

**UTILIZACIÓN DE QUITOSANO PROCEDENTE DEL MICELIO DE
ASPERGILLUS NIGER Y SU APLICACIÓN EN REGENERACIÓN DE TEJIDOS.**

DANNY JAVIER BALANTA SILVA

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA ACADÉMICO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS - QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**UTILIZACIÓN DE QUITOSANO PROCEDENTE DEL MICELIO DE
ASPERGILLUS NIGER Y SU APLICACIÓN EN REGENERACIÓN DE TEJIDOS.**

DANNY JAVIER BALANTA SILVA

**Trabajo de grado presentado para optar al título de
Magister en ciencias química**

Director:

Fabio Zuluaga Corrales, Ph. D

Departamento de Química

**Grupo de investigación SIMERQO
(Síntesis de mecanismos de reacción en química orgánica)**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA ACADÉMICO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS - QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA ACADÉMICO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS - QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

DANNY JAVIER BALANTA SILVA

**UTILIZACIÓN DE QUITOSANO PROCEDENTE DEL MICELIO DE
ASPERGILLUS NIGER Y SU APLICACIÓN EN REGENERACIÓN DE TEJIDOS.**

Temas:

- ✓ Aislamiento de quitosano desde micelio de *Aspergillus niger*
- ✓ Elaboración de películas plásticas de quitosano
- ✓ Regeneración de tejidos
- ✓ Degradación hidrolítica
- ✓ Estudios de biocompatibilidad e implantación *in vivo*

DEDICATORIA

*“Este trabajo está dedicado a mi madre y mis abuelos,
por que desde siempre me apoyaron incondicionalmente, me transmitieron la confianza
y me inculcaron la responsabilidad hacia el estudio”*

Salmo 91

- 1 El que habita al abrigo del Altísimo morará bajo la sombra del Omnipotente.
- 2 Diré yo a Jehová: esperanza mía, y castillo mío; mi Dios, en quien confiaré.
- 3 El te librá de la mano del cazador, de la peste destructora.
- 4 Con sus plumas te cubrirá, y debajo de sus alas estarás seguro; escudo y adarga es su verdad.
- 5 No temerás el terror nocturno, ni saeta que vuele de día,
- 6 Ni pestilencia que ande en oscuridad, ni mortandad que en medio del día destruya.
- 7 Caerán a tu lado mil, y diez mil a tu diestra; mas a ti no llegará.
- 8 Ciertamente con tus ojos mirarás y verás la recompensa de los impíos.
- 9 Porque has puesto a Jehová, que es mi esperanza, al altísimo por tu habitación,
- 10 No te sobrevendrá mal, ni plaga tocará tu morada.
- 11 Pues a sus ángeles mandará acerca de ti, que te guarden en todos tus caminos.
- 12 En las manos te llevarán, para que tu pie no tropiece en piedra.
- 13 Sobre el león y el áspid pisarás; hollarás al cachorro del león y al dragón.
- 14 Por cuanto en mí ha puesto su amor, yo también lo libraré; le pondré en alto, por cuanto ha conocido mi nombre.
- 15 Me invocará, y yo le responderé; con él estaré yo en la angustia; lo libraré y le glorificaré.
- 16 Lo saciaré de larga vida, y le mostraré mi salvación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por concederme la vida y por haberme permitido llegar hasta aquí hoy, ya que sin él no podría ser posible este logro.

A mi madre Myriam, por todo su amor, cariño, comprensión, por que siempre has estado pendiente de mí desde mis primeros pasos. A mi padre Pedro Pablo, y a mis abuelitos Arcesio (que en paz descanse) y Ana, por incentivarme a estudiar y darme todo su apoyo, cariño y amor.

Al profesor Fabio Zuluaga por permitirme realizar el presente trabajo de grado en el laboratorio de polímeros, por sus valiosas sugerencias y ayuda inmensa, a Carlos David Grande por su importante ayuda en las correcciones del documento, y a mis evaluadoras Dra. Natalia Afanasjeva, del departamento de química de la Universidad del Valle y a la Dra. Diana Marcela Escobar Sierra, de la facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia, por la lectura, revisión oportuna y las respectivas correcciones hechas al mismo.

A la empresa Sucroal S.A por el suministro del micelio de *Aspergillus niger* y de algunos reactivos para el desarrollo de este trabajo y al centro de excelencia en nuevos materiales (CENM) por el apoyo económico (infraestructura y algunos reactivos suministrados para este proyecto)

Al implantólogo Carlos Valencia, por todo el apoyo brindado durante la realización de los estudios *in vivo* y al bioquímico Oscar Tamayo por su colaboración con las histologías.

A los analistas del departamento de química, en especial a Luis Hurtado, Carlos Rodríguez, Alberto Nieto, Mario Velasco y Yiminzon Palomeque, por haber

contribuido desde sus oficios al desarrollo de este trabajo, también al profesor Rubén Vargas y a sus estudiantes, y a la monitora Yurieth Marcela Quintero Giraldo por la ayuda suministrada y toma oportuna de las medidas de TGA y DSC.

Al profesor William Richard Aguirre, y a la monitora Andrea Naranjo, por su ayuda y toma oportuna de los difractogramas de rayos X.

Al profesor José Mina, de la escuela de ingeniería de materiales, y al analista Irwin Jadway Castro por la ayuda suministrada en la toma de las microscopías electrónicas de barrido a las películas obtenidas, al profesor Julio Caicedo y el analista Julio Cuevas por su ayuda con los ensayos de esfuerzo y tensión mecánicos.

A todos mis profesores del Departamento de Química como de otras facultades, porque a ellos les debo mi formación profesional (tanto en el pregrado como en posgrado), y en especial a la profesora Luz Marina Jaramillo.

A la Universidad del Valle, por abrirme sus puertas y permitir mi formación integral, por el soporte financiero y apoyo económico cuando lo necesité, y a todas y cada una de sus dependencias e instancias.

A mis grandes amigos Kriss Dayana, Bibiana, Ivonn Isaza, Andrea González Córdoba y Fabian Navarro por todos los buenos momentos compartidos durante el posgrado, ¡amigos, nunca los olvidaré!

A todos mis compañeros del posgrado: Alba, Karencita, Daniel Insuasty, Alberto “Beto”, Sebastián “opita”, Nelson Adrián, Diana Ocampo, Marcelino Carmelo, José Marquez, Claudia Valverde, Harlen Torres, Paola A. Acosta, Fernando Barona, Pablo Romo, Diego Morales, Germán Viveros, Juan C. Aponzá, y en especial a Cesar Arizabaleta, gran amigo y compañero incondicional desde el pregrado.

A todos mis compañeros del grupo SIMERQO: David Mondragón, Juan C. Barona, Paola Benavides, Elkin Romero, Nathaly Ortiz, Alejandra Fernández, Deisy Giraldo Andrea Mellisa Cabrera, Mónica Gordillo, Diana Lizcano, Sebastián Soto, Jhoan Zúñiga, David Jaramillo, Alejandro Guerrero, Diana Soto, Muskendol Novoa, Diego Enriquez, Andrés Camilo García, Diana C. Martínez, Cristian Carmona, y en especial a José Peñaranda.

A mis vecinos del cuarto piso y de otros laboratorios: Simón, Alejandra González Toro, Juliana Mazuera, María Juliana Restrepo, Andrey Joaquí, Gina, Mauricio, Yina Ruiz, Nathaly Castro, Mellisa Quimbayo, Myleidi Vera, Jhonatan Ramírez, Jhojan Mina, Isabel Domínguez y Mellisa Vargas, Nayeli Aristizabal, Ivonn Vanessa, Alexander Córdoba, Alejandra Arboleda, Ramiro Sánchez, Nilson Ruales, Miguel Osejo, Jhon J. Mutis, Jessica Ruiz, Jessica Medina, Laura Salas, Álvaro Botina, Gisella Ibañez, Vivian Karina Ocampo, María José Dávila, Juan S. Aguirre, Mónica Díaz Díaz, Claudia M. Mejía, Luz A. Hernández, y pido disculpas a todos los que se me escapan en este momento, ¡pero son muchos nombres y puse los que más pude!

Finalmente agradezco a quienes de alguna u otra manera hicieron este logro posible. Gracias totales.

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

η	Viscosidad
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
η_A	Viscosidad del solvente
η_r	Viscosidad relativa
η_{sp}	Viscosidad específica
ρ_b	Concentración en masa del polímero
%DD	Grado de deacetilación
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius
α	Constante alfa de Mark Houwink para el polímero
Å	Angstrom
ASTM	American Standard and Testing Methods
B	Constante de trabajo del viscosímetro
C/N	Relación Carbono a Nitrógeno
CP-MAS	Cross polarized magic angle spinning (polarización cruzada con giro de ángulo mágico)
cm^{-1}	Frecuencia de absorción infrarroja (centímetro inverso)
cm^2/s^2	Centímetro cuadrado por segundo cuadrado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier)
GPC	Cromatografía de permeación en gel
g	Gramo
h	Hora
IR	Infrared spectroscopy (espectroscopía infrarroja)
ISO	International Standard Organization

K	Constante de Mark Houwink Sakurada para el solvente
K_H	Constante kappa de Huggins
kg	Kilogramo
L	Litro
M	Concentración molar
mL	mililitro
mg	miligramo
mm	milímetro
min	minuto
mM	milimolar
μM	micrómetro
MPa	Megapascal (N/mm^2)
Mv	Peso molecular promedio en viscosidad
ppm	Partes por millón
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PGA	Acido poliglicólico
PLA	Acido poli-L-láctico
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SEM	Microscopía electrónica de barrido
t	Tiempo
Tg	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis termogravimétrico
TRIS-HCl	Clorhidrato de Tris hidroximetilaminometano
%W _i	Pérdida de peso

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Andamio de colágeno.	10
Figura 2. Componentes de la matriz extracelular en tejido conectivo.	11
Figura 3. Componentes de una fibra de colágeno	12
Figura 4. Fibra de elastina (a) y estados de relajación/estiramiento (b)	13
Figura 5. Incorporación de glóbulos rojos y plaquetas (a) formación del coágulo (b).	13
Figura 6. Estructura química de la heparina.	14
Figura 7. Estructura química del sulfato de condroitina.	14
Figura 8. Estructura química del ácido hialurónico.	15
Figura 9. Crecimiento de nuevos tejidos sobre hidrogeles.	16
Figura 10. Liberación de factores de crecimiento endotelial vascular desde hidrogeles de alginato en tejido muscular.	17
Figura 11. Andamio de quitosano y fibroína antes de la implantación (a), tejido abdominal natural de rata (b) y tejido regenerado con el andamio implantado (c).	17
Figura 12. Estructuras químicas de ácido poli-L-láctico (a), ácido poliglicólico (b) y poli- ϵ -caprolactona (c).	18
Figura 13. Bloques porosos de ácido poli-L-láctico (a) e implantación en la tibia de un conejo (b). Adaptado	18
Figura 14. Piel artificial creciendo <i>in vitro</i> . Cuarto día (a) y décimo cuarto día (b).	19
Figura 15. Distribución aproximada de los constituyentes de la pared celular de los hongos.	25
Figura 16. Estructura de la pared celular del hongo <i>Aspergillus niger</i>	28
Figura 17. Interacciones entre polímero y un plastificante	37
Figura 18. Procedimiento de implantación de las películas de quitosano: rasurado y desinfección (a); incisión en la epidermis (b); implantación de las películas (c); sutura de la zona dorsal (d).	52
Figura 19. Estructura propuesta del complejo quitino-glucano con unión β -(1-3) entre quitina (negro) y glucano (azul).	54
Figura 20a Hidrólisis básica del complejo quitino-glucano.	55
Figura 20b. Deacetilación de quitina para producir quitosano.	55

Figura 21. Mecanismo de hidrólisis de la quitina hacia quitosano. El grupo R es el extremo o fracción azúcar de la D-glucosamina	56
Figura 22. Equilibrio ácido base en el quitosano.	57
Figura 23. Películas de quitosano elaboradas con ácido fórmico (a), ácido cítrico (b), ácido láctico (c), ácido clorhídrico (d) y ácido fosfórico (e). Todos los ácidos en concentración 1% v/v	77
Figura 24. Películas de quitosano elaboradas con ácido fórmico (a), ácido láctico (b) y ácido cítrico (c). Todos los ácidos en concentración 5% v/v	78
Figura 25. Posibles interacciones del ácido fórmico con la cadena de quitosano (ácido acético si $R=CH_3$). Fuente: autoría propia.	79
Figura 26. Posibles interacciones del ácido láctico con la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia	79
Figura 27. Posibles interacciones del ácido cítrico con la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia	80
Figura 28. Películas de quitosano elaboradas con ácido clorhídrico (a) y ácido fosfórico (b). Todos los ácidos en concentración 5% v/v	81
Figura 29. Posibles interacciones del ácido clorhídrico con la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia	81
Figura 30. Posibles interacciones del ácido fosfórico con la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia	82
Figura 31. Películas de quitosano al 1% disueltas en ácido acético al 1% v/v sin plastificante adicionado (a-c).	82
Figura 32. Películas de quitosano en diferentes proporciones (polímero: plastificante). La muestra f no posee plastificante.	84
Figura 33. Enlaces de hidrógeno entre el glicerol (color verde) y los grupos amino protonados de la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia.	85
Figura 34. Micrografías película de quitosano (80:20). Aumentos de 200x (a, b) y 1000x (c).	87
Figura 35. Micrografías película de quitosano (90:10). Aumentos de 200x (a) y 1000x (b).	88
Figura 36. Micrografías película de quitosano sin plastificante: aumentos de 200x (a) y 1000x (b).	89
Figura 37. Incisión en la región dorsal (a) y recuperación de las muestras (b) luego de 21 días de implantación.	95
Figura 38. Histologías para el modelo N1D1: aumentos (a) y (b) 4x, (c) 10x y (d) 40x.	97

Figura 39. Histologías para el modelo N3D1: aumentos (a) 4x, (b) y (c) 10x y (d) 40x.	98
Figura 40. Histologías para el modelo N6D1: ampliaciones (a) 10x y (b) 40x.	99
Figura 41. Histologías para el modelo N6D2: aumentos (a) 4x, (b) 10x (c) y (d) 40x.	100
Figura 42. Posibles sitios de acción de la lisozima.	102

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Algunos polímeros naturales.	20
Tabla 2. Reacciones de obtención de derivados de la quitina y aplicaciones.	24
Tabla 3. Polisacáridos en la pared celular de algunas familias de hongos	26
Tabla 4. Plastificantes en la elaboración de películas de quitosano	38
Tabla 5. Reactivos utilizados durante el proyecto de investigación.	40
Tabla 6. Métodos de caracterización fisicoquímica del quitosano	46
Tabla 7. Análisis viscosimétrico para el quitosano obtenido (25°C, NaCl 0.2 M / CH ₃ COOH 0.1 M)	64
Tabla 8. Análisis elemental y grado de deacetilación para micelio, quitosano comercial y quitosano obtenido.	66
Tabla 9. Datos generados por el software Minitab para realizar el diseño experimental.	74
Tabla 10. Efectos estimados sobre las tres variables y las interacciones entre ellas en el diseño experimental.	74
Tabla 11. Resumen de los resultados histológicos	101

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Características de un andamio o matriz	9
Esquema 2. Estructuras químicas de celulosa (a) y quitina (b).	21
Esquema 3. Representación tridimensional en diferentes planos (a) y mediante flechas (b) de la α -quitina.	22
Esquema 4. Representación tridimensional en diferentes planos (a) y mediante flechas (b) de la β -quitina.	23
Esquema 5. Algunas reacciones de funcionalización de quitina.	24
Esquema 6. Partes de una hifa de <i>Aspergillus niger</i> : 1. Conidióforo, 2. Métula, 3. Fiálide, 4. Conidos o esporas (a) y reproducción (b).	26
Esquema 7. Diferentes formas de representación del hongo <i>Aspergillus niger</i> . Esporas (a), creciendo sobre maíz (b); creciendo en una caja Petri (c)	27
Esquema 8. Estructuras químicas de quitina (a), quitosano (b) y quitano (c).	29
Esquema 9. Diagrama de bloques para la extracción del micelio de <i>Aspergillus niger</i> .	43
Esquema 10. Preparación de las películas de quitosano.	49

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Composición del micelio de <i>Aspergillus niger</i> .	28
Gráfica 2. Espectros de infrarrojo del quitosano extraído y del quitosano comercial.	58
Gráfica 3. Espectros de infrarrojo de las películas de quitosano elaboradas. Q: Quitosano y PL: plastificante.	60
Gráfica 4. Espectro RMN- ¹ H de quitosano en CF ₃ COOH/DMSO- <i>d</i> 6 (25°C, 400 MHz)	61
Gráfica 5. Espectro RMN- ¹³ C-CP-MAS de quitosano (25°C, 100 MHz)	62
Gráfica 6. Viscosidad reducida de las disoluciones de quitosano en función de la concentración.	64
Gráfica 7. Valoración de quitosano disuelto en HCl 0.3 M con NaOH 0.103 M	67
Gráfica 8. Termograma obtenido para el quitosano extraído.	69
Gráfica 9. Calorimetría de barrido diferencial para el quitosano extraído.	70
Gráfica 10. Difractogramas de rayos X para muestras de quitosano extraído y comercial	72
Gráfica 11. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados. CP: concentración del polímero; CA: concentración ácido oleico y CG: concentración glicerol.	75
Gráfica 12. Efectos de cada variable sobre la respuesta. CP: concentración del polímero; CA: concentración ácido oleico y CG: concentración glicerol.	76
Gráfica 13. Interacción cúbica para elegir los valores de las variables. CP: concentración del polímero; CA: concentración ácido oleico y CG: concentración glicerol.	76
Gráfica 14. Difractogramas de rayos X para las películas de quitosano. Película sin plastificante (línea roja); película en proporción 80:20 (línea verde); película en proporción 90:10 (línea azul).	90
Gráfica 15. Tensión de rotura versus extensión para las películas de quitosano. Q: quitosano y PL: plastificante.	91
Gráfica 16. Perfil de degradación hidrolítica (pérdida de peso en función del tiempo) para las películas de quitosano elaboradas. Q: quitosano y PL: plastificante.	93

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	5
<i>2.1 Objetivo general</i>	5
<i>2.2 Objetivos específicos</i>	5
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
4. JUSTIFICACIÓN	7
5. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	9
5.1 Ingeniería de tejidos	8
<i>5.1.1 Los andamios y sus propiedades</i>	9
<i>5.1.2 Matriz extracelular</i>	11
5.2 Tipos de plataformas para crecimiento celular	15
<i>5.2.1 Hidrogeles</i>	15
<i>5.2.2 Las redes fibrosas</i>	17
<i>5.2.3 Bloques porosos</i>	18
<i>5.2.4 Piel artificial</i>	19
5.3 Polímeros naturales en regeneración de tejidos	20
<i>5.3.1 Quitina</i>	21
<i>5.3.1.1 Aplicaciones y usos de la quitina</i>	23
<i>5.3.2 Hongos como fuente de extracción de quitina</i>	25
<i>5.3.2.1 Composición de la pared celular de los hongos</i>	25
<i>5.3.2.2 Generalidades del hongo Aspergillus niger como fuente de quitina.</i>	26
<i>5.3.3 El quitosano y sus generalidades</i>	28
<i>5.3.3.1 Biocompatibilidad y biodegradabilidad en el quitosano</i>	30
<i>5.3.4 Extracción de quitosano</i>	31
<i>5.3.4.1 De subproductos de industria alimentaria marina</i>	31
<i>5.3.4.2 Extracción de quitosano de hongos</i>	32

