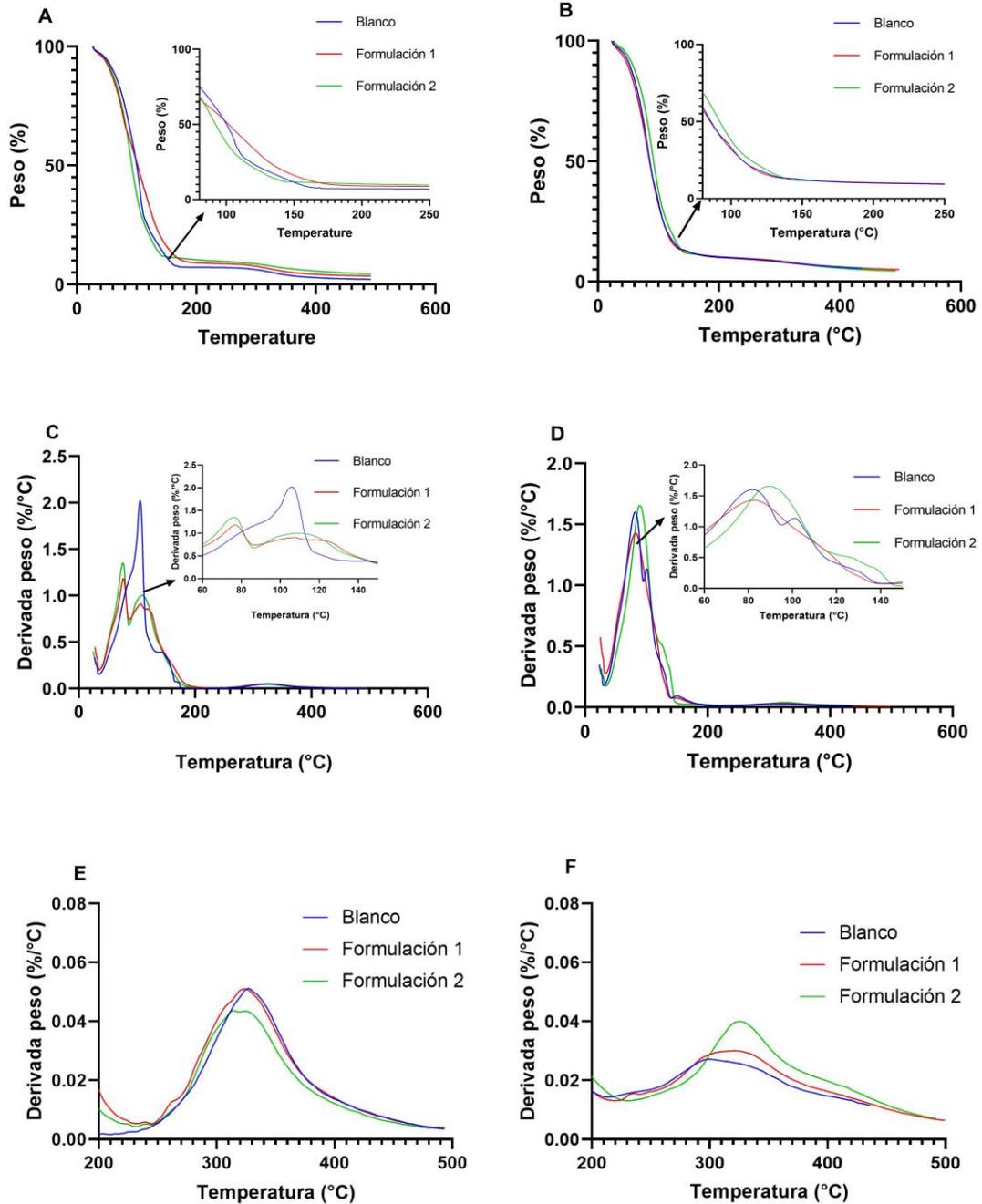


Ilustración 20. Resultados del TGA y del DTG para diferentes composiciones de GO A) TGA 0 horas, B) TGA 72 horas, C) DTG 0 horas, D) DTG 72 horas, E) DTG 0 horas entre 200-500°C y F) DTG 72 horas entre 200-500°C

En el TGA a las 0 horas podemos ver que después de los 200°C, las formulaciones 1 y 2 perdieron menos masa que el blanco. Además, en el DTG podemos ver que para las 0 horas presentamos dos picos para las formulaciones 1 y 2 antes de los 120 °C, mientras que en el caso del blanco solo se presenta un pico a los 100 °C, también se puede observar que tenemos un pico a los 300 °C que es similar para las 2 formulaciones y el blanco.

En el caso de las 72 horas, en el TGA se obtienen comportamientos parecidos llegando a perder la misma cantidad de masa para las formulaciones 1 y 2, y para el blanco. Observando el DTG para las 72 horas, podemos observar la presencia de un solo pico antes de los 120°C para los tres casos, en donde el pico se desplaza hacia la derecha al aumentar la cantidad de GO en las formulaciones, además se observó que el pico de los 300°C se mantuvo constante para la formulación 2, pero se desplazó hacia la izquierda en el blanco y en la formulación 1.

5.1.5. Porosidad de los geles

En la **ilustración 21**, podemos observar las imágenes del SEM para los hidrogeles a distintas composiciones.

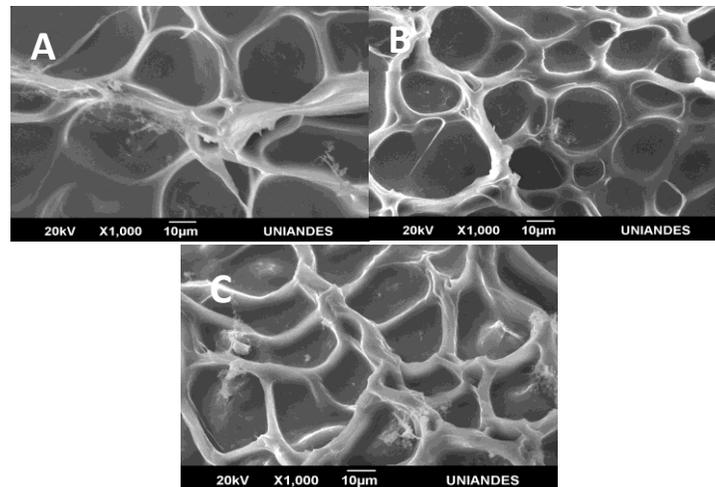


Ilustración 21. Imágenes del SEM para las diferentes muestras, A) Blanco, B) GO 0.1 mg/mL y C) GO 0.2 mg/mL.

Los resultados del análisis en ImageJ mostraron una disminución en el tamaño de poro a medida que aumentaba la cantidad de GO en las formulaciones, en la **ilustración 22** se puede ver con más claridad los resultados de porosidad para las distintas formulaciones.

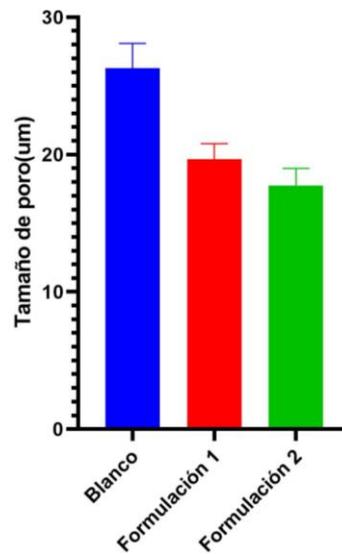


Ilustración 22. Resultados de porosidad para los geles a diferentes concentraciones de GO los valores representan la media y la desviación estándar (N=5).

En esta gráfica observamos una disminución de aproximadamente un 49% en el tamaño promedio de poro entre el blanco y la formulación 1, mientras que en el caso de la formulación 2 el tamaño promedio de poro disminuyó en un 9.76% con respecto a la formulación 1.

5.1.6. Viabilidad celular

Para las pruebas de viabilidad, se realizó primero un análisis usando SEM, para observar las levaduras *K.lactis* dentro de la matriz del hidrogel.