5.3.5 Aplicaciones y usos del quitosano	34
5.4 Películas a partir de polímeros	36
5.4.1 Plastificantes	36
5.4.2 Plastificantes a emplear en las películas de quitosano	37
5.4.3 Elaboración de películas: método de film casting (evaporación de disolventes)	38
5.4.4 Aplicaciones de las películas de quitosano	39
 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	 40
6.1 Reactivos utilizados	40
6.2 Extracción del quitosano desde el micelio de <i>Aspergillus niger</i>	41
6.3 Identificación y caracterización fisicoquímica del quitosano obtenido	43
6.3.1 Grado de deacetilación del quitosano obtenido	43
6.3.1.1 Determinación por análisis elemental	43
6.3.1.2 Determinación por titulación potenciométrica	43
6.3.2 Identificación espectroscópica (FTIR y RMN) del quitosano	44
6.3.3 Análisis térmico del quitosano	44
6.3.4 Determinación del peso molecular del quitosano	45
6.3.5 Resumen de métodos de caracterización fisicoquímica del quitosano	46
6.4 Elaboración de películas de quitosano	46
6.4.1 Selección de variables mediante diseño experimental	46
6.4.2 Fabricación de películas de quitosano con ácido acético y mezcla plastificante	47
6.4.3 Fabricación de películas de quitosano con diferentes ácidos	49
6.4.4 Caracterización de las películas de quitosano obtenidas	49
6.4.4.1 Difracción de rayos X	49
6.4.4.2 Microscopia electrónica de barrido para las películas obtenidas	50
6.4.4.3 Ensayos de tensión para las películas obtenidas	50
6.4.4.4 Estudios de degradación hidrolítica (in vitro)	50
6.5 Estudio con modelos animales e implantación in vivo	51
6.5.1 Procedimiento pre-quirúrgico	51
6.5.2 Procedimiento quirúrgico	51
6.5.3 Procedimiento de eutanasia y recuperación de las muestras en las zonas implantadas	53
 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 54
7.1 Extracción del quitosano del micelio de <i>Aspergillus niger</i>	54
7.2 Caracterización fisicoquímica del quitosano obtenido	58
7.2.1 Espectroscopía infrarroja del quitosano	58

7.2.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C -CP-MAS) del quitosano	60
7.2.3 Determinación del peso molecular promedio en viscosidad del quitosano	63
7.2.4 Determinación del grado de deacetilación del quitosano obtenido	65
7.2.4.1 Grado de deacetilación del quitosano por análisis elemental	66
7.2.4.2 Grado de deacetilación de quitosano por valoración potenciométrica	67
7.2.5 Caracterización térmica del quitosano obtenido	68
7.2.6 Caracterización de quitosano por difracción de rayos X	72
7.3 Diseño experimental en la elaboración de películas de quitosano	73
7.4 Consideraciones en la elaboración de películas de quitosano	77
7.4.1 Efecto del tipo de ácido en el diseño de las películas (sin plastificante)	77
7.4.2 Efecto del uso de ácido acético (sin plastificante) en las películas de quitosano	82
7.4.3 Influencia de la proporción de quitosano y de la mezcla plastificante sobre las películas diseñadas	83
7.5 Caracterización de las películas de quitosano con plastificante	86
7.5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) para las películas de quitosano	86
7.5.2. Caracterización de las películas de quitosano por rayos X	90
7.5.3 Propiedades mecánicas de las películas de quitosano obtenidas	91
7.5.4 Estudios de degradación hidrolítica	93
7.6 Estudio de biocompatibilidad del quitosano en modelos animales.	95
7.6.1 Análisis histológico	96
7.6.2 Interacción de las películas de quitosano al interior de los sujetos experimentales	102
8. CONCLUSIONES	103
9. PERSPECTIVAS	105
9.1 Extracción de quitosano	105
9.2 Producción de películas de quitosano	105
9.3 Estudios de implantación in vivo	106
10. PRESENTACIONES EN EVENTOS	106
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

RESUMEN

En este trabajo se exploró el aprovechamiento del micelio de *Aspergillus niger*, un subproducto de la producción de ácido cítrico en una industria local, como materia prima y fuente alternativa para la obtención de quitosano, el cual se extrajo con un rendimiento de reacción de 5.02% en base seca. Al polímero se le realizó una completa caracterización estructural y fisicoquímica, destacándose principalmente el peso molecular (determinado por viscosimetría capilar), siendo de 1.52×10^5 g/mol, y el grado de deacetilación, que se encontró por dos métodos diferentes: análisis elemental (75.30%) y potenciometría (70.81%) respectivamente.

Mediante un diseño experimental, se estudiaron las variables que influenciaron en la elaboración de las películas de quitosano por el método de evaporación de disolventes, siendo estas: concentración del polímero, concentración de los plastificantes (glicerol y ácido oleico) y tipo de ácido a emplear. Las películas fueron preparadas en diferentes proporciones en peso entre el polímero y la mezcla plastificante (entre 50:50 hasta 90:10), así mismo estas fueron caracterizadas fisicoquímicamente y mecánicamente, evidenciándose flexibilidad, transparencia y propiedades mecánicas aceptables.

Finalmente, las películas de quitosano fueron implantadas en cinco modelos animales de la especie *Rattus norvegicus*, con el fin de analizar si eran o no biocompatibles y reabsorbibles. Luego de 21 días del estudio *in vivo* en la mayoría de los biomodelos no se encontró restos de material polimérico, ni se evidenció inflamación o rechazo, aunque hubo algunos casos de encapsulamiento del mismo en algunos biomodelos. Esto fue comprobado mediante estudios histológicos realizados sobre el tejido conectivo donde se dio lugar la implantación. Así mismo, se pudo comprobar la degradabilidad del quitosano bajo condiciones fisiológicas simuladas.

Palabras clave: regeneración de tejidos, películas de quitosano, degradabilidad, biocompatibilidad, estudios *in vivo* e *in vitro*.

ABSTRACT

In this work we explored the use of *Aspergillus niger* mycellium, a byproduct from the production of citric acid in a local industry as raw material and alternative source for the production of chitosan, which was extracted with a yield of 5.02 % on a dry basis. Structural and physicochemical characterization of the polymer was performed, highlighting mainly the molecular weight (determined by capillary viscometry) being $1.52 \times 10^5 \text{ g / mol}$ and the deacetylation degree, which was found by two different methods: elemental analysis (75.30 %) and potentiometry (70.81 %) respectively.

Using an experimental design, the variables that influenced the development of chitosan films by solvent evaporation method were studied: the concentration of the polymer, the amount of plasticizer (glycerol and oleic acid) and the type of acid used as solvent. Films at different weight ratios of the polymer and the plasticiser mixture (from 50:50 to 90:10) were prepared, which were then physicochemically and mechanically characterized, demonstrating flexibility, transparency and acceptable mechanical properties found. Finally, chitosan films were implanted in five animal models of the *Rattus norvegicus* species, in order to analyze if they were biocompatible and absorbable.

After 21 days of the *in vivo* study, the majority of the subjects showed no traces of polymeric material and no inflammation or rejection was evidenced, although there were some cases of encapsulation in some subjects. This was verified by histological studies performed on the connective tissue where implantation took place. Also, the degradability of chitosan was carried out under simulated physiological conditions.

Keywords: regeneration of tissues, chitosan films, degradability, biocompatibility, *in vivo* and *in vitro* studies.

1. INTRODUCCIÓN

Entre las muchas aplicaciones de los biomateriales una de las más importantes es la de reestablecer o reemplazar tejidos, órganos y funciones corporales afectadas, tratando de minimizar los daños que puedan tener, permitiendo mejorar la calidad de vida de las personas(1). Al usar los polímeros en el diseño de dispositivos para regeneración tisular, es importante tener en cuenta los grupos funcionales que estos puedan contener, y la morfología final a adquirir (piezas o componentes mecánicos) de acuerdo a la necesidad y anatomía del paciente receptor, entre otros aspectos. La biocompatibilidad es un requisito *sine qua non* para todos los implantes, pero la biodegradabilidad y reabsorción de estos dispositivos varía en función de la aplicación respectiva, por ejemplo, las suturas deben ser biodegradables, mientras que los implantes de cadera o rodilla se mantienen al interior del cuerpo de forma permanente.

Es posible elaborar esta clase de dispositivos a partir de polímeros naturales, tal es el caso de la quitina (compuesta por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina) presente en los exoesqueletos de crustáceos, artrópodos, anélidos y en las paredes celulares de ciertas especies de hongos. El micelio del hongo *Aspergillus niger* (subproducto resultante de la transformación de azúcares en ácido cítrico mediante fermentación aeróbica) es una de las fuentes disponibles a nivel local. La empresa Vallecaucana Sucroal S.A (antes llamada Sucromiles S.A) produce alrededor de 13000 toneladas al año de micelio húmedo. El quitosano, derivado de la quitina, ha cobrado gran interés por su aplicación en áreas como la medicina, agricultura, industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria, dadas sus notables características de degradabilidad y biocompatibilidad (2).

Tradicionalmente, el quitosano se obtiene de los exoesqueletos de camarón y crustáceos (cangrejos, jaibas, langostinos), a través de varias etapas (hidrólisis alcalina acompañada de desmineralización, desproteínización y deacetilación de la quitina, respectivamente) (3)

En contraste, al emplear el micelio de *Aspergillus niger* como fuente de quitina, se simplifica la tarea de extracción del quitosano, puesto que se requiere de una menor cantidad de etapas (hidrólisis, desproteinización y deacetilación), obteniéndose así un quitosano de una fuente no animal y de calidad comparable al del quitosano aislado de exoesqueletos de crustáceos (4).

Con el fin de obtener películas para promover la regeneración de tejidos, se empleó el método de *film casting* (o de evaporación de solventes), que consiste en la mezcla del quitosano con plastificantes, dando como resultado películas con una consistencia lisa y suave al tacto. Las características de las películas dependen de factores como la concentración del quitosano, el ácido con que se le disuelve, y el tipo de plastificante a emplear.

Los procedimientos de implantación de las películas en modelos animales se realizaron mediante consentimiento previo del comité de ética animal de la Universidad del Valle, siguiendo los protocolos recomendados y aceptados mundialmente de acuerdo a la norma ISO 10993 sección 6. Así mismo, el material actuó como un andamio (*scaffold*) ya que posibilitó el crecimiento de nuevos tejidos, al mismo tiempo que se reabsorbió sobre las zonas en las que se realizó el implante. Como resultados de este estudio, las películas mostraron la biocompatibilidad esperada. Así mismo, la degradabilidad de las películas elaboradas con quitosano se comprobó mediante ensayos de degradación hidrolítica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Elaborar e implantar películas de quitosano aislado del micelio del hongo *Aspergillus niger* en modelos animales, con el fin de evaluar su degradabilidad, biocompatibilidad y capacidad regeneradora de tejidos blandos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar la caracterización fisicoquímica del quitosano haciendo uso de técnicas espectroscópicas (FTIR y RMN), así mismo determinar propiedades como el peso molecular mediante viscosimetría capilar, el grado de deacetilación (por análisis elemental y por valoración potenciométrica), e igualmente caracterizarlo por análisis térmico, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.
- ✓ Elaborar y caracterizar las películas de quitosano, teniendo en cuenta los plastificantes a emplear, la concentración en peso del polímero y el tipo de ácido que solubiliza el polímero.
- ✓ Realizar pruebas de degradación hidrolítica a las películas de quitosano bajo la simulación de condiciones fisiológicas y comparar como podría ser su comportamiento frente a un modelo *in vivo*.
- ✓ Analizar la biocompatibilidad de las películas de quitosano tras ser implantadas en modelos animales de la especie *Rattus norvegicus*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se estima que la producción mundial de quitina en 2006 fue de 10^{11} toneladas métricas, y que hasta el año 2000, anualmente se usaban 10000 toneladas de quitina a escala industrial (5) siendo China, India, Japón y Estados Unidos los mayores productores de quitina en el mundo, ya que en estos países hay una amplia distribución de especies marinas utilizadas en el proceso de obtención de quitina (3).

Aunque la quitina presenta una notable abundancia, el uso de fuentes tradicionales (subproductos de la industria marina), presenta ciertos inconvenientes: 1- se restringe el proceso de extracción a determinadas temporadas del año, un caso concreto de nuestra región es la temporada de veda, donde la pesca de varias especies marinas está prohibida. 2- La extracción de quitosano comprende varias etapas: esterilización, desmineralización (para retirar sales como carbonatos), limpieza, secado y molienda (para homogenizar el material de partida) y desproteínización para obtener inicialmente quitina y posteriormente quitosano mediante deacetilación. 3- El producto obtenido puede presentar algún contenido de alérgenos. Por lo tanto, es deseable que se implemente el proceso de extracción de quitina y quitosano a partir de fuentes diferentes a los subproductos de la industria marina, de amplia disponibilidad en cualquier época del año.

Teniendo en cuenta la experiencia interdisciplinaria del laboratorio de polímeros del grupo de investigación SIMERQO (síntesis de mecanismos de reacción en química orgánica) el cual, en conjunto con grupos de investigación de las Facultades de Salud e Ingeniería, ha venido trabajando en la producción de materiales para implantología y en la fabricación de matrices en forma de bloques porosos o matrices reticulares obtenidas por electrohilado, para estudiar el crecimiento de tejido óseo (6), por ello se decidió explorar el uso del quitosano, extraído del micelio de *Aspergillus niger* en la elaboración de películas para regeneración de tejidos, siendo estas un material muy cercano o afín a la piel.

Para el estudio de regeneración de tejidos, las películas elaboradas a partir del quitosano obtenido de *Aspergillus niger* fueron implantadas en modelos animales (ratas Wistar), teniendo en cuenta las normativas internacionales referentes a los asuntos de ética animal. De igual manera, se pretendía demostrar que con la implantación no había lugar a rechazo o respuestas inflamatorias durante la restauración del tejido lastimado, bajo la suposición de que se presentaría biocompatibilidad y reabsorción de las películas, aprovechando la interacción del quitosano con la matriz extracelular, principal estructura creadora de tejidos.

4. JUSTIFICACIÓN

Se propone el uso y aprovechamiento del micelio de *Aspergillus niger* como fuente alternativa para la extracción de quitina y quitosano, por las siguientes razones:

- 1- La empresa Vallecaucana Sucroal S.A., en su proceso de producción de ácido cítrico, genera 13000 toneladas/año del micelio, del cual solo el 10%, es comercializado como alimento para rumiantes y como fertilizante, a precios muy bajos (7), introduciendo un valor agregado al proceso.
- 2- El quitosano obtenido estaría libre de alérgenos presentes en las fuentes animales.
- 3- Se daría una solución a la problemática ambiental sobre la disposición de las 11700 toneladas remanentes del micelio, al promover procesos biotecnológicos con respecto a la obtención de quitina, quitosano y ácido cítrico como coproducto.
- 4- Permitiría la creación de una industria dedicada a la obtención de los productos antes mencionados, ofreciendo un valor agregado (rentabilidad, competencia en mercados internacionales), generación de empleos directos e indirectos,

fortalecimiento del desarrollo investigativo y socioeconómico del Valle del Cauca y el país.

- 5- El proceso de obtención del quitosano a partir del micelio puede llevarse a cabo en cualquier época de año, siendo mucho más simple que el empleado en las fuentes marinas.

Con respecto a la ingeniería de tejidos, los dispositivos creados a partir de polímeros biodegradables son una alternativa ventajosa en los casos pertinentes frente a otros ya existentes, debido a su versatilidad al ser fácilmente procesables en diferentes presentaciones: hidrogeles, en forma de piel artificial, cápsulas, perlas, y en forma de películas, de acuerdo con las necesidades del paciente o usuario final, además de que no necesitan ser retirados una vez cumplen con su cometido de restaurar los tejidos dañados. El quitosano se ajusta a lo anterior, pues se destaca por su biocompatibilidad, degradabilidad, muy baja toxicidad y alergenidad, dándose la reabsorción del mismo una vez cumple su función, siendo metabolizado y asimilado por el cuerpo.

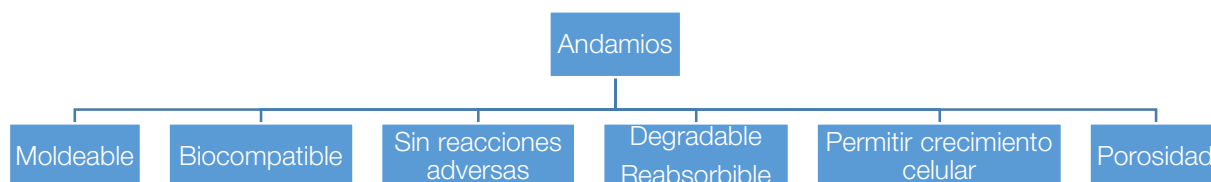
5. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

5.1 Ingeniería de tejidos

El concepto de ingeniería de tejidos(8), o medicina regenerativa, es un campo investigativo interdisciplinar y prometedor que requiere de la biología, bioquímica y ciencias de la salud para comprender la manera en que se comportan las células, tejidos y órganos en sistemas biológicos vivos. En cuanto a la física, química, matemáticas e ingenierías (química, biomédica y de materiales), requiere de ellas para diseñar y construir las prótesis, soportes o elementos sobre los cuales van a interaccionar las células, órganos y tejidos afectados, acercándose a la situación deseada, de acuerdo al tipo de soporte y paciente que lo requiera.

5.1.1 Los andamios y sus propiedades

En ingeniería de tejidos, los andamios, soportes (9) o matrices (término derivado del inglés *scaffold*) son estructuras que permiten el alojamiento de las células (cultivadas *in vitro* o producidas en el organismo del paciente), de forma que sobre ellos crezcan nuevos tejidos. Algunas características en el diseño de andamios son las siguientes:



Esquema 1. Características de un andamio o matriz. Adaptado de Hoffman (8)

También se debe tener en consideración factores importantes como la forma, la porosidad, el transporte de masa y la actividad biológica.

Al ser moldeables los andamios, **permiten que se les confiera la forma deseada**, de acuerdo a la zona del cuerpo a donde se desee realizar el tratamiento. Como soportes

biocompatibles no deben causar molestias al interior del organismo, idealmente deben ser biodegradables y reabsorbibles, lo que implica que sus productos de degradación sean fácilmente asimilables o expulsados por el organismo, de manera que el andamio no tenga que ser removido mediante una cirugía posterior a su implantación, y en caso de no serlo, deben poderse retirar o cambiar una vez concluya su ciclo de uso como dispositivo biomédico.

De acuerdo al tejido a producir sobre un andamio, el **tamaño adecuado de los poros** y la interconectividad entre los mismos garantiza que el sembrado, colonización y diseminación de las células en el soporte facilite la labor regeneradora.