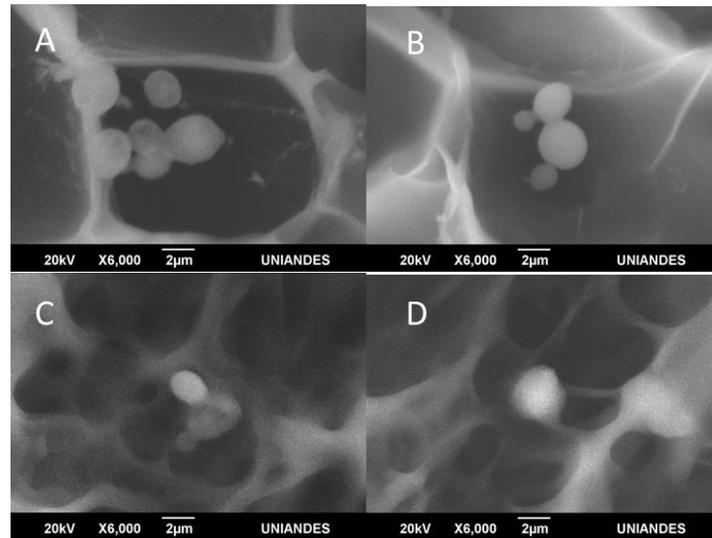


Ilustración 23. Imágenes de las levaduras *K.Lactis* dentro de los hidrogeles usando SEM para diferentes concentraciones de GO, A) 0.1 mg/mL 0 horas, B) A) 0.2 mg/mL 0 horas, C) 0.1 mg/mL 72 horas y D) 0.2 mg/mL 72 horas .

En la **ilustración 23**, podemos observar cómo las células se posicionan sobre la matriz del hidrogel agrupándose en los bordes de los poros, además de observar que el tamaño de las levaduras esta entre 3-5 μm .

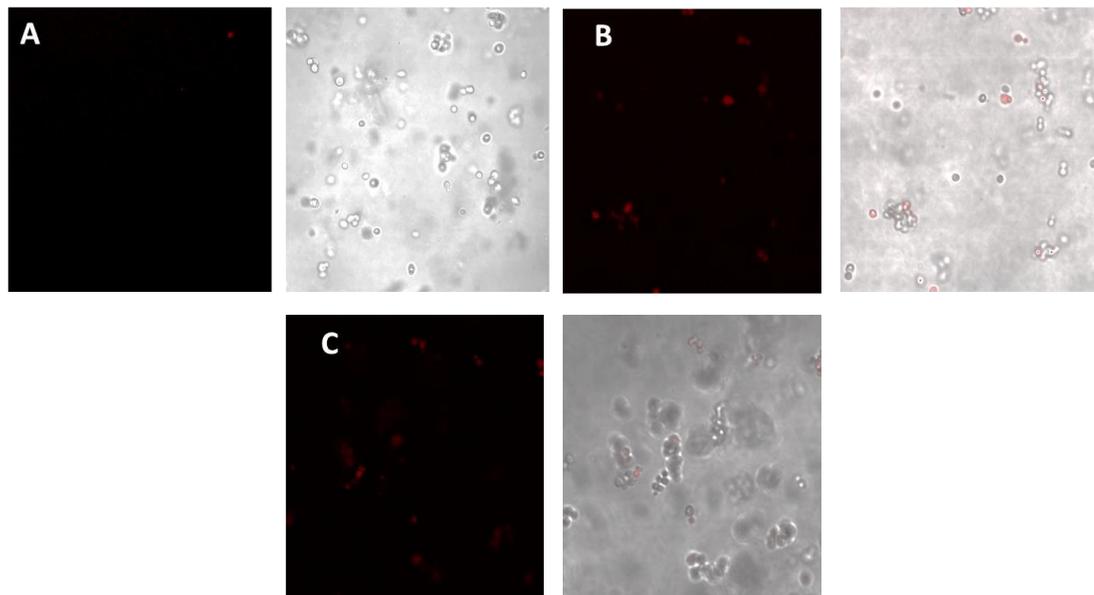


Ilustración 24. Imágenes del microscopio confocal para levadura *K.lactis* a 0 hrs de residencia dentro del biorreactor A) 0 mg /mL, B) 0.1 mg/mL GO y C) 0.2 mg/mL GO.

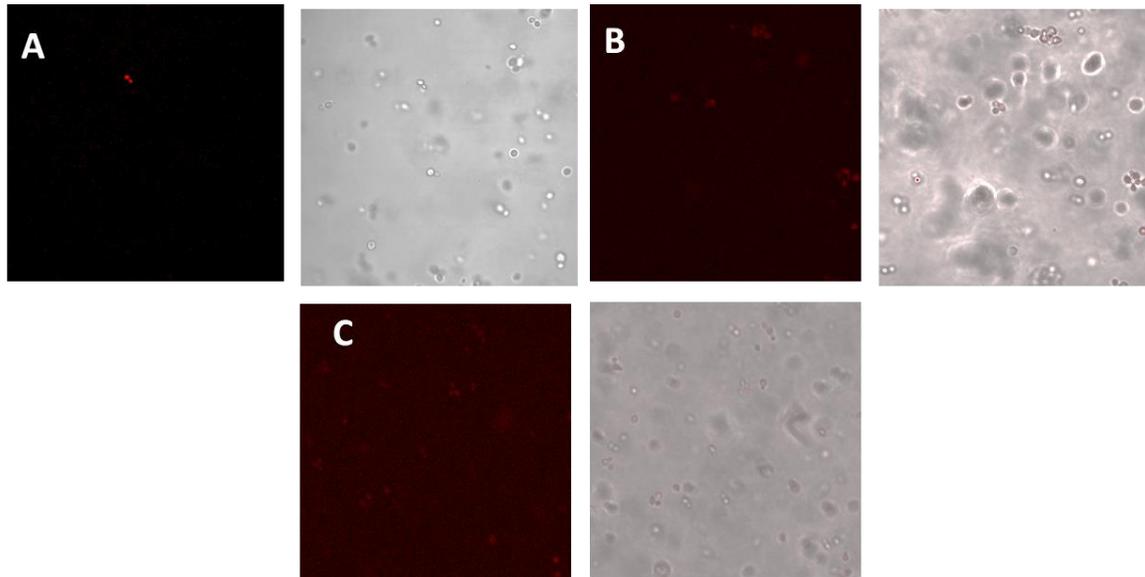


Ilustración 25. Imágenes del microscopio confocal para levadura *K.lactis* a 72 hrs de residencia dentro del biorreactor A) 0 mg /mL, B) 0.1 mg/mL GO y C) 0.2 mg/mL GO.

En las ilustraciones 24 y 25, podemos observar las imágenes del microscopio confocal para distintos tiempos de residencia en el reactor, en estas podemos observar de color rojo las células muertas y en tono *gamma* la totalidad de las células.

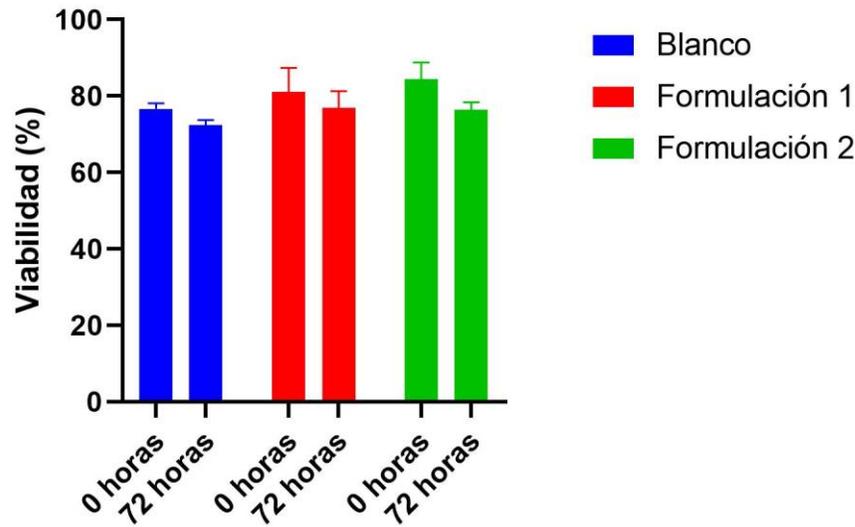


Ilustración 26. Resultados de viabilidad para los geles a diferentes concentraciones de GO los valores representan la media y la desviación estándar (N=3). El análisis se realizó usando el software Graphpad con un p-value de 0.05

En la **ilustración 26**, podemos observar los resultados de viabilidad para las diferentes formulaciones antes y después de estar en el reactor, en donde podemos observar que al inicio la viabilidad similar entre las formulaciones 1 y 2 con respecto al blanco, con una diferencia de entre un 6% y 10% respectivamente. Luego de las 72 horas de residencia dentro del reactor, podemos observar que los valores de viabilidad decaen, pero la tendencia entre las formulaciones 1 y 2 se mantiene con respecto al blanco, aunque disminuye con respecto las muestras a las 0 horas, aunque en este caso las viabilidades finales son cercanas entre las 2 formulaciones y el blanco.