La figura 1 corresponde un andamio (plataforma o matriz) que permite la construcción de nuevos tejidos sobre él.

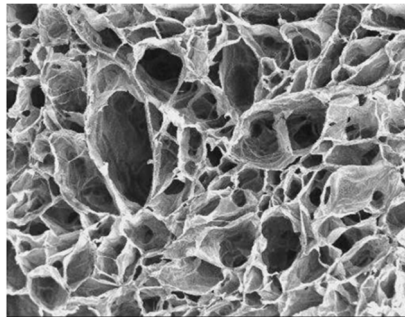


Figura 1. Andamio de colágeno. Tomado de Madhally (10)

El andamio debe posibilitar el **transporte de masa**, es decir, la difusión de nutrientes, proteínas, gases, fluidos fisiológicos y productos de desecho a través de su estructura, puesto que la supervivencia celular depende del intercambio a través de los poros antes mencionados. Finalmente, es deseable que manifieste una **actividad biológica** con respecto a la promoción de las funciones celulares (adherencia, proliferación y diferenciación) es decir, debe interactuar en los alrededores del sitio donde se realice el implante (dirigido a una zona específica del cuerpo) sin presentar una respuesta alérgica, inflamatoria o de rechazo.

5.1.2 Matriz extracelular

Es la encargada de mantener unidas a las células, concederles una morfología, establecer la comunicación entre ellas y fomentar los factores de crecimiento celular para la formación de nuevos tejidos, y al mismo tiempo proveer soporte mecánico a los tejidos ya existentes (11). A su vez, las macromoléculas que componen la matriz extracelular suelen ser las siguientes: colágeno, elastina, fibrina, glucosaminoglucanos, proteoglicanos y glicoproteínas. La figura 2 indica la distribución aproximada de algunas macromoléculas en tejido conectivo.

Es de esperar que los componentes de la matriz extracelular interaccionen con los polímeros que se empleen como dispositivos regeneradores de tejidos, tal es el caso particular de la quitina y el quitosano, cuyos oligómeros y subproductos (principalmente D-Glucosamina y N-acetil-D-glucosamina) son a su vez derivados de glucosaminoglucanos idóneos para el crecimiento celular. A continuación se describirá la importancia de las macromoléculas presentes en la matriz extracelular.

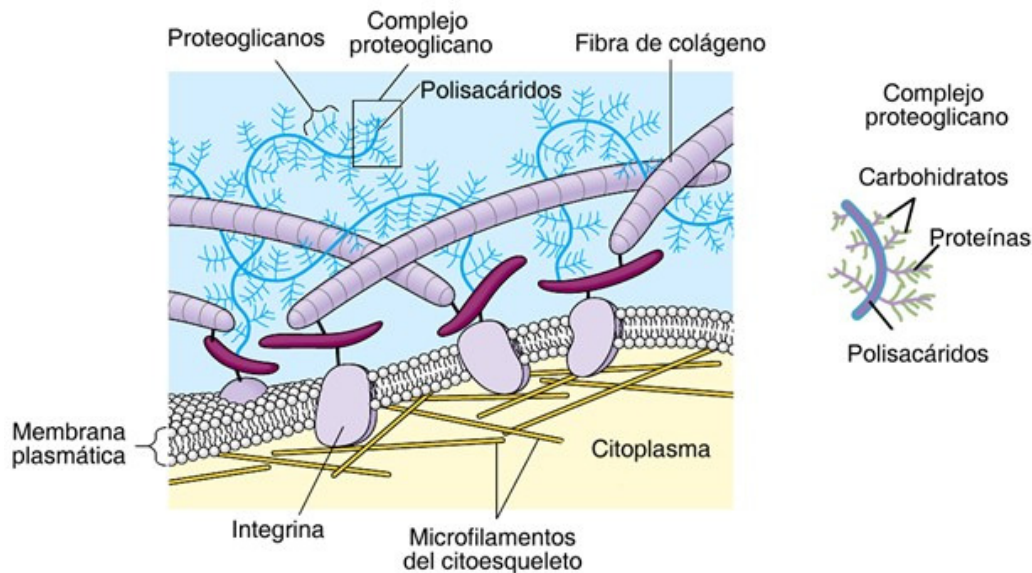


Figura 2. Componentes de la matriz extracelular en tejido conectivo. Tomado de Campbell (12)

Colágeno: es la proteína más abundante en el tejido conectivo, y se presenta en forma de fibrillas largas y resistentes (13), presentando en su composición proteínas, aminoácidos y carbohidratos (ver figura 3).

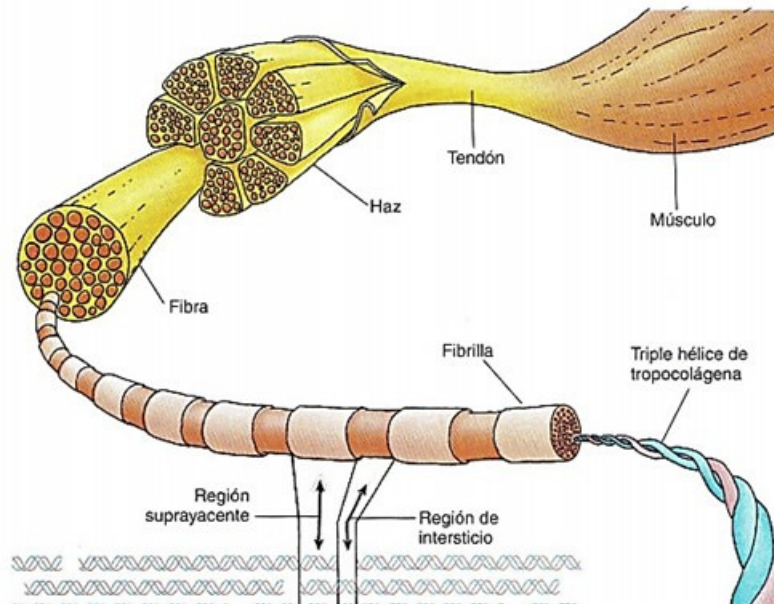


Figura 3. Componentes de una fibra de colágeno. Tomado de Gartner y Hiatt(14)

De todos los tipos de colágeno existentes, se destacan cuatro de ellos: Tipo I (presente en la piel, hueso y tendones); Tipo II (presente en cartílagos); Tipo III (se encuentra en estructuras vasculares y en las paredes de los vasos sanguíneos) y Tipo IV (se encuentra en la membrana o lámina basal). El colágeno para usos médicos suele provenir de tejidos bovinos, porcinos y humanos (se obtiene de fibroblastos o de células cultivadas obtenidas por tecnologías recombinantes).

Elastina: es una proteína que provee de elasticidad a los tejidos donde se requiera estiramiento y relajamiento como: vasos sanguíneos, ligamentos, tejido conectivo pulmonar, paredes arteriales, piel y otros (13). Las fibras de elastina pueden contraerse o extenderse, de acuerdo a la tensión mecánica ejercida sobre ellas (ver figura 4). Dentro de su composición hay microfibrillas de fibrilina, glucoproteínas y proteoglicanos.

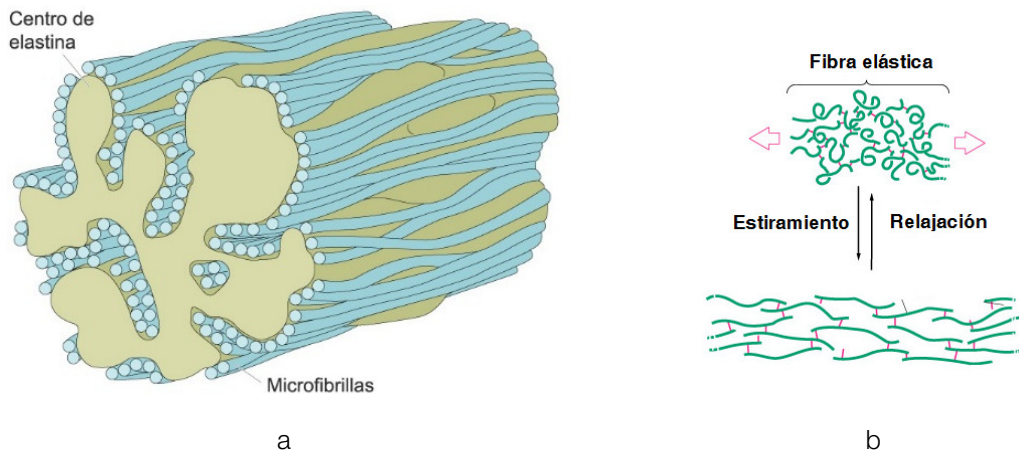


Figura 4. Fibra de elastina (a) y estados de relajación/estiramiento (b). Adaptado de Gartner y Hiatt(14)

Fibrina: es una proteína relacionada con el proceso de producción de la sangre, su coagulación y la curación de las heridas. Se produce en el hígado por la unión mediante polimerización entre el fibrinógeno (una glicoproteína) y la trombina (una enzima), formando una red tridimensional de largas hebras de fibrina (13) sobre el sitio de la herida, y en conjunto con las plaquetas, forman un coágulo blando. El fibrinógeno se puede aislar de plasma animal y humano, pudiendo utilizarse la sangre del propio paciente para producirlo (ver figura 5).

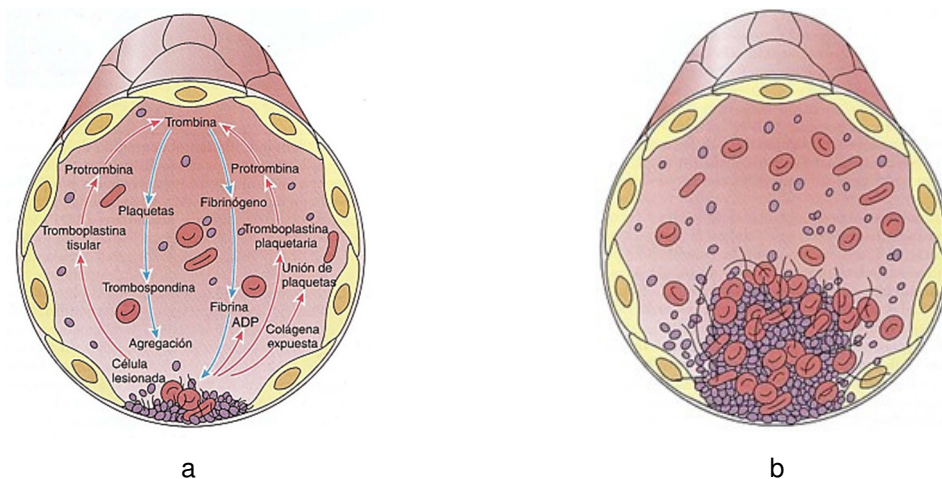


Figura 5. Incorporación de glóbulos rojos y plaquetas (a) y formación del coágulo (b). Tomado de Gartner y Hiatt(14)

Glucosaminoglucanos: son una familia de polisacáridos lineales que se encuentran en tejidos animales(13). Sus unidades repetitivas consisten en monómeros de glucosamina o galactosamina unidos a un azúcar (galactosa, ácido glucurónico o ácido idurónico). Dentro de ellos destacan la heparina, sus formas sulfatadas (condroitina, keratan, dermatan) y el ácido hialurónico, siendo degradados naturalmente por enzimas como la heparanasa, condroitinasa y la hialuronidasa.

La **heparina** (figura 6) es una glucosamina sulfatada empleada como anticoagulante. Los constituyentes suelen ser D-glucosamina y ácido D-glucurónico (o ácido L-idurónico). Por estar cargada negativamente, puede unirse a factores de crecimiento de tejido endotelial vascular (VEGF) y de crecimiento de fibroblastos (bFGF). La liberación de estos factores puede variar entre días a semanas, dependiendo de la asociación de dichos factores con la heparina.

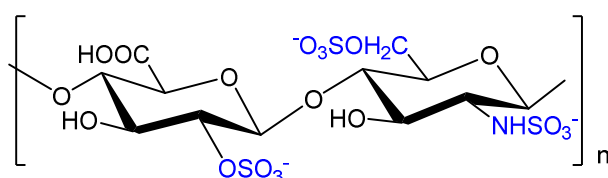


Figura 6. Estructura química de la heparina. Fuente: autoría propia

El **sulfato de condroitina** (figura 7) se compone de unidades repetitivas de ácido glucurónico y *N*-acetilglucosamina, pudiendo presentar grupos sulfato en lugar de los hidroxilos sobre el C-4, C-6, o un grupo carboxilato. Así mismo, es un componente de los tejidos cartilaginosos y absorbe agua fácilmente. Se une a los proteoglicanos en las superficies celulares o en la membrana basal donde funciona como un receptor. Se encuentra en los cartílagos de ballena y tiburón, y en tejidos bovinos y porcinos.

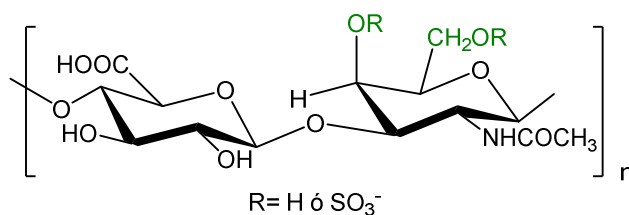


Figura 7. Estructura química del sulfato de condroitina. Fuente: autoría propia

Finalmente, el **ácido hialurónico** (figura 8) consiste en unidades repetitivas de ácido glucurónico y *N*-acetilglucosamina, se encuentra en la matriz extracelular de todos los tejidos del cuerpo, abunda particularmente en el cordón umbilical, en los ojos, en los fluidos sinoviales y en los cartílagos. Dentro de sus usos como biomaterial, actúa como lubricante para proteger el tejido ocular en cirugías oftálmicas, provee movimiento a las articulaciones sustituyendo el líquido sinovial perdido, y reduce las cicatrices dejadas por heridas o cirugías.

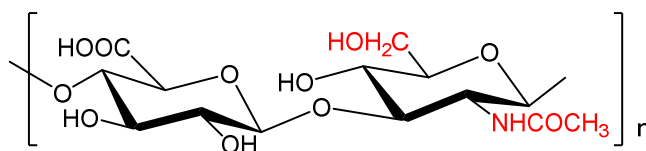


Figura 8. Estructura química del ácido hialurónico. Fuente: autoría propia

5.2 Tipos de plataformas para crecimiento celular

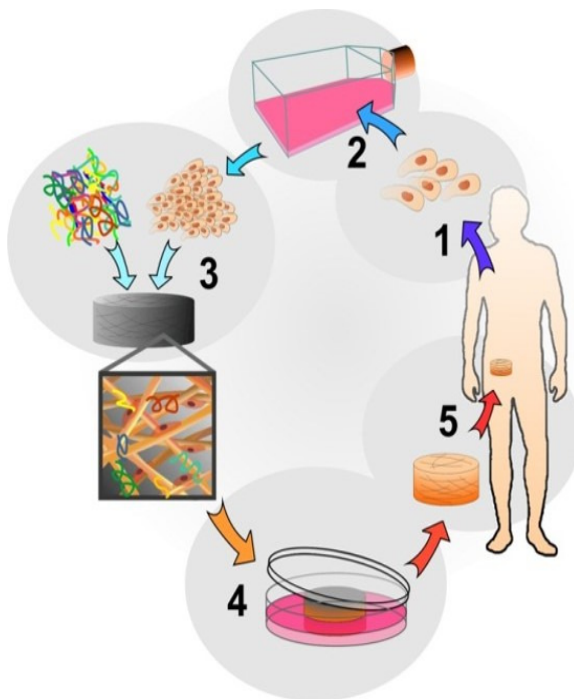
Las plataformas para crecimiento de tejidos deben imitar la matriz extracelular tanto en su composición como en su estructura física y sus funciones. La mayoría de ellas se elabora a partir de polímeros naturales o sintéticos. Se han usado diferentes tipos de plataformas como los hidrogeles, los bloques porosos, las películas y las redes fibrosas obtenidas generalmente por electrohilado.

5.2.1 Hidrogeles

Son materiales de consistencia blanda y elástica, siendo elaborados con polímeros de origen natural o sintético, que se hinchan en contacto con el agua, formando una red tridimensional, reteniendo una fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse. Como tal, los hidrogeles presentan un carácter hidrófilo debido a la presencia de ciertos grupos polares (-OH, -NH₂, -COOH, -CONH₂, -SO₃H), por lo tanto se hinchan en agua o medios acuosos (requieren de un agente entrecruzante para formar las redes tridimensionales), adicional a ello son sensibles frente a los cambios

del pH, temperatura y estímulos bioquímicos. Esta clase de materiales versátiles presentan una porosidad al interior de su estructura, que le garantiza un efectivo transporte de masa, oxígeno y nutrientes para integrarse con los elementos de la matriz extracelular y permitir la elaboración de nuevos tejidos (8, 9).

Si se desea obtener nuevos tejidos sobre hidrogeles (u otras matrices), estos pueden elaborarse en condiciones *in vitro*, mediante un ciclo de cinco etapas(15) que se aprecian en la figura 9.



1. Extracción de algunas células del cuerpo del paciente.
2. Cultivo celular en un medio apropiado y proliferación de las células.
3. Sembrado de células sobre andamios porosos, junto a factores de crecimiento celular adecuados.
4. Los andamios con células se colocan en un medio de cultivo para un incremento posterior de las células y construir el tejido.
5. El tejido regenerado se implanta en el sitio donde hay un defecto, para que se integre con los tejidos naturales y ayude a regenerar la zona afectada.

Figura 9. Crecimiento de nuevos tejidos sobre hidrogeles. Tomado de George (15)

Los hidrogeles pueden direccionar a los factores de crecimiento celular para que sean liberados en el tejido donde se les necesite, tal es el caso de los hidrogeles de alginato, que transportan los factores de crecimiento endotelial vascular, para la formación de nuevos vasos sanguíneos alrededor del sitio de la implantación(9), tal como puede apreciarse en la figura 10.

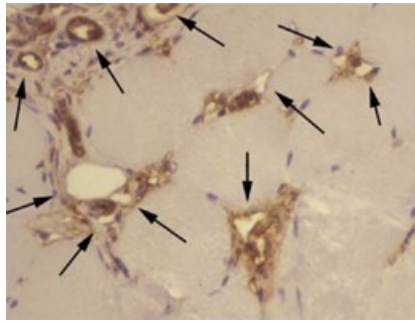


Figura 10. Liberación de factores de crecimiento endotelial vascular desde hidrogeles de alginato en tejido muscular. Tomado de Drury(9)

5.2.2 Las redes fibrosas

Dos o varios polímeros pueden mezclarse en forma de **redes fibrosas**, a las cuales se les puede dar una forma deseada al interior de un molde, sin que necesariamente tengan células cultivadas en su interior, tal es el caso de una mezcla de quitosano con fibroína, aplicada directamente para la regeneración de tejido abdominal de rata (ver figura 11), conllevando a su vascularización, e incremento de la tensión mecánica del tejido regenerado tras haberse integrado en la matriz extracelular(16).