5.1.7. FTIR

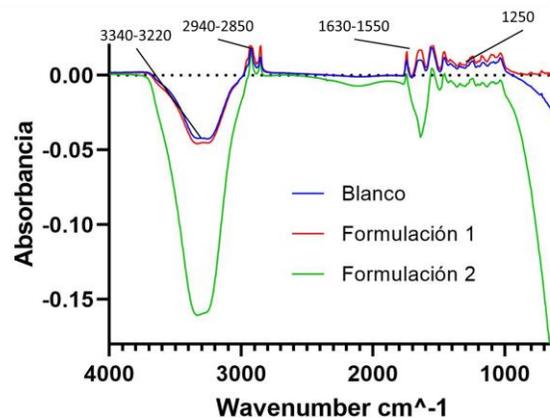


Ilustración 27. Resultados FT-IR, para los hidrogeles de gelatina-GO.

En la **ilustración 27** se puede observar los datos del FT-IR obtenidos para los hidrogeles luego de ser preparados. Los picos observados entre 1630 y 1550 cm^{-1} corresponden a vibraciones de enlaces $\text{C} = \text{O}$, asociadas a residuos de glutaraldehído que permanecieron sin reaccionar, así como a $\text{C} = \text{N}$ que está directamente relacionado con la vibración del grupo imina, como se puede ver en la formulación 2 los enlaces $\text{C}=\text{O}$ no están presentes. Los pequeños picos observados entre 2940 y 2850 cm^{-1} pueden estar asociados con las vibraciones del enlace $\text{C}-\text{H}$ que está presente en toda la cadena de gelatina, así como el complejo generado por la reacción de entrecruzamiento, el cual está presente en las 2 formulaciones y en el blanco. Los picos que sobresalen entre 3340 y 3220 cm^{-1} pueden asociarse con el enlace $\text{N}-\text{H}$ de los grupos amina libres en los terminales de la estructura de gelatina, es decir, la gelatina que permaneció sin reaccionar. Finalmente, el pico identificado a 1245 cm^{-1} puede estar relacionado con el enlace $\text{C}-\text{N}$, también dada la formación de los enlaces imina y el grupo amino que mantiene su conformación original (Castellanos 2017; Patarroyo 2019).

5.1.8. HPLC

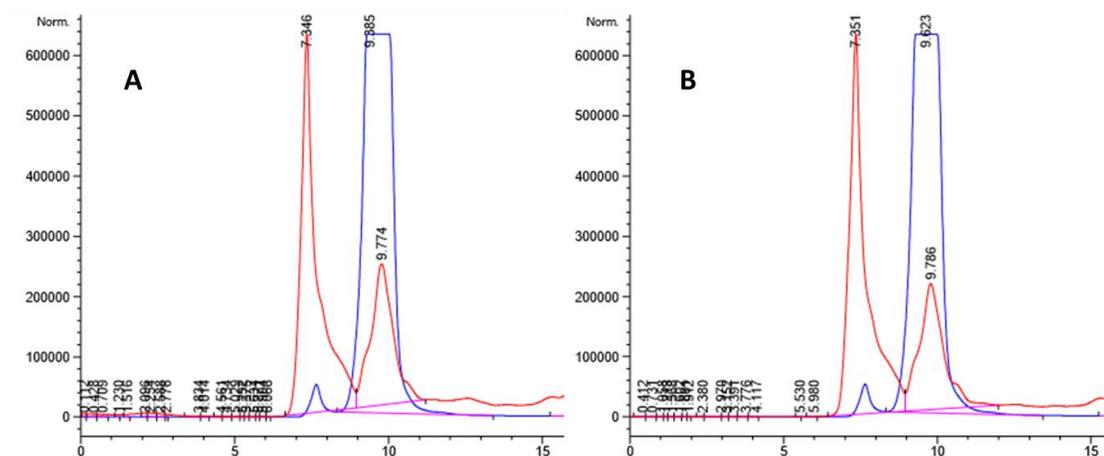


Ilustración 28. Datos obtenidos en el HPLC después de 72 horas de producción, A) GO 0.1 mg/mL y B) GO 0.2 mg/mL .

En la **ilustración 28**, se pueden observar los datos del HPLC para después de las 72 horas en el reactor; en estos podemos ver que para las dos formulaciones de GO existe un primer pico a los 7.345, para la formulación 1 y en 7.351, para la formulación 2; luego se encuentran otros dos picos aproximadamente a 9.774 para la formulación 1 y 9.766 para la formulación 2. Cabe aclarar que los estándares de esta prueba fueron tomados del trabajo previo realizado por el equipo de investigación de materiales (Patarroyo 2019).