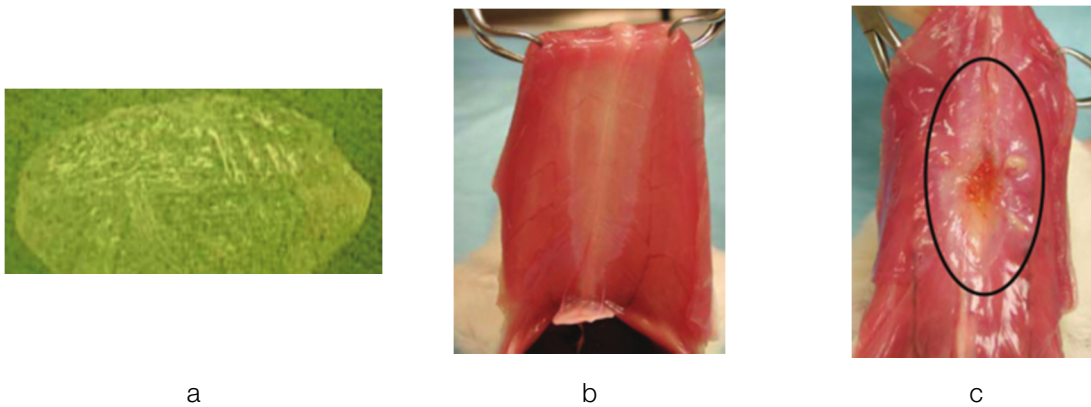


Figura 11. Andamio de quitosano y fibroína antes de la implantación (a), tejido abdominal natural de rata (b) y tejido regenerado con el andamio implantado (c). Tomado de Gobin

5.2.3 Bloques porosos

Los polímeros sintéticos más comúnmente empleados en la fabricación de plataformas para crecimiento de tejido (en forma de bloques porosos) son el ácido poli-L-láctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), la poli-ε-caprolactona (PCL) y sus correspondientes copolímeros (ver estructuras en la figura 12). Todos ellos son biodegradables y biocompatibles y se pueden transformar para producir este tipo de plataformas (17).

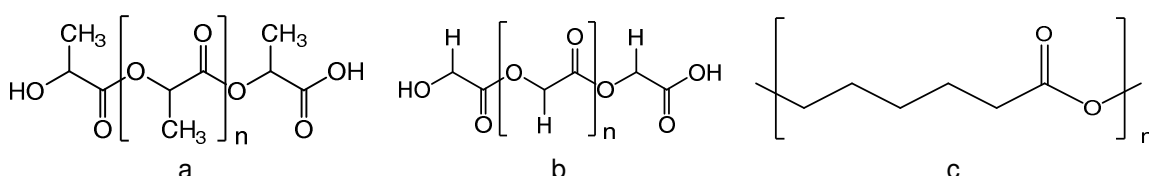


Figura 12. Estructuras químicas de ácido poli-L-láctico (a), ácido poliglicólico (b) y poli-ε-caprolactona (c). Fuente: autoría propia.

En el grupo SIMERQO se ha estudiado la regeneración de tejido óseo de conejos, por lo cual el ácido poli-L-láctico se transformó en un bloque poroso, el cual se implantó sobre un defecto creado en la tibia de cada modelo animal (ver figura 13), evidenciándose después de 21 días la formación de nuevos tejidos, de ahí que el ácido poli-L-láctico sea osteoconductor, osteoinductor y osteopromotor (18–20). Después de que cumple su acción restauradora, el polímero se degrada en el organismo, siendo fácilmente metabolizado y eliminado.



a



b

Figura 13. Bloques porosos de ácido poli-L-láctico (a) e implantación en la tibia de un conejo (b). Adaptado de Betancur (20), Peñaranda(18) y Correa (19)

5.2.4 Piel artificial

De acuerdo a Brohem y colaboradores(21), la piel, al ser el órgano más extenso del cuerpo humano, se organiza en una estructura de capas constituidas primariamente por la dermis y la epidermis, y varios estratos o anexos como folículos pilosos, glándulas sebáceas, sudoríparas, nervios y vasos sanguíneos. De acuerdo a esto, es posible elaborar piel artificial para promover el crecimiento celular y de nuevos tejidos o regenerar los ya afectados (de acuerdo a la técnica sugerida de la figura 9). Una aplicación de ello es ilustrada por Yang, Kwon Seo y colaboradores, quienes utilizaron queratinocitos y colágeno tipo I con fibroblastos para crear un trozo de piel artificial sembrada sobre un cultivo celular de células humanas de piel pertenecientes a la dermis y epidermis respectivamente. En su estudio emplearon 1×10^5 células/cm² sobre la matriz sintética de colágeno, todo esto en fase líquida. La piel artificial producida fue utilizada en ratas Wistar, siendo injertada en los defectos creados para determinar si ocurría o no el crecimiento de nuevos tejidos. Otra aplicación del diseño de piel artificial fue llevada a cabo por Klar y colaboradores (22), quienes diseñaron injertos de piel a partir de tejido adiposo abdominal subcutáneo humano, con fibrina e hidrogeles de colágeno, siendo estos implantados en ratas tipo Nu (variedad inmunodeficiente) para comprobar la vascularización y la regeneración tisular de los tejidos que de por si ya tienen afectados. La figura 14 señala el tejido producido experimentalmente de forma *in vitro*.

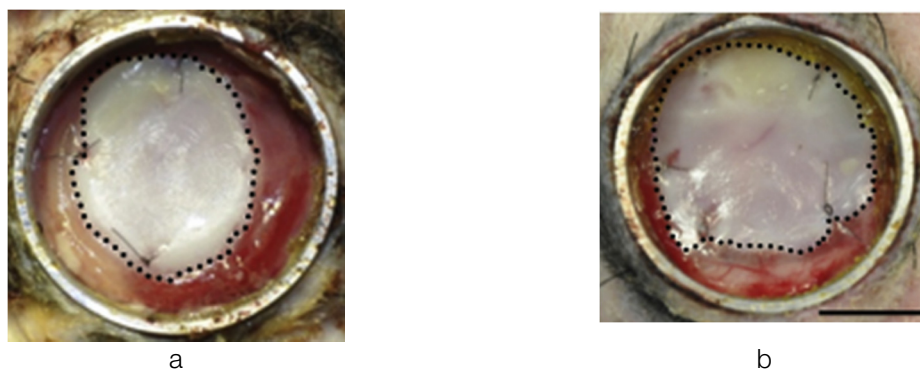


Figura 14. Piel artificial creciendo *in vitro*. Cuarto día (a) y décimo cuarto día (b). Tomado de Klar

5.3 Polímeros naturales en regeneración de tejidos

Son reconocidos por el organismo, y a la vez se adaptan a los tejidos cercanos a la implantación sin que cursen procesos inflamatorios, degradándose mediante vías enzimática o hidrolítica tras un cierto tiempo al interior del cuerpo, generando subproductos fácilmente excretables (13). La tabla 1 menciona algunos de ellos.

Tabla 1. Algunos polímeros naturales. Adaptado de Ratner (13) y Kearns (23)

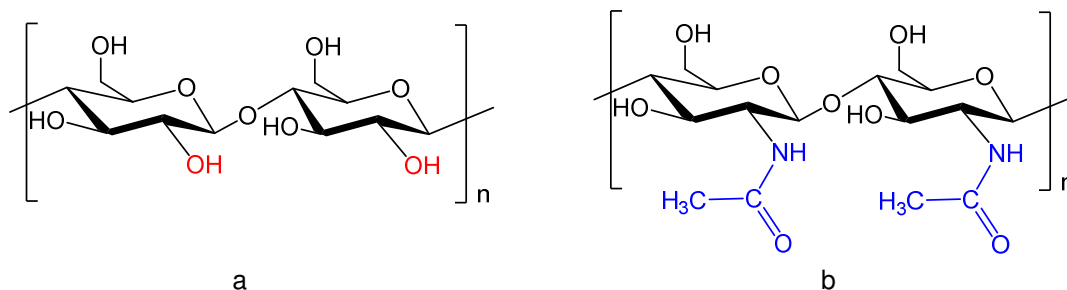
Categoría	Polímero	Sitio donde se produce	Función fisiológica
Proteínas	Seda	Sintetizada por artrópodos	Capullo protector en gusanos; uso en suturas médicas
	Queratina	Cabello y uñas (en humanos). Cuernos y plumas (en animales)	Protección de la epidermis
	Colágeno	Tejido conectivo	Soporte mecánico
	Gelatina	Colágeno parcialmente desnaturalizado	Inhibidor de hemorragias (hemostático)
	Fibrinógeno / Fibrina	Plasma sanguíneo	Coagulación de la sangre
	Elastina	Tejido conectivo	Soporte mecánico y elasticidad
	Actina	Músculos	Contracción y movilidad
	Miosina	Músculos	Contracción y movilidad
	Fibroína de seda	Sintetizada por gusanos de seda o arácnidos	Suturas para tratamiento de heridas, producción de cartílagos, actividad anticoagulante al combinar con heparina.
Poli-sacáridos	Celulosa	Plantas	Soporte mecánico
	Alginato	Algas	Vendajes e hidrogeles, tratamiento de úlceras, uso como material de relleno para heridas y quemaduras
	Amilosa	Plantas	Reserva de energía
	Dextran	Sintetizado por bacterias	Matriz para crecimiento de organismos
	Heparina	Tejido conectivo y plasma	Anticoagulante
	Ácido hialurónico	Tejido conectivo	Vendajes y rellenos dérmicos
	Glucosamino glucanos	Tejidos conectivos	Contribución al soporte mecánico
	Sulfato de Condroitina	Cartílago de tiburón, tejido animal	Suplementos nutricionales y vendajes

Poli-nucleótidos	Ácido desoxirribonucleico (ADN)	Núcleo celular	Síntesis directa de proteínas
	Ácido ribonucleico (ARN)	Núcleo celular	Síntesis directa de proteínas

Para el presente trabajo de investigación, los polímeros naturales a emplear serán quitina y en especial su derivado, el quitosano.

5.3.1 Quitina

Es un polisacárido lineal nitrogenado compuesto por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucopiranosas) mediante enlaces β -(1,4) glucosídicos. Se encuentra presente en artrópodos e insectos, en la pared celular de algunas especies de hongos y por tradición se explota comercialmente de los subproductos de la industria alimentaria marina (3) como lo son exoesqueletos de jaibas, camarones, cangrejos y calamares. Estructuralmente es semejante a la celulosa, la diferencia reside en la presencia del grupo acetamido (-NHCOCH_3) en lugar del grupo hidroxilo sobre el segundo átomo de carbono (ver esquema 2).

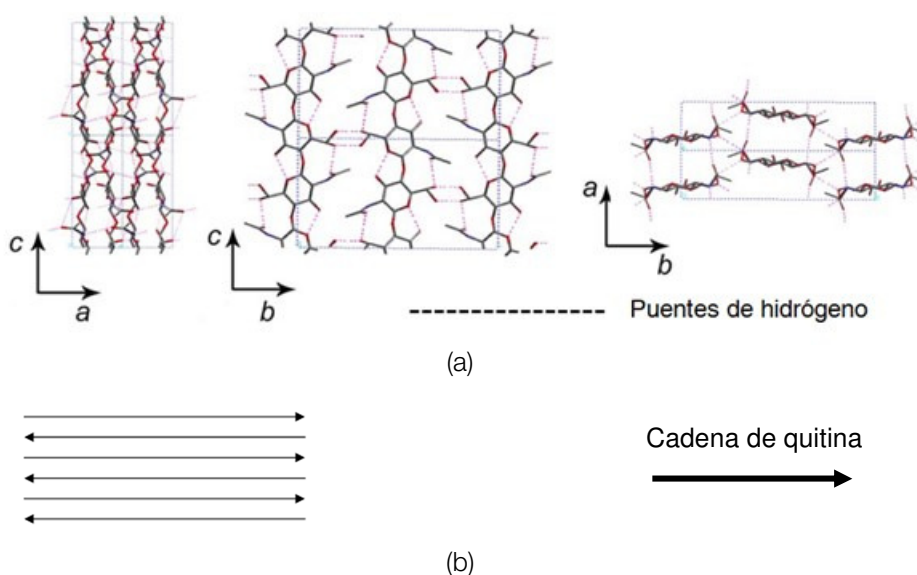


Esquema 2. Estructuras químicas de celulosa (a) y quitina (b). Fuente: autoría propia.

La quitina fue aislada por primera vez de hongos en el año 1811 por el químico Henri Braconnot, quien le dio el nombre de “*fungina*”, luego en 1823 Antoine Odier aisló quitina de la cutícula de escarabajos y le dio el nombre oficial de quitina, que deriva de la palabra griega $\chi\iota\tau\omega\omega\upsilon\upsilon$ “*chiton*” (que significa túnica o envoltura). En 1843 Anselme

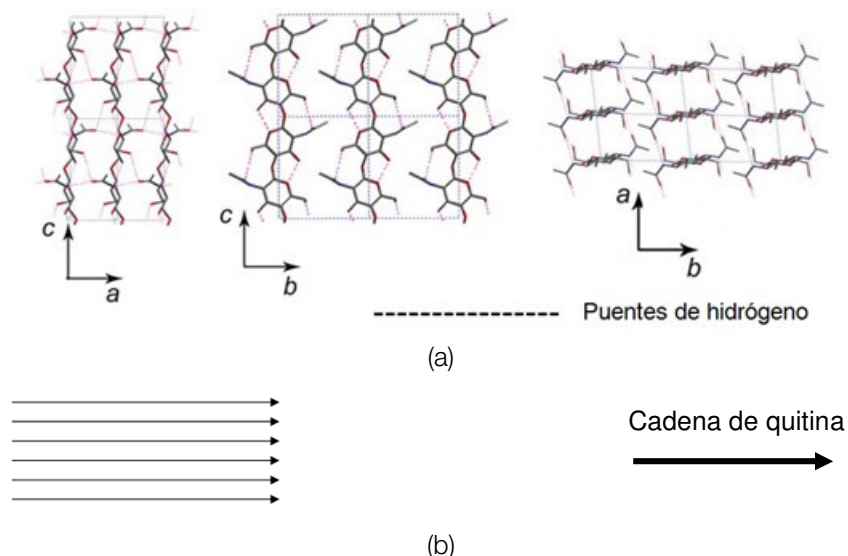
Payen determinó la presencia de nitrógeno en la quitina, en 1876 Georg Ledderhose encontró que los productos de hidrólisis de la quitina eran glucosamina y ácido acético. Finalmente, en 1950, Meyer y sus colaboradores elucidaron la estructura química de la quitina y su unión por enlaces β -(1,4) glucosídicos mediante el uso de rayos X, espectroscopía y análisis enzimáticos (24). En cuanto a propiedades fisicoquímicas, la quitina es insoluble (en agua y disolventes orgánicos comunes) dada la formación de enlaces de hidrógeno (inter e intramoleculares) entre sus cadenas (25). Solamente es soluble en una mezcla de cloruro de litio al 5% en *N,N* dimetilacetamida (LiCl/DMAc), en una solución de CaCl_2 dihidratado saturado en metanol, en solventes apróticos apolares (alcohol hexafluoroisopropílico y hexafluoroacetona), en ácido fosfórico concentrado y en tiocianato de litio (2). Dependiendo de la fuente de aislamiento, existen tres distribuciones estructurales de quitina a saber (2, 26).

α -quitina: corresponde a la distribución más común (ver esquema 3), se encuentra presente en crustáceos, insectos y pared celular de los hongos. Sus cadenas se representan de forma antiparalela (en sentidos contrarios), este tipo de arreglo le proporciona rigidez al polímero, predominando las interacciones intermoleculares.



Esquema 3. Representación tridimensional en diferentes planos (a) y mediante flechas (b) de la α -quitina. Tomado de Rinaudo (2).

β -quitina: se presenta solo en algunos cefalópodos, diatomeas, calamares, algas y protozoarios. Las cadenas se mantienen de forma paralela (un mismo sentido, ver esquema 4). En esta distribución se favorecen los enlaces de hidrógeno intramoleculares. Es una forma inestable que se interconvierte a α -quitina.

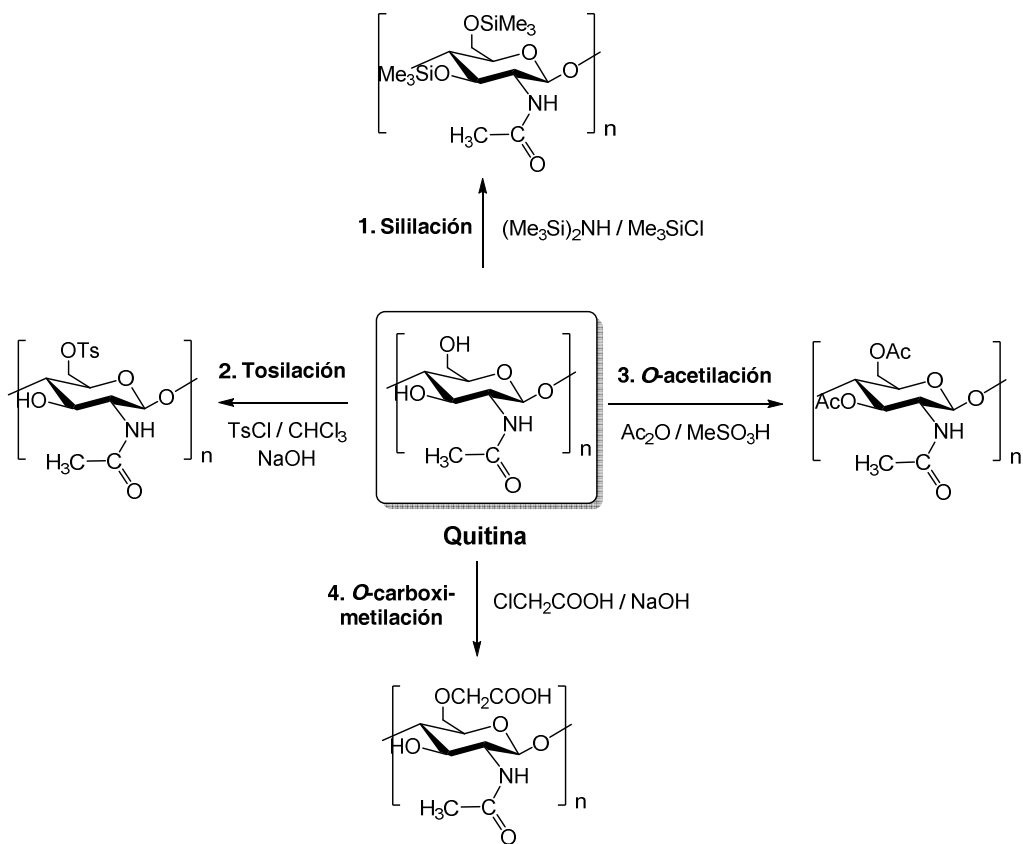


Esquema 4. Representación tridimensional en diferentes planos (a) y mediante flechas (b) de la β -quitina. Tomado de Rinaudo (2).

γ -quitina: no es una distribución estructural verdadera, se considera como una variante inestable que tiende a interconvertirse a la forma alfa, y se representa como una combinación de las formas paralela y antiparalela, respectivamente.

5.3.1.1 Aplicaciones y usos de la quitina

Debido a su escasa solubilidad, son pocas las aplicaciones que presenta la quitina; no obstante los derivados que resultan de su funcionalización química presentan interesantes aplicaciones reportadas en la literatura, como por ejemplo la quitina acetilada, la carboximetilquitina, la trimetilsililquitina y la tosilquitina (5, 25). A continuación se presentan en el esquema 5 que muestra las reacciones de funcionalización de quitina y la tabla 2, en donde se indican las aplicaciones de aquellos derivados.



Esquema 5. Algunas reacciones de funcionalización de quitina. Adaptado de Kurita (5) y Ravi (25)

Tabla 2. Reacciones de obtención de derivados de la quitina y aplicaciones. Tomado de Kurita (5)

Tipo de reacción	Derivado obtenido	Aplicaciones
Siliación	Trimetilsililquitina	Películas por evaporación de acetona como disolvente. Se presenta una mejora en la solubilidad con respecto a la quitina sola (en 1,2 dicloroetano)
Tosilación	Tosilquitina	Alargamiento de cadena en síntesis orgánica para posteriores funcionalizaciones, de acuerdo al carácter del Tosilo como buen grupo saliente, protección de grupos hidroxilo para síntesis orgánica
O-acetilación	Quitina acetilada	Elaboración de productos textiles y vendajes médicos
O-carboximetilación	Carboximetilquitina	Mallas moleculares, quelación de iones metálicos, vendajes médicos para cirugías plásticas, sistemas de microesferas para liberación de medicamentos.

5.3.2 Hongos como fuente de extracción de quitina

5.3.2.1 Composición de la pared celular de los hongos

De manera general, en la pared celular de los hongos se pueden encontrar los compuestos mencionados en la figura 15.

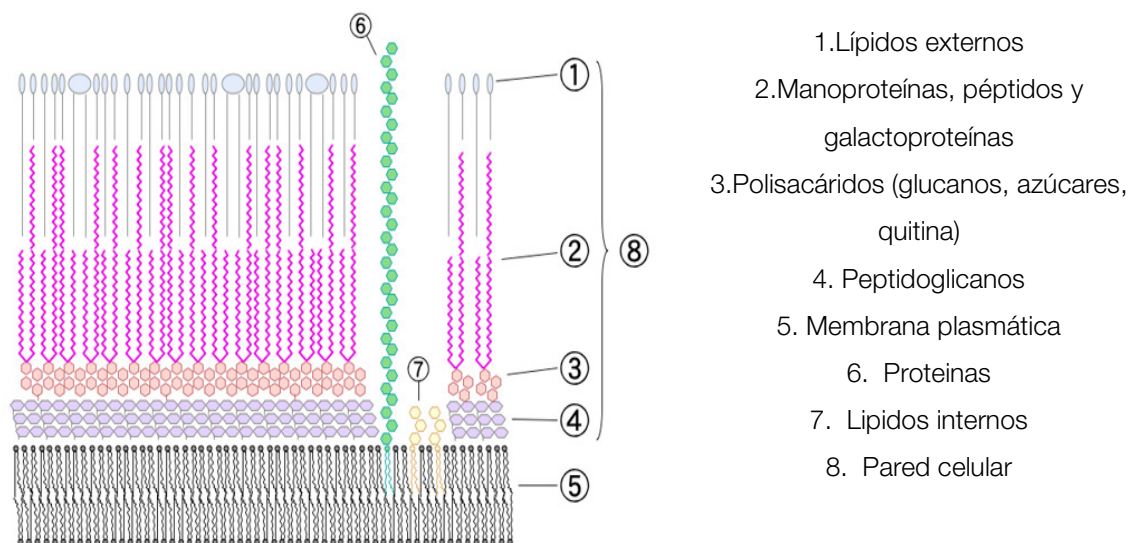


Figura 15. Distribución aproximada de los constituyentes de la pared celular de los hongos.
Adaptado de Cundumí (27)

En la pared celular de los hongos, la quitina se encuentra unida a glucanos mediante enlaces O-glucosídicos tipo beta (1-3 y 1-6), en el grupo de los azúcares se encuentran glucosa, galactosa y manosa, así mismo es posible encontrar aminoácidos (27). La proporción de estos compuestos es variable entre las distintas especies de hongos.

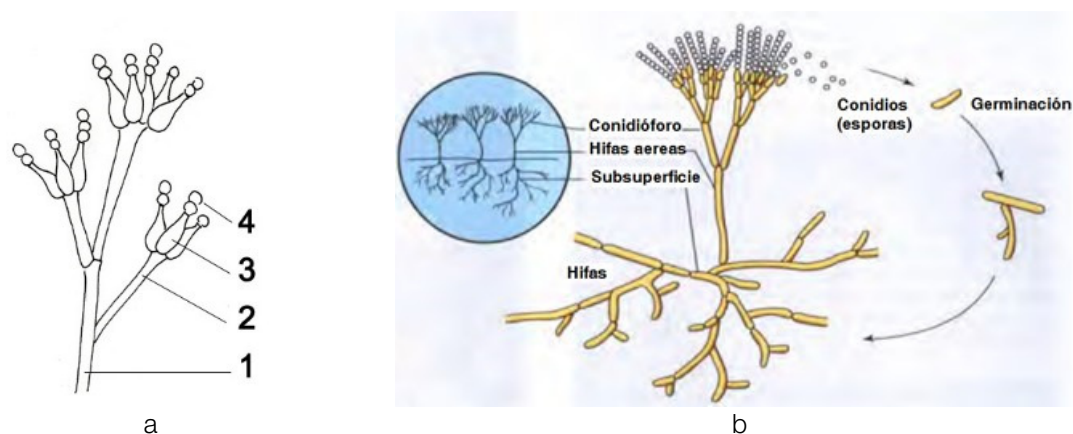
En la tabla 3 se indican cuáles son los polisacáridos presentes en la pared celular de algunas familias de hongos, claro está que no todas poseen quitina, tal es el caso de los *Acrasiomicetes*, *Tricomycetes* y *Oomicetes*. Resalta la atención la familia de los *Deuteromicetes*, a la cual pertenece el hongo *Aspergillus niger*.

Tabla 3. Polisacáridos en la pared celular de algunas familias de hongos, Adaptado de Gadd y Pellizzari (28, 29).

Grupo Taxonómico o Familia	Géneros representativos	Polisacáridos
Acrasiomicetes	<i>Polysphondylium, Dictyostelium</i>	Celulosa-Glucógeno
Oomicetes	<i>Phytophthora, Pythium, Saprolegnia</i>	Celulosa-Glucano
Hifoquitridiomycetes	<i>Rhizidiomyces</i>	Celulosa-Quitina
Zygomycetes	<i>Mucor, Phycomyces, Misorhynchus</i>	Quitina-Quitosano
Quitridiomycetes, Ascomycetes, Deuteromicetes, asidiomicetes	<i>Allomyces, Blastocladiella, Neurospora, Aspergillus, Fomes, Polyporus</i>	Quitina β -(1-3), β-(1-6) -glucano
Ascomycetes	<i>Saccharomyces, Candida</i>	Manana-Glucano
Basidiomicetes	<i>Sporobolomyces, Rhodotorula</i>	Quitina-Glucano
Tricomycetes	<i>Amoebidium</i>	Galactosamina-galactosa

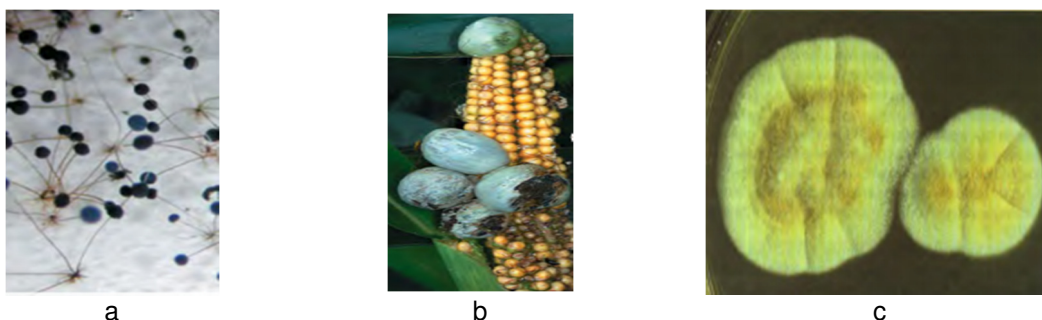
5.3.2.2 Generalidades del hongo *Aspergillus niger* como fuente de quitina.

El género *Aspergillus* perteneciente al grupo de los Deuteromicetes fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo y botánico suizo Marc Micheli. El micelio del hongo *Aspergillus niger* (30) es de tipo filamentoso y se reproduce asexualmente, diseminando las esporas por el aire. La morfología de las esporas e hifas se indica en el esquema 6.



Esquema 6. Partes de una hifa de *Aspergillus niger*: 1. Conidióforo, 2. Métula, 3. Fiálide, 4. Conidos o esporas (a) y reproducción (b). Adaptados de Madigan (30)

Este hongo es el causante de la presencia del moho negro en los vegetales y en el pan, sus esporas sobrevivir durante miles de años, manteniendo intacta su capacidad invasiva y su potencial alergénico (ver esquema 7), siendo causante de Aspergilosis (31), enfermedad que afecta el sistema respiratorio (pulmones y bronquios) por exposición prolongada a las esporas del hongo.



Esquema 7. Diferentes formas de representación del hongo *Aspergillus niger*. Esporas (a), creciendo sobre maíz (b), ambos tomados de Campbell (12); creciendo en una caja Petri (c) tomado de Madigan (30)

En la pared celular del hongo *Aspergillus niger* la quitina se encuentra junto a los glucanos formando microfibrillas en la matriz de la pared celular (26) y esto se representa en la figura 16, que ilustra la distribución de quitina y glucanos en la pared celular. Los β -(1-3)/ β -(1-6) glucanos son polisacáridos que cumplen ciertas funciones en la superficie de la pared celular, como aportar resistencia a la misma frente a infecciones virales, bacterianas y parasitarias(32), mientras que los β -(1-3) glucanos se encuentran asociados físicamente con la quitina, formando el complejo quitino-glucano, que presenta notables aplicaciones en la quelación de metales, separaciones cromatográficas, floculación de materia orgánica como grasas e inmovilización de enzimas (33).

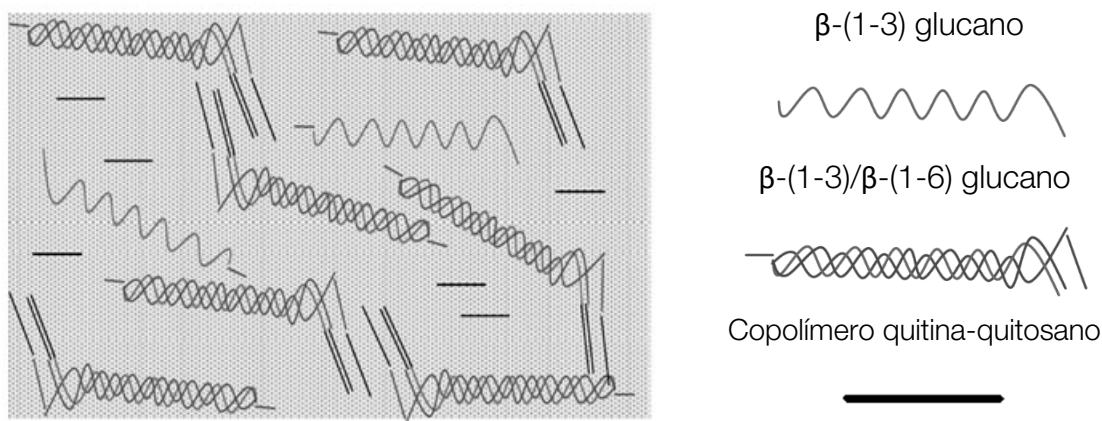
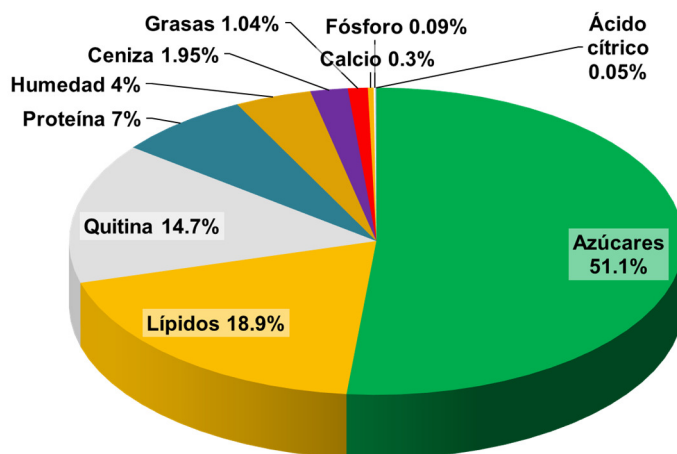


Figura 16. Estructura de la pared celular del hongo *Aspergillus niger*. Adaptado de Kim (26)

De acuerdo a la ficha técnica suministrada por la empresa Sucroal S.A (7), la composición del micelio de *Aspergillus niger*, se indica en la gráfica siguiente.



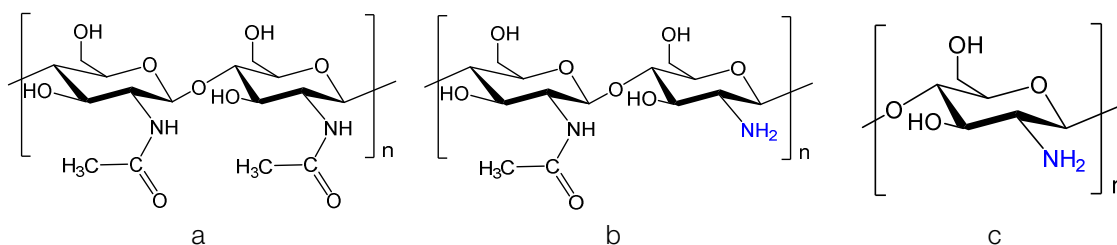
Gráfica 1. Composición del micelio de *Aspergillus niger*. Fuente: autoría propia

5.3.3 El quitosano y sus generalidades

Es un derivado proveniente de la quitina que surge de la hidrólisis en medio básico sobre los grupos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$), consiste en unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (2-acetamida-2-deoxi-β-D-glucopiranos) y D-glucosamina (2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranos) distribuidas aleatoriamente y unidas entre si por enlaces β-

(1,4) glucosídicos. Fue descubierto en el año 1859 por Claude Rouget, quien hidrolizó la quitina con hidróxido de potasio mediante calentamiento. A diferencia de la quitina, el quitosano exhibe una solubilidad apreciable en ácidos orgánicos diluidos (fórmico, acético, cítrico, láctico), y en ácidos minerales diluidos (HCl, H_3PO_4) debido a la presencia del grupo amino ($-\text{NH}_2$) libre en las cadenas del polímero. En 1894 recibe su nombre por el químico alemán Félix Hoppe-Seyler y su estructura fue elucidada en 1950 (24).

Cabe señalar que la solubilidad del quitosano se atribuye al **grado de deacetilación (GD)**, puesto que indica la cantidad de grupos amino libremente distribuidos en la cadena polimérica (34). Una cadena de quitina está completamente acetilada (ver esquema 8a) si presenta solamente grupos acetamido; sin embargo cuando el grado de deacetilación aumenta hasta un 50%, la mitad de los grupos amino y acetamido coexistirán en dicha cadena. Si el porcentaje de deacetilación se eleva, la cantidad de grupos amino y la solubilidad en ácidos diluidos se incrementan (se le considera quitosano, ver esquema 8b). Añadiendo a lo anterior, si la deacetilación de la quitina es completa (100%), se produce un polímero totalmente soluble en medio ácido, denominado quitano (ver esquema 8c) (35, 36). Los factores que afectan el grado de deacetilación incluyen: fuente de origen de la quitina, concentración del medio alcalino, tiempo de la reacción y temperatura de la hidrólisis alcalina.



Esquema 8. Estructuras químicas de quitina (a), quitosano (b) y quitano (c). Fuente: autoría propia.

5.3.3.1 Biocompatibilidad y biodegradabilidad en el quitosano

La biocompatibilidad del quitosano se puede comprobar mediante los lineamientos del estándar ASTM F2475(37), el cual señala que el polímero podría permanecer biológicamente inerte al interior del organismo mientras se realiza la función de regeneración o restauración. Así mismo el material a implantar en modelos experimentales (animales y humanos) no debe presentar toxicidad, alergenicidad o efectos biológicos indeseados (38).

Con respecto a la aplicación definida en esta investigación, ciertas propiedades que presentan las películas como: porosidad, permeabilidad de vapor de agua, intercambio de oxígeno y nutrientes, adherencia, actividad antimicrobiana y resistencia mecánica, hacen del quitosano un material apto para la elaboración de las mismas (39).

El concepto de biodegradabilidad de la norma ASTM D5488-94d (40) establece que ese tipo de materiales son “capaces de descomponerse en moléculas sencillas como dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos y biomasa”; sin embargo los polímeros no siempre se degradan hasta ese punto.

En la naturaleza el quitosano es degradado por la enzima quitinasa (una hidrolasa) presente en bacterias, hongos, plantas, nematodos y en el tracto digestivo de algunos mamíferos que no pueden asimilar el polímero (41). Algunos de los compuestos resultantes de la degradación enzimática corresponden a monómeros de D-glucosamina, *N*-acetil-D-glucosamina, y glucosaminoglucanos, encargados de organizar y dar un funcionamiento adecuado a la matriz extracelular (42).

En los seres humanos la degradación del quitosano se da por acción de las enzimas quitinasa y lisozima (41) siendo estas secretadas por los macrófagos. La enzima quitosanasa, comúnmente aislada de hongos de la familia *Streptomyces* (43) es la encargada de la ruptura de las cadenas del polímero entre los enlaces β -(1,4). Finalmente, la quitina deacetilasa es la enzima responsable de la hidrólisis sobre el

grupo acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) y posterior eliminación del grupo acetilo(44), liberando unidades de D-glucosamina al interior de las cadenas de quitosano.

5.3.4 Extracción de quitosano

5.3.4.1 De subproductos de industria alimentaria marina

El procedimiento de extracción de quitosano de exoesqueletos de camarón consiste generalmente en cuatro etapas, de acuerdo a las metodologías propuestas por Parada y colaboradores en el año 2004 (45), y bajo un contexto local por el investigador Orozco, del departamento de química de la Universidad del Valle en el año 2007 (46):

Limpieza inicial: el material es descarnado manualmente y esterilizado en autoclave, para ser triturado en un molino. El sólido resultante se decolora con la ayuda de solventes orgánicos (éter de petróleo, acetona) u agentes oxidantes suaves (hipoclorito de sodio), dado el color rojo que presenta inicialmente el exoesqueleto de camarón.

Desmineralización: el carbonato de calcio del exoesqueleto de crustáceos se elimina empleando HCl a temperatura ambiente y concentración 1M.

Desproteínización: en este punto, se hidrolizan las proteínas mediante el uso de hidróxidos de sodio o potasio (a una concentración de 4.5% utilizado por Parada y a una concentración del 20% a 95°C empleado por Orozco).