6. Discusión de resultados

En los resultados reométricos podemos encontrar que el comportamiento muestra que existe un mayor nivel de rigidez a medida que aumenta la cantidad de GO, esto se puede deber al refuerzo que realiza el GO presente en el hidrogel (Cha et al. 2014), por lo que con los

resultados de reometría podemos decir que los geles son más sólidos a medida que aumenta el GO.

Con respecto a los resultados del test de hinchamiento, se puede decir que el comportamiento del hidrogel a medida que cambia el pH es acorde a lo observado en literatura, ya que este fenómeno del cambio de hinchamiento con el pH se usa mucho en hidrogeles diseñados para cambiar sus propiedades de acuerdo al medio en donde se encuentran (Piao y Chen 2015; Schott 1992); también se puede observar, que en pH 7 el hinchamiento es menor que a pH ácido o básico, esto se puede deber al punto isoeléctrico de la gelatina tipo A, el cual está entre 7-9.4 (Poppe 1992), por lo cual la gelatina tiene carga 0 y no puede atraer iones con distintas cargas, por lo cual le resulta más difícil hincharse (X. J. Yang et al. 1997). Además, se puede observar que el mayor valor de hinchamiento se logra a una concentración de 0.2 mg/mL de GO, lo cual está entre lo esperado, ya que según (Huang et al. 2012), por valores debajo de 0.3 mg/mL de GO se obtienen hidrogeles superabsorbentes, aunque el valor máximo está entre los 0.15 y 0.2 mg/mL de GO, ya que después el exceso de GO no permite que haya mayor interacción entre el agua y el hidrogel, además de que el gel se vuelve mucho más rígido, por lo que es difícil que este cambie su estructura (Huang et al. 2012; Yan et al. 2018).

Con respecto a las pruebas de firmeza, podemos afirmar que la disminución de los módulos de compresión y de los valores de firmeza máximos se deben al cambio en la estructura física debido a procesos de degradación por la estada dentro del reactor, lo cual se asemeja al caso presentado por Jeon, donde el estudio se realiza de similar forma pero con geles de alginato (Jeon et al. 2009). Por lo que podemos afirmar que incluso con los efectos de la degradación del material, la firmeza del gel mejora con respecto a la adición de óxido de grafeno.

En los resultados de TGA y DTG, podemos afirmar que el GO mejora las propiedades antes y después de su tiempo de residencia dentro del biorreactor, ya que en el TGA de las 0 horas podemos observar que la cantidad de masa que queda después de los 100°C es mayor para la formulación con GO que para el blanco que no lleva GO, por lo que se puede observar que hay una mejora en la estabilidad térmica del material, la cual se puede deber al entrecruzamiento entre la gelatina y el GO (Wang et al. 2012). En el DTG a las 72 horas, podemos observar que el pico de la degradación de gelatina (300-400°C) está más a la derecha en el caso de la formulación 2, que en el caso de la formulación 1 y el blanco, por lo tanto podemos afirmar que la formulación 2 es más estable térmicamente, y por lo tanto puede que la formulación 2 este más entrecruzada que la formulación 1 y el blanco (Abdollahi, Taghizadeh, y Savani 2018).

Con el FT-IR, se puede observar que la formulación 2, está más entrecruzada que la formulación 1 y el blanco, ya que los picos correspondientes a los grupos C=O y al enlace C=N están desplazados o no están presentes en la formulación 2, lo cual significa que el grupo no está en exceso, porque la reacción de entrecruzamiento fue completa (Patarroyo 2019; Piao y Chen 2015).

En los resultados de porosidad podemos observar que con el aumento del GO en los geles disminuye el tamaño de poro, lo cual sucede debido al aumento de puntos de conexión entre las fibras de gelatina y el glutaraldehído a escala molecular (Bazrafshan y Stylios 2018; Piao y Chen 2016; Yan et al. 2018), lo cual, a escala microscópica, genera un tamaño de poro menor en los geles con GO que en el blanco, lo cual es positivo, ya que si el poro es muy grande los microorganismos no pueden formar colonias dentro de los poros por que saldrían de la matriz, pero si son muy pequeños, por debajo de $10 \mu m$, las células no podrían entrar a los poros del gel.