Deacetilación: el material se somete a una hidrólisis alcalina, la concentración de la base necesaria para hidrolizar el grupo acetamido de la quitina y liberar los grupos amino suele ser del orden del 40 – 50% o superior.

Con relación a la caracterización fisicoquímica del quitosano, Parada y colaboradores (45) utilizaron el método de valoración potenciométrica para obtener el grado de deacetilación, siendo del 80.37% y mediante viscosimetría capilar, se obtuvo un peso molecular de 6.22×10^5 g/mol. Por su parte, Abdou y sus colaboradores en el 2008 (47) realizaron un estudio comparativo de diferentes tipos de exoesqueletos de camarón (rosado y café); cangrejos, langostas y calamar, encontrando rendimientos

de reacción entre el 5.4-49.0%, un peso molecular entre $3.9-4.6 \times 10^5$ y un grado de deacetilación entre 80-86%.

Contrario al uso de NaOH, es posible obtener quitosano enzimáticamente, por ello en 2010, Gartner y colaboradores (48) compararon el grado de deacetilación de la hidrólisis enzimática (80.9%) frente al obtenido por la hidrólisis tradicional (91.6%), siendo este último un derivado más deacetilado denominado quitano. Aunque el valor obtenido por el método enzimático es menor, tiene por ventaja que la emisión de efluentes básicos es nula durante la desproteinización de quitina.

5.3.4.2 Extracción de quitosano de hongos

La ventaja de emplear hongos como fuente de quitina y quitosano es que se dan solamente las etapas de hidrólisis básica de la pared celular del hongo, ocurriendo simultáneamente la deacetilación de la quitina hasta llegar al quitosano, el cual es separado mediante un tratamiento posterior con ácido diluido (solubilizándolo), y mediante la etapa de precipitación en presencia de un medio alcalino concentrado se obtiene como un producto sólido. Cabe resaltar que el porcentaje de rendimiento del quitosano puede variar dependiendo de varios factores: la cepa de hongo que se utilice, tipo de fermentación (continua o en “batch”), composición del medio de fermentación (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, iones metálicos presentes y sus respectivas concentraciones) condiciones de fermentación (tamaño del inóculo, tiempo y temperatura de fermentación) y procedimiento de extracción, de acuerdo a lo señalado por Tetsuya (49). Dentro de los hongos que se han utilizado para aislar quitosano, se encuentra el *Mucor rouxii*, obtenido por cultivo en medios nutritivos (papa-dextrosa-agar), utilizado en 1979 por White (50) para obtener quitosano con un rendimiento entre 4-8%. Empleando condiciones similares, en 1997 Synowiecki y Al-Khateeb (51) obtuvieron quitosano del mismo hongo con un rendimiento del 7.3% y un grado de deacetilación de 72.7%. En 1992, Miyoshi y sus colaboradores (52) utilizaron diferentes cepas de hongos (*Absidia Coerulea*, *Mucor rouxii*, *Rhizopus dellemar*, *Mortierrella isabelina* y *Cunninghamella blakesleeana*) obteniendo

porcentajes de rendimiento de extracción para el quitosano entre 1.2 a 10.4%, un rango de pesos moleculares entre 1.0 a 4.5×10^5 g/mol y un rango de grado de deacetilación entre 5-59%.

La especie del hongo ***Absidia*** fue utilizada en dos subgéneros (*glauca* y *coerulea*) para la extracción de quitosano en 2006 por Rungsardthong (53) y en 2008 por Wang y colaboradores (44), encontrándose rendimientos de reacción de 0.6 y 1.28%, y grados de deacetilación de 85 y 86%.

El hongo ***Aspergillus niger*** ha sido estudiado en un contexto local en la Universidad del Valle, siendo usado por primera vez en 1994 por Cundumí y Arango(27) (escuela de ingeniería química), extrayendo quitosano con un rendimiento del 3.83%, en 2009 se dio continuidad a este estudio cuando Balanta (54) (departamento de química) caracterizó el quitosano obtenido, empleándolo como ayudante de coagulación y floculación para tratamiento de aguas de río, obteniendo un rendimiento de 1.07% y un grado de deacetilación del 70%. En 2011 Muñoz (55), del mismo departamento, estableció un diseño experimental, optimizando las condiciones de la extracción del polímero, que utilizó en forma de hidrogeles implantables en modelos animales para la liberación controlada de fármacos, con un rendimiento de 6.93%, peso molecular de 1.49×10^5 g/mol y grado de deacetilación de 77.3%.

Otros investigadores que han estudiado el micelio de *Aspergillus niger* como fuente de quitosano han sido Cai y colaboradores(4), quienes en 2006 compararon la metodología de extracción por hidrólisis alcalina y hidrólisis enzimática, encontrando un peso molecular mayor (2.6×10^5 g/mol) con un grado de deacetilación de 73.6% por hidrólisis enzimática frente al peso molecular encontrado por hidrólisis alcalina (0.84×10^5 g/mol) con un grado de deacetilación de 76.8%. En 2010 Skorik y sus colaboradores (56) emplearon el quitosano aislado como material adsorbente y acomplejante de iones metálicos Cu^{+2} , Zn^{+2} Ni^{+2} y Co^{+2} . En 2011 Kumaresapillai (57) y sus colaboradores utilizaron tres cepas diferentes de *Aspergillus niger* para la producción de quitosano, el cual fue utilizado para probar la actividad antimicrobiana

del quitosano contra cinco bacterias (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi-A*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, y *Pseudomonas aeruginosa*) mediante la técnica de difusión en disco. El polímero fue caracterizado por espectroscopía infrarroja, presentando un rendimiento de 9.1%. En 2012 Mohamed y sus colaboradores utilizaron quitosano de *Aspergillus niger* para elaborar hidrogeles, los cuales fueron caracterizados por espectroscopía infrarroja, SEM y difracción de rayos X. Los hidrogeles se utilizaron contra cinco especies bacterianas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) y dos cepas de hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger*) para comprobar actividad antimicrobiana, que se ve disminuida al incrementar el grado de entrecruzamiento. En el año 2013, Moussa(58) utilizó quitosano aislado de *Aspergillus niger* como un marcador de fluorescencia para control biológico y antibacterial, formando un complejo de fluoresceína, quitosano y isotiocianato para combatir las bacterias *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*. El quitosano interactuó con la pared celular bacteriana, causando la lisis de la pared celular, controlando el crecimiento bacteriano.

5.3.5 Aplicaciones y usos del quitosano

El quitosano presenta interesantes aplicaciones industriales, y por su versatilidad, se le emplea en diferentes presentaciones (hidrogeles, películas, en solución, en perlas o cápsulas). A continuación se presentan algunas de ellas.

Agricultura: actúa como fertilizante por su contenido de nitrógeno, estimula el crecimiento en las plantas y enriquece el suelo por la liberación de nutrientes y fertilizantes (2, 3).

Biotecnología: contribuye en la disminución de la turbiedad del jugo de manzana (53), y en la clarificación de bebidas (jugos de frutas, vino y cerveza) (46) y café (3) eliminando las impurezas presentes sin afectar la apariencia de estas bebidas. Con relación a esto,

Orozco (46) entrecruzó quitosano con glioxal, obteniendo grageas para la clarificación de jugo de mora, con la finalidad de inmovilizar enzimas (pectinasas y celulasas).

Industria alimentaria: se emplea como espesante, gelificante, estabilizante y emulsificante y como mejorador de la textura de los alimentos, ya que fija muy bien el agua y la grasa que estos contienen, también es utilizado como suplemento nutricional (fibra dietética) para la reducción y control del peso corporal (3).

Industria cosmética: por sus propiedades humectantes para la piel y no alergenicidad, se emplea en preparaciones de cremas de manos, lociones de baño y en tratamientos faciales permite eliminar el acné. En el cabello, reduce su carga estática (complementándose con las cargas negativas del cabello), incrementando su suavidad, brillo y fuerza de las hebras (2, 3).

Industria papelera y textil: se emplea como adhesivo en la superficie del papel, aumentando el rendimiento de la pulpa, y la resistencia del papel, brindando una superficie suave y resistente a la humedad (3, 25). En productos textiles y fibras, permite la remoción del tinte presentes en los efluentes de la industria del teñido, al tiempo que permite retener el acabado de la prenda teñida (3)

Medicina e ingeniería de tejidos: permite el crecimiento de células para regenerar tejidos dañados o órganos disfuncionales(59), pudiéndose utilizar en conjunto con otros polímeros sintéticos (PLA y PGA) como matrices de crecimiento celular, en tratamientos de quemaduras y producción de piel artificial (3). Se le puede encontrar en suturas quirúrgicas reabsorbibles, vendajes, fibras, películas absorbibles y comestibles (3, 60, 61). Por su capacidad de retención de humedad y elasticidad, se puede entrecruzar para formar hidrogeles, especialmente para la difusión y liberación controlada de fármacos.(8, 55).

Tratamiento de aguas, remoción de metales, proteínas, tintes y otros contaminantes: actúa como agente acomplejante en la remoción de iones de metales pesados (Pb^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+3}) (62). Así mismo, se ha utilizado en la remoción de

metales pesados de muestras de aguas residuales a diferentes valores de pH, y como floculante de proteínas y grasas por ser un polielectrolito catiónico (63). Actúa como adsorbente (biodegradable y de bajo costo) para tintes y mordientes de industrias textiles (64). Se puede emplear también en limpieza de albercas, de efluentes de industrias alimenticias y de refinerías de petróleo (2, 3). Se ha utilizado también como adsorbente de ácidos húmicos y fúlvicos encontrados en suelos (65). En 2009 el estudio de Balanta y colaboradores realizado en la Universidad del Valle, tuvo por objetivo utilizar quitosano proveniente del micelio de *Aspergillus niger* como agente floculante y coayudante en la eliminación de materia orgánica y lodos procedentes de aguas del río Meléndez, permitiendo reducir hasta en un 50% el uso de FeCl_3 como coagulante primario (54), contribuyendo así a la reducción de costos de esta materia prima.

5.4 Películas a partir de polímeros

Para sus aplicaciones, los polímeros deben ser procesables y transformables ya sea en forma de bloques, fibras, perlas, películas, pudiendo moldearse para obtener la forma deseada. En algunos casos se deben agregar ciertos aditivos para mejorar sus propiedades. En este proyecto se agregaron plastificantes los cuales se describen a continuación.

5.4.1 Plastificantes

Son sustancias que se incorporan a un polímero para mejorar la flexibilidad del mismo, mediante la reducción de la temperatura de transición vítrea (T_g), y consecuentemente la tensión de deformación, la dureza, la densidad, y la viscosidad (66), como consecuencia de ello, la película resultante adquiere flexibilidad y resistencia mecánica, contribuyendo a la calidad de la misma. La interacción entre un polímero y un plastificante se aprecia en la figura 17, en donde el plastificante actúa como un espaciador.

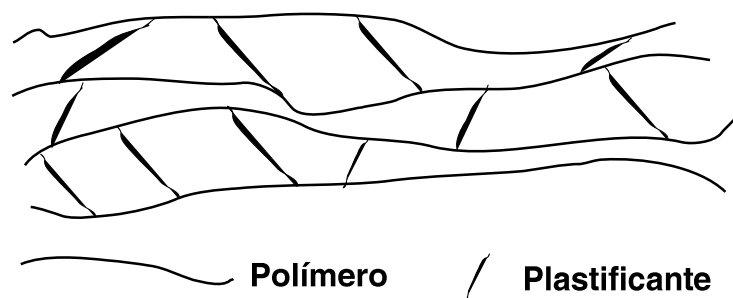


Figura 17. Interacciones entre polímero y un plastificante. Fuente: autoría propia

Los plastificantes pueden ser de tipo **externo**, cuando sus moléculas se unen químicamente a las cadenas del polímero mediante enlaces de hidrógeno, fuerzas intermoleculares, fuerzas de Van der Waals e interacciones iónicas.

Son de tipo **interno** si forman parte de las moléculas del polímero, evitando así el acercamiento entre las cadenas.

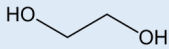
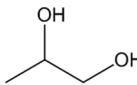
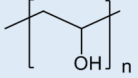
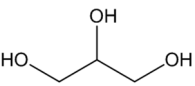
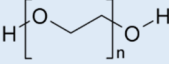
Finalmente, **un plastificante puede presentar comportamiento hidrófilo** si se disuelve en medio acuoso cuando se añade a las dispersiones de polímeros, conduciendo a un aumento en la difusión del agua en el polímero.

En contraste, los **plastificantes se podrían comportar como hidrófobos** cuando disminuyen la absorción de agua, conllevando pérdidas en la flexibilidad, formando zonas discontinuas durante el secado de la película (66, 67)

5.4.2 Plastificantes a emplear en las películas de quitosano

En el caso del quitosano los plastificantes idóneos son los polialcoholes, siendo algunos de ellos: etilenglicol, propilenglicol, glicerol, polietilenglicol y alcohol polivinílico, destacandose por su facilidad al formar enlaces de hidrógeno y ser solubles en medios acuosos. Sus estructuras químicas y propiedades se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Plastificantes en la elaboración de películas de quitosano Tomado de Vieira (66).

Plastificante	Estructura	Propiedades
Etilenglicol		Por su toxicidad no es muy recomendable su uso en películas.
Propilenglicol		Películas flexibles, biocompatibles, estables, buenas propiedades mecánicas
Alcohol polivinílico		Biocompatible, películas demasiado flexibles, estables, buenas propiedades mecánicas
Glicerol		Películas flexibles, biocompatible, estables, buenas propiedades mecánicas, incremento en la elongación del material.
Polietilenglicol		Películas flexibles, biocompatible, estables, buenas propiedades mecánicas. Mejora las propiedades elásticas

5.4.3 Elaboración de películas: método de film casting (evaporación de disolventes)

El método de *film casting* o de evaporación de disolventes consiste en una mezcla del polímero y el plastificante en un solvente adecuado, bajo agitación continua a temperatura ambiente(68). Un requisito que debe cumplirse es que las disoluciones de polímero como de plastificante sean miscibles entre sí (en un mismo medio) y que el o los disolventes se evaporen mediante calentamiento moderado. Usualmente la mezcla es depositada sobre un recipiente, y durante el secado se producen películas que gracias a la acción del plastificante presentan flexibilidad. Es importante encontrar las condiciones adecuadas (solvente, concentración, relación polímero/plastificante) para obtener películas con las propiedades deseadas. En general, los plastificantes deben utilizarse en cantidades inferiores con respecto al polímero, para no causar efectos adversos como la disminución de las propiedades mecánicas e incrementos en la permeabilidad de agua, dada la excesiva separación de las cadenas poliméricas.

Otro de los métodos más usados para preparar películas es el fundido por calentamiento ya sea mediante extrusión o calentamiento entre dos placas.

5.4.4 Aplicaciones de las películas de quitosano

Las películas de quitosano se han empleado en forma de vendajes para el tratamiento de heridas. Estas se prepararon a partir de quitosano diluido (al 1% y 2%) respectivamente, por el método de evaporación de disolventes sin usar plastificante en el año 2000 por Khan y colaboradores (69), y seguidamente en 2004 por Azad (70), quien corroboró la regeneración de tejidos mediante estudios histológicos. Similarmente, en 2007 Zivanovic y sus colaboradores (71) elaboraron películas de quitosano y determinaron sus propiedades mecánicas, al mismo tiempo que estudiaron el efecto antibacterial para controlar cepas de *Escherichia coli*. A diferencia de los anteriores, Cárdenas en 2008 (60, 72), y Vargas en 2009 (39), cada uno junto a sus colaboradores, obtuvieron películas comestibles de quitosano empleando glicerol y ácidos oleico y linoleico como plastificantes, midiendo también sus propiedades mecánicas y realizando estudios histológicos. Por su parte, Zamora (61) produjo en 2010 películas comestibles de quitosano y colágeno disueltos en ácido acético al 0.5% v/v sin usar plastificante. Hasta aquí, los investigadores mencionados han obtenido películas con quitosano extraído de exoesqueletos de camarón. En nuestro laboratorio, Díaz (73), empleó quitosano extraído del micelio de *Aspergillus niger*, con la finalidad de elaborar películas del polímero para el recubrimiento de semillas de maíz, y estudiar su actividad antifúngica. En el 2012 Chávez y sus colaboradores(74), elaboraron películas de quitosano siguiendo una metodología similar a las anteriormente mencionadas, enfocándose solamente en las propiedades mecánicas, comparando las películas obtenidas con películas comerciales. Finalmente, en 2013, Leceta y colaboradores(75) utilizaron películas de quitosano mediante el método film casting, usando ácido acético al 1% con glicerol como plastificante, siendo caracterizadas por espectroscopía IR, análisis termogravimétrico y rayos X. Las películas presentaron flexibilidad y transparencia, para determinar actividad antimicrobial ante *Escherichia coli* y *Lactobacillus plantarum*. Las películas obtenidas presentaron flexibilidad y transparencia.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 Reactivos utilizados

En la tabla 5 se especifican los reactivos utilizados durante el proyecto de investigación tal cual como se adquirieron, sin purificación alguna. Los fármacos administrados a los modelos animales y agentes de tinción empleados en los estudios histológicos son de alta pureza también.

Tabla 5. Reactivos utilizados durante el proyecto de investigación.

Reactivo	Casa comercial	% Pureza
Ácido acético glacial	Sucromiles S.A y JT Baker	99.98 / 99.90
Ácido cítrico trihidratado	Sucromiles S.A	99.90
Ácido clorhídrico	Panreac	37
Ácido láctico	Mol Labs	85
Ácido fórmico	Profinas	99
Ácido fosfórico	Sigma Aldrich	85
Ácido sulfúrico	Merck	99
Ácido oleico	Merck	99
Cloruro de potasio	Merck	99.5
Etanol	Profinas y Sigma aldrich	99 / 99.80
Fosfato monobásico de potasio	Merck	99
Fosfato dibásico de potasio	Merck	98
Ftalato ácido de potasio	Merck	99
Glicerina USP	Agenquímicos S.A	99.71
Micelio seco	Sucromiles S.A	10% humedad
NaOH analítico	Merck	99
NaOH comercial	Agenquímicos S.A	98.22
NaCl	Merck	99.5
Quitosano comercial	Sigma Aldrich	99

6.2 Extracción del quitosano del micelio de *Aspergillus niger*

De acuerdo al protocolo de extracción del quitosano desarrollado en el grupo SIMERQO, las etapas del proceso son las siguientes:

1. Lavado y secado del micelio: se vertieron entre 200 a 500 g de micelio en un recipiente de polipropileno de 10 L y se lavaron cinco veces con 4L de agua para eliminar residuos de las impurezas remanentes de la producción de ácido cítrico (fosfatos, citratos de calcio y azúcares solubles en agua), hasta obtener una solución clara; posteriormente el micelio se introdujo en bandejas metálicas en un horno de secado DiEs (diseños electrónicos especiales) a 60°C durante 48 h hasta alcanzar una masa constante. El micelio seco se almacenó en un recipiente de polietileno de 1 kg de capacidad para su posterior uso.

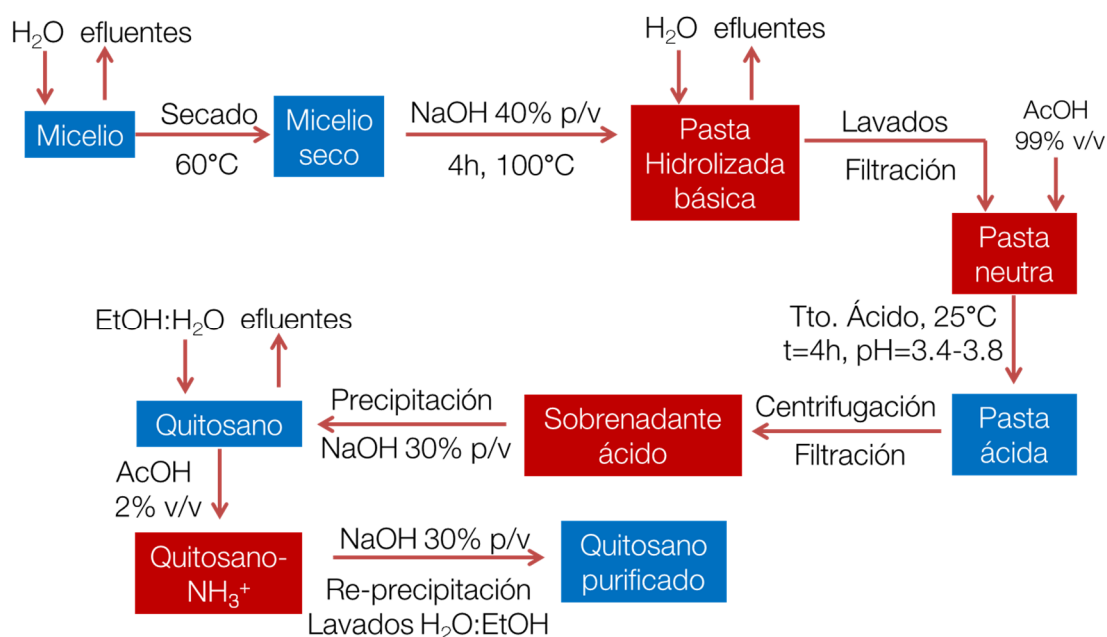
2. Hidrólisis básica del micelio y deacetilación de quitina: en una balanza analítica Ohaus PA214 se pesaron 100.0021 g de micelio lavado y seco, los cuales se transfirieron a un balón de fondo redondo de 1000 mL, se agregaron 500 mL de una solución de NaOH al 40% (p/v) (1 g de micelio seco / 5 mL de solución básica y la mezcla se mantuvo bajo agitación mecánica constante, a una velocidad de 250 rpm usando un agitador mecánico con paleta Heidolph RZR 2020 durante 4 h a una temperatura de 110°C. Tras finalizar la reacción y para retirar cualquier exceso de hidróxido de sodio, la pasta formada, de consistencia semisólida (alrededor de 30 g en base seca) se trasladó a un recipiente de polipropileno de 10 L, se lavó con 4 L de agua y se filtró por gravedad mediante el uso de un filtro de tela. Esta operación se repitió siete veces hasta alcanzar un pH de 7-8 en las aguas del lavado obteniéndose una pasta color crema.

3. Acidificación: a la pasta obtenida (aproximadamente 30 g en base seca) se le adicionaron 3 L de agua destilada, se acidificó con ácido acético glacial al 99% gota a gota (8 mL en total) y se mantuvo bajo agitación mecánica constante, a una velocidad de 250 rpm usando un agitador mecánico con paleta Heidolph RZR 2020 durante 4 h a temperatura ambiente hasta alcanzar un pH entre 3.4-3.8

4. Precipitación del quitosano: el sobrenadante ácido e incoloro de la fase anterior (3 L) se separó de la pasta color crema mediante filtración por gravedad (conservándose la pasta para posteriores extracciones), se transfirió el líquido a un recipiente de 10 L y se basificó vertiendo NaOH al 30% (p/v), gota a gota (21 mL en total) con el fin de precipitar el quitosano, manteniendo una agitación constante a una velocidad de 250 rpm usando un agitador mecánico con paleta Heidolph RZR 2020, hasta alcanzar un pH entre 9-11 y se dejó reposar para que las partículas de quitosano sedimentaran. La separación del polímero se logró mediante centrifugación a una velocidad de 4500 rpm usando una centrífuga International clinical centrifuge model CL durante 10 minutos, empleando botellas de polipropileno de aproximadamente 200 mL de capacidad.

El quitosano obtenido se lavó con una mezcla de etanol y agua destilada en proporción 50:50, y se filtró al vacío usando un embudo Buchner, seguidamente el polímero se introdujo a secado en horno a 60°C por espacio de 24 h, obteniéndose un sólido de color café claro (5.02 g en base seca). La pasta color crema que se separó previo a la precipitación del quitosano (aproximadamente 30 g) se reutilizó en una segunda y tercera extracción del polímero repitiendo los pasos de acidificación y precipitación. Finalmente el polímero se purificó, disolviéndolo en ácido acético al 2% v/v y se reprecipitó empleando NaOH al 30% v/v, con el fin de separarlo de las fracciones quitino-glucanas insolubles remanentes.

El esquema 9 resume todo el protocolo de extracción antes descrito.



Esquema 9. Diagrama de bloques para la extracción del micelio de *Aspergillus niger*. Fuente: autoría propia.

6.3 Identificación y caracterización fisicoquímica del quitosano obtenido

6.3.1 Grado de deacetilación del quitosano obtenido

6.3.1.1 Determinación por análisis elemental

Para encontrar la medición de la relación carbono nitrógeno (C/N) en la muestra de quitosano y compararla en relación a la quitina (100% acetilada) (46, 55, 73) se utilizaron 10 mg de muestra, los cuales se introdujeron en un analizador elemental Thermo Flash EA 1112 Series.

6.3.1.2 Determinación por titulación potenciométrica

De acuerdo a la metodología sugerida por Parada (45), en un vaso de 50 mL, se depositaron 0.5 g de quitosano, se disolvieron con 20 mL de HCl 0.3 M, bajo agitación mecánica a una velocidad de 60 rpm y se adicionó, gota a gota, desde una bureta de 25 mL, una solución de NaOH 0.1 M estandarizada previamente por duplicado con

ftalato ácido de potasio (KHP) 0.1 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Con la ayuda de un pHmetro Schott Gerate CG-820, se determinó gradualmente el pH tras la adición de cada 0.5 mL de NaOH, y la valoración finalizó cuando el pH llegó a 12.

6.3.2 Identificación espectroscópica (FTIR y RMN) del quitosano

La determinación cualitativa de los grupos funcionales del quitosano obtenido se confirmó mediante espectroscopía infrarroja, utilizando el método de pastilla de KBr en un espectrofotómetro IR Thermo Scientific Nicolet 6700, del laboratorio de espectroscopía de la Universidad del Valle.

Igualmente se hizo uso del espectrómetro de RMN Bruker Avance II del mismo laboratorio de espectroscopía, para detectar los núcleos de hidrógeno del quitosano (RMN- ^1H) utilizando 20 mg de muestra, que se depositó en un tubo de vidrio especial para resonancia, y se disolvió utilizando dos gotas de CF_3COOH y 0.5 mL de $\text{DMSO-}d_6$ como solvente deuterado. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura de 25°C y frecuencia de 400 MHz.

Al no poderse observar señales definidas por RMN- ^{13}C convencional, se optó por realizar el experimento de RMN- ^{13}C -CP-MAS (*Cross Polarized Magic Angle Spinning*) o polarización cruzada con ángulo mágico en sólido, el cual se llevó a cabo empleando 10 mg de una muestra de quitosano depositada en un rotor de zirconio de 5 mm de diámetro, con las siguientes condiciones de trabajo: frecuencia de 100 MHz, 653 scans, frecuencia de barrido de 29760 Hz, tiempo de adquisición de 1.10 s, y temperatura de 25°C.

6.3.3 Análisis térmico del quitosano

Los estudios térmicos se realizaron en el grupo de transiciones de fase del departamento de física de la Universidad del Valle. A una muestra de 4.83 mg del quitosano obtenido se le determinó el porcentaje de pérdida de peso mediante análisis termogravimétrico (TGA) en una termobalanza TA Instruments 2050, ajustada en un rango de temperatura de trabajo entre 25-300°C (para evidenciar la estabilidad del

polímero). Posteriormente, usando un calorímetro diferencial de barrido DSC Q100 se le determinó a 5.10 mg de muestra, la temperatura de transición vítrea, en un rango de trabajo entre -89 hasta 320°C con una rampa de calentamiento de 10°C/min.

6.3.4 Determinación del peso molecular del quitosano

En términos generales, la viscosidad es la resistencia de un líquido a fluir cuando se le aplica una fuerza, es decir, los fluidos de viscosidad alta presentarán resistencia a fluir, y en contraste, los fluidos de viscosidad baja fluirán con facilidad. La ecuación 1, correspondiente a la viscosidad es la siguiente(76)

$$\eta = B\rho_b t$$

Ecuación 1

En dicha ecuación η es la viscosidad para cada solución del polímero (en poise), t es el tiempo (s) en que las distintas soluciones pasan desde la marca superior hasta la marca inferior del bulbo del viscosímetro, ρ_b es la densidad (g/mL) de cada solución de quitosano, y B es la constante de trabajo (cm^2/s^2), resultante de la calibración del viscosímetro empleado.

La determinación del peso molecular promedio del quitosano se realizó por viscosimetría capilar, de acuerdo a la metodología de Parada y Kassai (45, 77). Inicialmente se calibró un viscosímetro Ubbelohde con tamaño de capilar OC # 206 utilizando agua, el cual estuvo inmerso durante todas las mediciones en un baño termostático Lauda Alpha RA 8, a 25°C. Posteriormente se depositaron 10 mL de diferentes soluciones diluidas de quitosano (en el orden de 10^{-4} a 10^{-3} g/mL) las cuales fueron preparadas usando una mezcla de ácido acético 0.1 M y NaCl 0.2 M en proporción 1:1. Las medidas del tiempo de caída en que cada solución se desplazaba desde la marca superior a la inferior se repitieron cinco veces para cada muestra (para así corroborar que el tiempo de caída no cambia en una misma medida).

6.3.5 Resumen de métodos de caracterización fisicoquímica del quitosano

En la tabla 6 se agrupan las diversas maneras en que puede ser caracterizado el quitosano, siendo el peso molecular y el grado de deacetilación dos parámetros importantes que definen su uso (según la aplicación que se le vaya a dar al polímero).

Tabla 6. Métodos de caracterización fisicoquímica del quitosano. Fuente: autoría propia.

Propiedad	Forma de caracterización	Información entregada
Estructura molecular	Espectroscopía Infrarroja	Grupos funcionales
	Resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C)	Núcleos de hidrógeno y carbono presentes
	Difracción de rayos X	Carácter amorfo del polímero
Grado de deacetilación	Espectroscopía Infrarroja Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C)* Análisis elemental Valoración potenciométrica	Porcentaje estimado de grupos amino libres en las cadenas del polímero
Peso molecular	Viscosimetría capilar Cromatografía de permeación en gel (GPC)*	Peso molecular promedio en viscosidad (Mv); Peso molecular real del polímero e índice de polidispersidad.
Transiciones térmicas	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) Análisis termogravimétrico (TGA)	Tg (temperatura de transición vítrea); Tm (temperatura de fusión); Td (temperatura de descomposición); pérdida de masa.

* Estas determinaciones no se realizaron

6.4 Elaboración de películas de quitosano

6.4.1 Selección de variables mediante diseño experimental

Se utiliza un diseño experimental para elegir que variables influyen en la formación de las películas, tomando como variables la concentración del polímero (CP), la concentración del glicerol (CG) y la concentración de ácido oleico (CA), a dos niveles (un valor alto y un valor bajo). Así, el diseño factorial resulta ser de tipo 2^k , representado por la siguiente ecuación.

$$\#Exp = r * 2^k$$

Ecuación 2

En la ecuación 2, #Exp es el número de experimentos a realizar, los cuales fueron 16 en total, r es el número de repeticiones (se trabajó por duplicado), la base 2 es el número de niveles para cada variable, y k=3 es el número de variables (ya mencionadas)

El análisis de los datos se realizó con el programa Minitab 16 manteniendo un intervalo de confianza del 95% para evaluar el efecto principal de cada variable y el efecto de interacción entre los mismos sobre la respuesta. El diseño se describe mediante la ecuación 3.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 CG + \beta_2 CP + \beta_3 CA + \beta_{11} CG^2 + \beta_{22} CP^2 + \beta_{33} CA^2 + \beta_{12} CG * CP + \beta_{13} CG * CA + \beta_{23} CP * CA + \varepsilon \quad \text{Ecuación 3}$$

En donde CG, CP y CA son las variables elegidas, β_0, β_1 , hasta β_{23} representan los coeficientes de regresión, con β_0 como intercepto, β_1, β_2 y β_3 son los efectos lineales entre las variables, β_{11}, β_{22} y β_{33} son los efectos cuadráticos entre las variables, β_{12}, β_{13} y β_{23} son las interacciones entre las variables y ε es el error aleatorio. Para simplificar el modelo, solamente se incluyeron los coeficientes que tienen significado estadístico, es decir un valor de error p inferior a 0.05.

6.4.2 Fabricación de películas de quitosano con ácido acético y mezcla plastificante

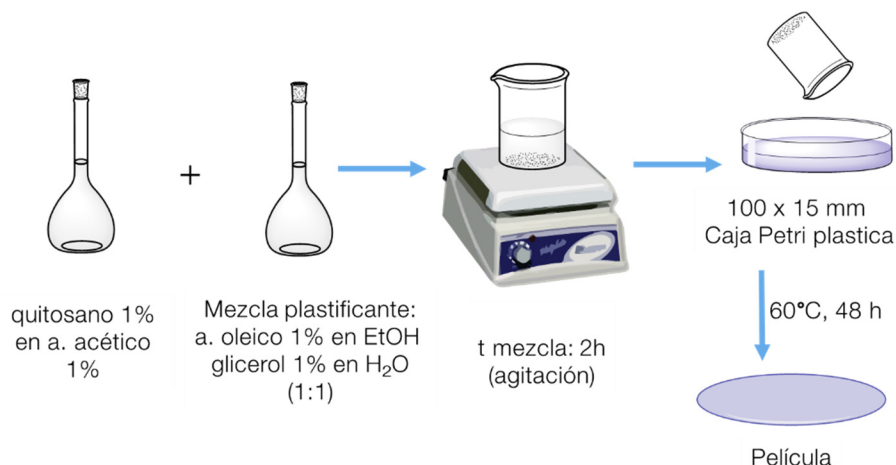
Las películas de quitosano fueron preparadas por el método de *film casting* (39, 60) o evaporación de disolventes de acuerdo a los parámetros proveídos por el diseño experimental. Para tal fin, se preparó una disolución diluida de quitosano al 1% (p/v) disuelto en una solución de ácido acético al 1% (v/v) (previamente preparada con agua desionizada). Para facilitar la desintegración de los gránulos de quitosano, antes de aforar la solución, se introdujo previamente la misma al equipo de ultrasonido Branson 2510, durante una hora, a 30°C, con el fin de evitar la presencia de sólidos en las películas finales. Tras disolver por completo la solución de quitosano, esta se pasa por

membranas de tamaño de poro 0.45 μm . Este procedimiento se repitió, utilizando los ácidos fórmico, clorhídrico, cítrico y fosfórico al 1% v/v.

La mezcla plastificante empleada consistió en ácido oleico al 1% (v/v) disuelto en etanol y glicerina al 1% (v/v) disuelta en agua desionizada, ambas soluciones fueron igualmente filtradas previo a su mezclado por membranas de tamaño de poro 0.45 μm y se utilizaron en una relación 1:1 en volumen, siendo esta la mezcla plastificante.

Para elaborar las películas, se tomaron cajas Petri de polietileno (100 mm de diámetro x 15 mm de altura), con una capacidad de almacenamiento de 20 mL en volumen. En torno a este valor se calculó el volumen de disolución de quitosano y de mezcla plastificante a depositar en las cajas. Las cinco proporciones (polímero: mezcla plastificante) usadas en las películas fueron 50:50; 60:40; 70:30; 80:20 y 90:10.

Para cada proporción, se añadió inicialmente la disolución de quitosano a un vaso de 50 mL, luego se añadió la mezcla de plastificantes lentamente y gota a gota sobre la solución del polímero. La mezcla final se mantuvo bajo agitación mecánica constante usando un agitador magnético Hanna HI 190M durante 2 h a una velocidad de 150 rpm a temperatura ambiente. Tras finalizar el periodo de agitación, la disolución fue transferida a su correspondiente caja Petri, repitiéndose este procedimiento para las demás mezclas. Las cajas se introducen a un horno convencional para permitir la evaporación de los disolventes empleados, a una temperatura de 60°C durante 48 h. Finalizado este tiempo, las películas se desprendieron fácilmente mediante el uso de una espátula de acero o pinzas sujetadoras. El esquema 10 ilustra claramente el procedimiento realizado.



Esquema 10. Preparación de las películas de quitosano. Fuente: autoría propia.

6.4.3 Fabricación de películas de quitosano con diferentes ácidos

Se estudió el efecto que tendría el utilizar ácidos diferentes al ácido acético sobre las películas de quitosano, para tal fin se utilizó una disolución de quitosano en ácido láctico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido fosfórico y ácido clorhídrico (todas a la concentración de 1% p/v o v/v según el caso) siguiendo la metodología antes descrita, con la excepción del uso de mezcla plastificante.

6.4.4 Caracterización de las películas de quitosano obtenidas

6.4.4.1 Difracción de rayos X

En el laboratorio de rayos X del departamento de Física de la Universidad del Valle se tomaron difractogramas de rayos X al quitosano obtenido en forma granular y a las películas elaboradas con dicho polímero, en un difractómetro de Rayos X PANalytical X'Pert Pro Powder, usando un tubo de cobre de 320 mm de diámetro, operado a 45 kV, 40 mA, para contener las muestras durante las mediciones, en un rango de trabajo entre 5 a 120° y 2000 - 6000 scans. Todos estos experimentos se hicieron utilizando la técnica WAXS (*wide angle X-ray scattering* o barrido de rayos X de ángulo amplio).

6.4.4.2 Microscopia electrónica de barrido para las películas obtenidas

Para estudiar la superficie de las películas de quitosano obtenidas se les tomó micrografías a trozos seleccionados de 4 x 4 mm de cada una de las películas haciendo uso del microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6490LV de la escuela de ingeniería de materiales de la Universidad del Valle con aumentos de 200x y 1000x, y a una escala entre 10-100 μm .

6.4.4.3 Ensayos de tensión para las películas obtenidas

De acuerdo a la norma ASTM D638 para ensayos de tensión(78), las películas de quitosano fueron caracterizadas mediante una máquina de ensayos universales Tinius Olsen HK50S en la escuela de ingeniería de materiales de la Universidad del Valle. De cada película se recortaron tiras rectangulares de 20 mm de ancho y 50 mm de altura, siendo sometidas a ensayos de tensión mecánica, habiendo sujetado cada tira en sentido vertical por medio de dos mordazas entre los extremos superior e inferior hasta que ocurriera la falla estructural (rotura de las mismas) a una velocidad de 5 mm/min.