El resultado de la viabilidad, muestra que con el aumento de GO, aumentó la viabilidad dentro del hidrogel a las 0 horas, esto se puede deber a la capacidad del GO de estimular el crecimiento y la proliferación celular (Bahartan et al. 2012; di Luca et al. 2018; S. H. Yang et al. 2012). Además, con el tiempo en el reactor la viabilidad disminuye lo cual se debe en principio a procesos de oxidación dada la agitación con aire y al crecimiento celular el cual puede llegar a aumentar la competencia y generar una mayor mortandad(di Luca et al. 2018), aun así, se puede asegurar que el agregar GO no afecta de forma negativa la viabilidad celular además de estar entre valores adecuados de viabilidad los cuales deben estar por encima del 60 % (Shin et al. 2013).

Por último en los resultados del HPLC, se puede observar que hubo producción de ácido láctico, ya que el pico que estándar para ácido láctico se encuentra entre 7.25 y 7.35 (Patarroyo 2019), y en nuestro el valor se encuentra en este rango, aún no se pudo determinar cuanto se produjo de ácido láctico, pero si su presencia en el medio después de las 72 horas en el reactor.

7. Conclusiones

Se logró estandarizar un método de producción para geles de gelatina con GO con potencial uso en el encapsulamiento de microorganismos. Este mismo método se puede usar para producir a menores o mayores concentraciones de GO

Se caracterizaron las propiedades mecánicas y físicas de hidrogeles de gelatina-GO, obteniendo valores acordes a los presentes en la literatura en la Reometría y la Texturometría.

Se logró observar por medio de la prueba de firmeza, el efecto del entrecruzamiento de los geles de gelatina-GO sobre la integridad física y la degradación de los empaques.

Se pudo analizar por medio del análisis DTG y TGA, el efecto del entrecruzamiento de las cadenas de gelatina con las nanopartículas de GO.

Se desarrolló un método experimental que se usó para observar el cambio en las propiedades de integridad y degradación en geles de gelatina-GO cuando estos son sometidos al ambiente de un biorreactor de bajo costo.

Se analizaron los efectos del GO sobre la porosidad de los hidrogeles y su degradación después de estar dentro del biorreactor de bajo costo.

Se observaron los efectos del GO sobre los microorganismos dentro del hidrogel mediante las pruebas de viabilidad, observando que se tiene un efecto benéfico sobre la levadura productora de ácido láctico *K.lactis*.

Se observó la producción de ácido láctico dentro del biorreactor, por medio HPLC y se determinó la presencia metabolitos de la levadura *K.lactis*.

8. Trabajo futuro

Se realizarán pruebas de proliferación y crecimiento sobre los hidrogeles de GO, para observar el crecimiento de cultivos de levaduras dentro del hidrogel, además de acompañar esta prueba con un HPLC a las 0, 24 y 72 horas, para comprobar la producción de ácido láctico.

Se desea generar diferentes geometrías de empaques para su implementación dentro del reactor y observar cambios en producción de metabolito, viabilidad y proliferación.

Con el montaje del reactor se buscará realizar una comparativa entre el crecimiento de distintos microorganismos y observar el comportamiento de estos dentro de los hidrogeles de gelatina-GO.

Se realizarán análisis de FTIR y UV-NIR, para observar el comportamiento de los enlaces C-O y C=O dentro de los hidrogeles antes y después de estar dentro del biorreactor.

9. Bibliografía

- Abdollahi, Reza, Mohammad Taghi Taghizadeh, y Samira Savani. 2018. «Thermal and mechanical properties of graphene oxide nanocomposite hydrogel based on poly (acrylic acid) grafted onto amylose». *Polymer degradation and stability* 147: 151–158.
- de Alteriis, Elisabetta et al. 2004. «Kluyveromyces lactis cells entrapped in Ca-alginate beads for the continuous production of a heterologous glucoamylase». *Journal of biotechnology* 109(1-2): 83–92.
- Bahartan, Karnit et al. 2012. «Encapsulation of yeast displaying glucose oxidase on their surface in graphene oxide hydrogel scaffolding and its bioactivation». *Chemical Communications* 48(98): 11957–11959.
- Bajpai, Pratima, y Argyrios Margaritis. 1985. «Immobilization of Kluyveromyces marxianus cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymatic properties». *Enzyme and microbial technology* 7(8): 373–376.
- Bazrafshan, Zahra, y George Stylios. 2018. «High performance of covalently grafting onto collagen in the presence of graphene oxide». *Nanomaterials* 8(9): 703.
- Castellanos, F. 2017. «Infrared spectroscopy».

- Cha, Chaenyung et al. 2014. «Controlling mechanical properties of cell-laden hydrogels by covalent incorporation of graphene oxide». *Small* 10(3): 514–523.
- El-Batal, AHMED I, LAILA M Farahat, HAA El-Rehim, y others. 2000. «Ethanol production by *Kluyveromyces lactis* immobilized cells in copolymer carriers produced by radiation polymerization». *Acta Microbiologica Polonica* 49(2): 157–166.
- Farris, Stefano, Jianhui Song, y Qingrong Huang. 2009. «Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde». *Journal of agricultural and food chemistry* 58(2): 998–1003.
- Ghorai, Sanjoy Kumar et al. 2019. «Coining attributes of ultra-low concentration graphene oxide and spermine: An approach for high strength, anti-microbial and osteoconductive nanohybrid scaffold for bone tissue regeneration». *Carbon* 141: 370–389.
- Huang, Yiwan et al. 2012. «Preparation and swelling properties of graphene oxide/poly (acrylic acid-co-acrylamide) super-absorbent hydrogel nanocomposites». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 401: 97–106.
- Jeon, Oju, Kamal H Bouhadir, Joseph M Mansour, y Eben Alsberg. 2009. «Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties». *Biomaterials* 30(14): 2724–2734.
- di Luca, Mariagrazia et al. 2018. «Electro-responsive graphene oxide hydrogels for skin bandages: The outcome of gelatin and trypsin immobilization». *International journal of pharmaceutics* 546(1-2): 50–60.
- Marrella, A et al. 2017. «Enhanced mechanical performances and bioactivity of cell laden-graphene oxide/alginate hydrogels open new scenario for articular tissue engineering applications». *Carbon* 115: 608–616.
- Martinez, Fabio Andres Castillo et al. 2013. «Lactic acid properties, applications and production: a review». *Trends in food science & technology* 30(1): 70–83.
- Mkhoyan, K Andre et al. 2009. «Atomic and electronic structure of graphene-oxide». *Nano letters* 9(3): 1058–1063.
- Patarroyo, Jorge. 2019. «Formulation and characterization of gelatin-based hydrogels for the encapsulation of *Kluyveromyces lactis*: applications in packed-bed reactors for lactic acid production.» *Universidad de los Andes*.
- Piao, Yongzhe, y Biqiong Chen. 2015. «Self-assembled graphene oxide–gelatin nanocomposite hydrogels: Characterization, formation mechanisms, and pH-sensitive drug release behavior». *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 53(5): 356–367.
- . 2016. «One-pot synthesis and characterization of reduced graphene oxide–gelatin nanocomposite hydrogels». *RSC Advances* 6(8): 6171–6181.
- Poppe, J. 1992. «Gelatin». En *Thickening and gelling agents for food*, Springer, 98–123.

- Roohina, Fatemeh, Maedeh Mohammadi, y Ghasem D Najafpour. 2016. «Immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells in carboxymethyl cellulose for production of ethanol from cheese whey: experimental and kinetic studies». *Bioprocess and biosystems engineering* 39(9): 1341–1349.
- Schott, Hans. 1992. «Swelling kinetics of polymers». *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics* 31(1): 1–9.
- Serna-Cock, L, y A Rodríguez-de Stouvenel. 2005. «Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte biotechnological production of lactic acid: state of the art producción biotecnológica de ácido láctico: estado do arte». *CYTA-Journal of Food* 5(1): 54–65.
- Waldir, Estela et al. 2007. «Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo». *Revista Peruana de Biología* 14(2): 271–276.
- Wang, Wenchao et al. 2012. «Preparation of reduced graphene oxide/gelatin composite films with reinforced mechanical strength». *Materials Research Bulletin* 47(9): 2245–2251.
- Yan, Xiaoqiang et al. 2018. «Mechanical properties of gelatin/polyacrylamide/graphene oxide nanocomposite double-network hydrogels». *Composites Science and Technology* 163: 81–88.
- Yang, Sung Ho et al. 2012. «Interfacing living yeast cells with graphene oxide nanosheaths». *Macromolecular bioscience* 12(1): 61–66.
- Yang, Xian Jin et al. 1997. «Swelling behaviour and elastic properties of gelatin gels». *Polymer International* 44(4): 448–452.
- Zayed, G, y AS Zahran. 1991. «Lactic acid production from salt whey using free and agar immobilized cells». *Letters in Applied Microbiology* 12(6): 241–243.