6.4.4.4 Estudios de degradación hidrolítica (*in vitro*)

A las películas de quitosano elaboradas, se les realizó un estudio de degradación hidrolítica, de acuerdo a la norma ASTM F1635-11(79). Para ello se empleó una solución reguladora de fosfatos (pH 7.47), a una temperatura de 37°C. La solución se preparó empleando agua desionizada, y las siguientes sales con su respectiva concentración: NaCl (137 mM), KCl (2.68 mM), K_2HPO_4 (10.14 mM) y KH_2PO_4 (1.76 mM). La solución se ajustó al pH requerido con HCl o NaOH 0.1 M según el caso. Se cortaron trozos pequeños de cada una de las películas (150 mg) y se introdujeron en tubos con tapa rosca que se llenaban hasta su totalidad con 10 mL de la solución reguladora de fosfatos. Todos los tubos se colocaron al interior de la cámara de degradación construida en el grupo de investigación SIMERQO, que consta de un termostato para mantener regulada la temperatura a 37°C durante 35 días (siete semanas). Cada 3 o 4 días se retiraban las muestras, a las que se le tomaba su peso

húmedo tras secarlas con una toalla de papel, se lavaban con agua desionizada y se secaban en horno a 60°C durante 48 h hasta que el peso de cada una de las muestras fuese constante. Pasado este tiempo, el material seco se introdujo de nuevo en su tubo correspondiente para repetir de nuevo el ciclo. Se calculó la pérdida de peso de acuerdo a la ecuación 4 (55, 61, 67).

$$W_l = \left(\frac{W_i - W_f}{W_i} \right) \times 100\% \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde W_l representa el porcentaje de pérdida de peso, W_i el peso inicial de cada película seca y W_f el peso final de cada una de las películas secas luego de haberse degradado.

6.5 Estudio con modelos animales e implantación *in vivo*

6.5.1 Procedimiento pre-quirúrgico

El comportamiento de biocompatibilidad en las películas de quitosano se estudió en la Universidad del Valle sede San Fernando, empleando modelos animales, los cuales fueron cinco ratas Wistar albinas de la especie *Rattus norvegicus*. A las ratas, de un año de edad, y 180-220 g de peso, les fueron implantadas muestras de algunas de las películas de quitosano extraído y comercial (proporciones 80:20, 90:10 y 100:0).

Las ratas fueron mantenidas en nichos individuales en un bioterio, sitio en donde se dieron las condiciones idóneas para la estancia de los modelos animales, en cuanto a alimentación y cuidados se refiere, bajo un constante monitoreo.

6.5.2 Procedimiento quirúrgico

El procedimiento quirúrgico se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos y reconocidos internacionalmente por la norma ISO 10993 sección 6 (80), contando con el aval del comité de ética animal de la Universidad del Valle, siendo realizado en la sede San Fernando. Los modelos animales fueron pesados para determinar las dosis de los medicamentos anestésicos a administrar, hasta conseguir el nivel de sedación deseado. En cada modelo animal se empleó una mezcla de barbitúricos: maleato de acepromacina (0,6 mg/kg, vía Intramuscular); xilacina al 2% (0.6 mg/kg, vía

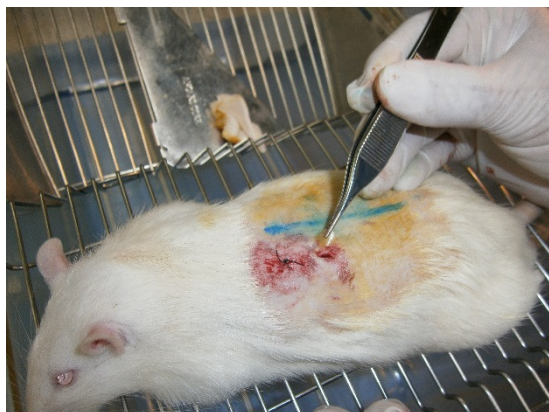
intramuscular) y ketamina (0.7 mg/kg, vía Intramuscular). Seguidamente se determinó que el material experimental ingresaría en localización subdérmica con un periodo de implantación de 21 días. A cada uno de los modelos se le desinfectó la región central dorsal con Isodine solución (yodopovidona) (ver figura 18a), después se realizó una incisión de 2 cm de longitud en la línea media dorsal, con mango de bisturí # 3 y hoja # 15 hasta llegar al tejido subcutáneo (ver figura 18b). Utilizando pinzas romas se crearon tres bolsas subcutáneas a cada lado de la línea media (ver figura 18c) y se introdujo en las del lado derecho el material experimental (películas de quitosano con plastificante), y al lado izquierdo el material de control (películas de quitosano comercial).



a



b



c



d

Figura 18. Procedimiento de implantación de las películas de quitosano: rasurado y desinfección (a); incisión en la epidermis (b); implantación de las películas (c); sutura de la zona dorsal (d).

La incisión quirúrgica fue cerrada con sutura absorbible del tipo 4.0 realizando puntos simples a nivel cutáneo, y se aplicó el antibiótico gentamicina por vía tópica para proteger el área suturada (ver figura 18d). En los cuidados postoperatorios se aplicó clindamicina (600 mg/Kg, vía intramuscular) y tramadol (2mg/kg, vía intramuscular), en los 5 días siguientes se suministró acetaminofén en gotas para combatir el dolor.

6.5.3 Procedimiento de eutanasia y recuperación de las muestras en las zonas implantadas

Después de 21 días de estudio, en el bioterio de la Universidad del Valle sede San Fernando se le administró a todos los modelos animales Eutanex comercial® (pentobarbital sódico 390 mg y difenilhidantoína sódica 50 mg, 0.04 mL/kg, vía intraperitoneal) para sacrificarlos. Las muestras para análisis histológico se tomaron del tejido conectivo circundante a la implantación, y se fijaron en una solución reguladora de fenol y TRIS HCl 10 mM con EDTA 1mM a pH 8.0, mediante el método de inclusión en parafina. Como agentes de tinción celular se utilizaron hematoxilina y eosina.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Extracción del quitosano del micelio de *Aspergillus niger*

Durante la hidrólisis en medio fuertemente alcalino del micelio de *Aspergillus niger* ocurrió la ruptura de la pared celular con la liberación de los componentes de la misma, es decir proteínas, azúcares y en particular el complejo quitino-glucano (ver estructura propuesta en la figura 19).

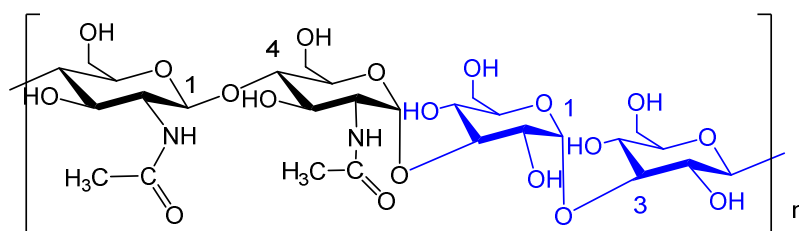


Figura 19. Estructura propuesta del complejo quitino-glucano con unión β -(1-3) entre quitina (negro) y glucano (azul). Fuente: autoría propia

A medida que la reacción transcurre ante el cambio de pH y el aumento progresivo de la temperatura, las proteínas se desnaturalizan, perdiendo así sus estructuras tridimensionales (terciaria y cuaternaria), para transformarse en una larga hebra de péptidos y aminoácidos conocida como estructura primaria, resultando en la formación de una pasta de consistencia blanda, indicando que el micelio se degradó.

En el caso de los azúcares, el aumento de temperatura ocasionó que estos se degradaran y como consecuencia de ello, la pasta blanda fue impregnada de un color pardo. Estos azúcares degradados se separaron completamente de la pasta por medio de lavados sucesivos con agua, resultando un efluente de color café y pH alcalino. Por otra parte, la pasta blanda corresponde al complejo quitino-glucano

(insoluble en agua, y una masa en base seca de 27.1215 g) que mediante hidrólisis alcalina sobre los enlaces glucosídicos, se separó en dos polisacáridos: quitina y glucanos, de acuerdo a la reacción propuesta en la figura 20a.

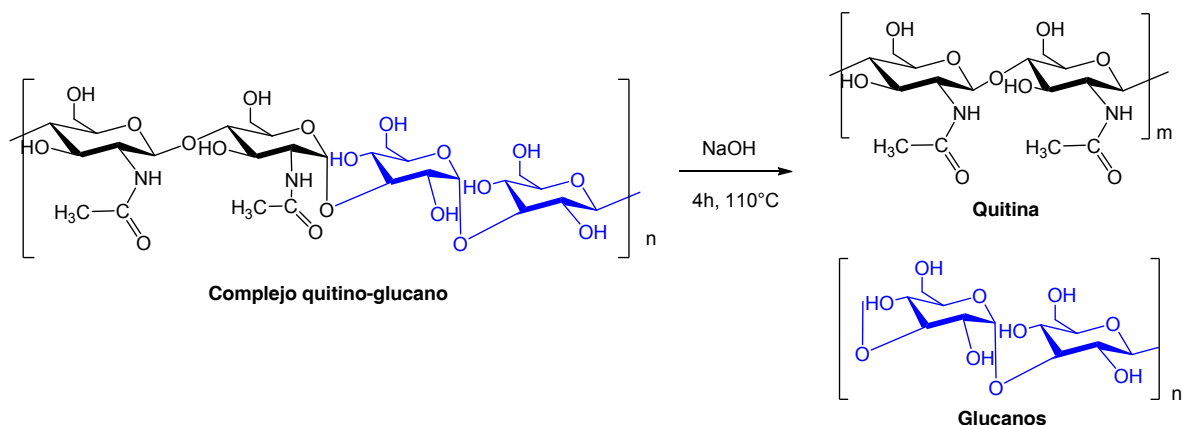


Figura 20a Hidrólisis básica del complejo quitino-glucano. Fuente: autoría propia.

Estando ya separada la quitina, ocurrió la hidrólisis básica sobre los grupos acetamido (deacetilación), para dar lugar a la formación del quitosano, de acuerdo a la reacción que se indica en la figura 20b.

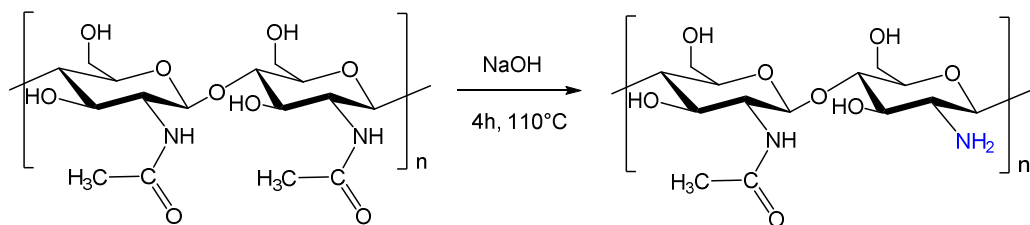


Figura 20b. Deacetilación de quitina para producir quitosano. Fuente: autoría propia.

El mecanismo propuesto de obtención del quitosano a partir de quitina se puede representar de la siguiente manera, de acuerdo a lo indicado en la figura 21.

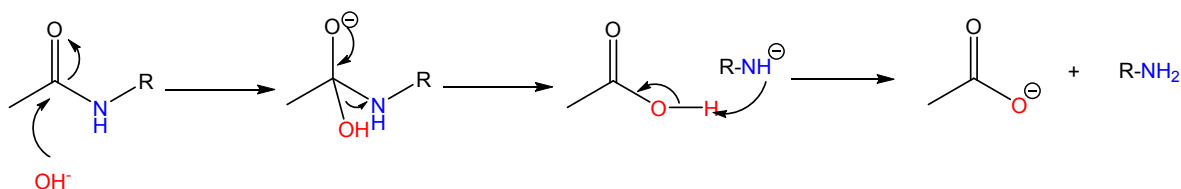


Figura 21. Mecanismo de hidrólisis de la quitina hacia quitosano. El grupo R es el extremo o fracción azúcar de la D-glucosamina. Fuente: autoría propia.

Para comprender dicho mecanismo, después de realizado el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo del grupo acetamido, el temporal e inestable complejo tetraédrico se rompe, originando la salida del grupo amino cargado negativamente, que posteriormente neutraliza su carga arrebatándole un protón al ácido acético, quedando así el quitosano protonado y el ion acetato en solución.

El quitosano (insoluble en agua y en medio alcalino) permanece unido a la pasta blanda, junto a los glucanos y para separarlo fue necesario modificar el pH del medio, llevándolo hasta el rango de 3.4-3.8, mediante el uso de ácido acético, el cual protona los grupos amino libres del quitosano, haciéndolo soluble en la solución acuosa ácida. Una de las ventajas al utilizar ácido acético es que no se requirió de calentamiento posterior para solubilizar al quitosano a diferencia, por ejemplo respecto al uso de HCl (81). La separación completa del ahora quitosano protonado se da mediante centrifugación (y posteriormente filtración), permaneciendo el polímero en el sobrenadante, ya que los elementos mas densos (en este caso los glucanos insolubles en agua) se asientan al fondo de los recipientes utilizados.

Finalmente, el quitosano se precipita de la disolución acuosa tras la adición de NaOH al 30% p/v habiendo alcanzado un pH entre 9-11, teniendo en cuenta el comportamiento de una amina primaria ante un equilibrio ácido base como el mostrado en la figura 22.

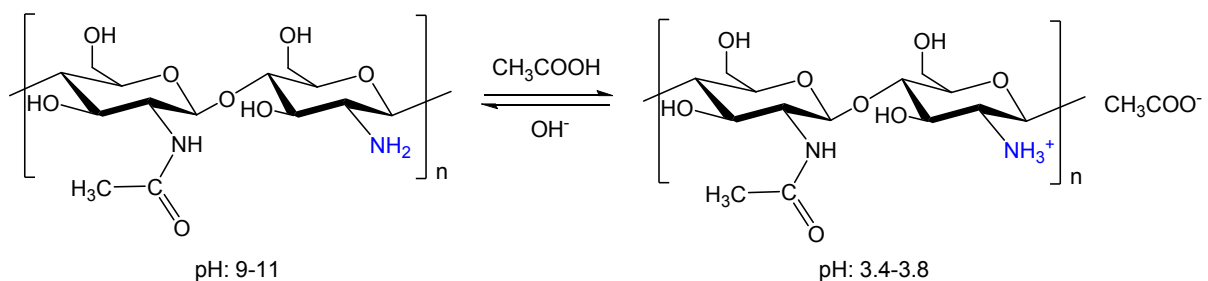


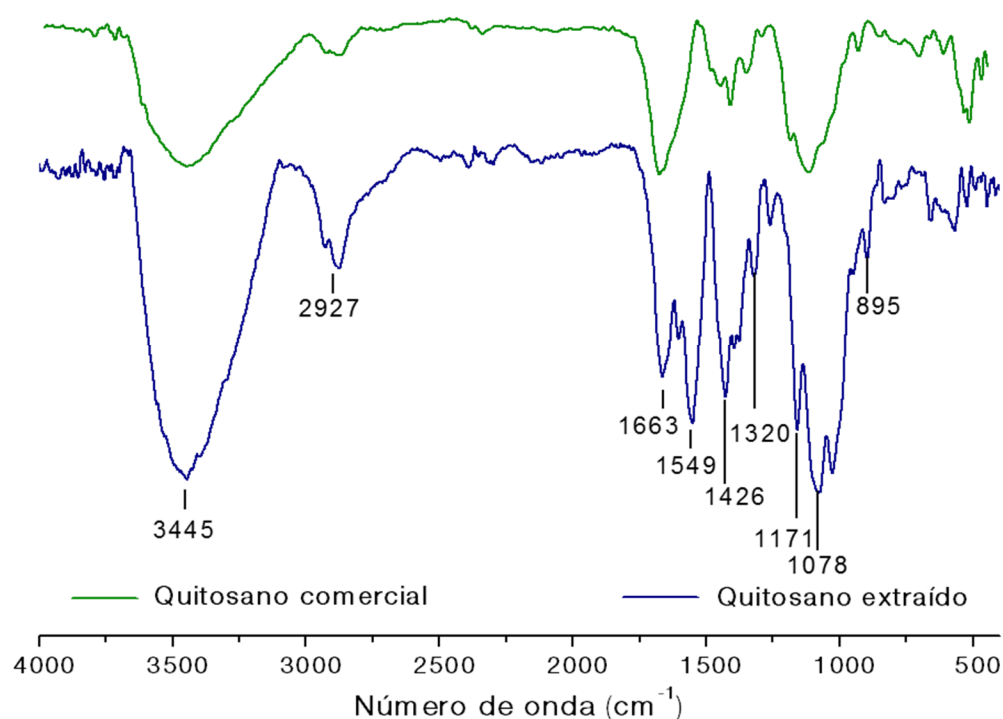
Figura 22. Equilibrio ácido base en el quitosano. Fuente: autoría propia

El exceso de hidróxido de sodio y las posibles impurezas que tuviera el quitosano se eliminaron mediante lavados con agua y etanol, siendo este un método de purificación sencillo, ya que dada la ausencia de subproductos, la reacción no requería un mayor grado de purificación. Cabe destacar que el rendimiento obtenido para esta extracción, fue del 5.02% (5.02 g de quitosano extraído sobre 100 g de micelio seco) comparable al obtenido en estudios previos con quitosano de *Aspergillus niger* en nuestro grupo de investigación SIMERQO por Muñoz (6.93%) (55) y Díaz (6.2%) (73), siendo superior al reportado por Cundumí (3.83%) (27) y al obtenido previamente por el autor en su tesis de pregrado (1.07%) (54). Por otro lado, investigadores japoneses estudiaron durante once años el proceso de producción de quitosano empleando varias especies de hongos y obtuvieron rendimientos de extracción que varían entre 2.29 y 12.7% dependiendo de muchas variables como la cepa de hongo que se utilice, tipo de fermentación (continua o en “batch”), composición del medio de fermentación, condiciones de fermentación y procedimiento de extracción (49). Según Miyoshi y sus colaboradores (52) utilizaron diferentes cepas de hongos (*Absidia Coerulea*, *Mucor rouxii*, *Rhizopus dellemar*, *Mortierrella isabelina* y *Cunninghamella blakesleeana*) obteniendo porcentajes de rendimiento de extracción para el quitosano entre 1.2 y 10.4%, un rango de pesos moleculares entre 1.0 a 4.5×10^5 g/mol y un rango de grado de deacetilación entre 5-59%, Como se observa el rendimiento obtenido en esta investigación cae dentro de los rangos antes mencionados teniendo en cuenta los diferentes factores que pueden afectar su valor.

7.2 Caracterización fisicoquímica del quitosano obtenido

7.2.1 Espectroscopía infrarroja del quitosano

Para la determinación de los grupos funcionales del polímero, se han superpuesto los espectros de infrarrojo del quitosano obtenido y del quitosano comercial, encontrando que son muy similares, ya que prácticamente aparecen las mismas bandas (ver gráfica 2).



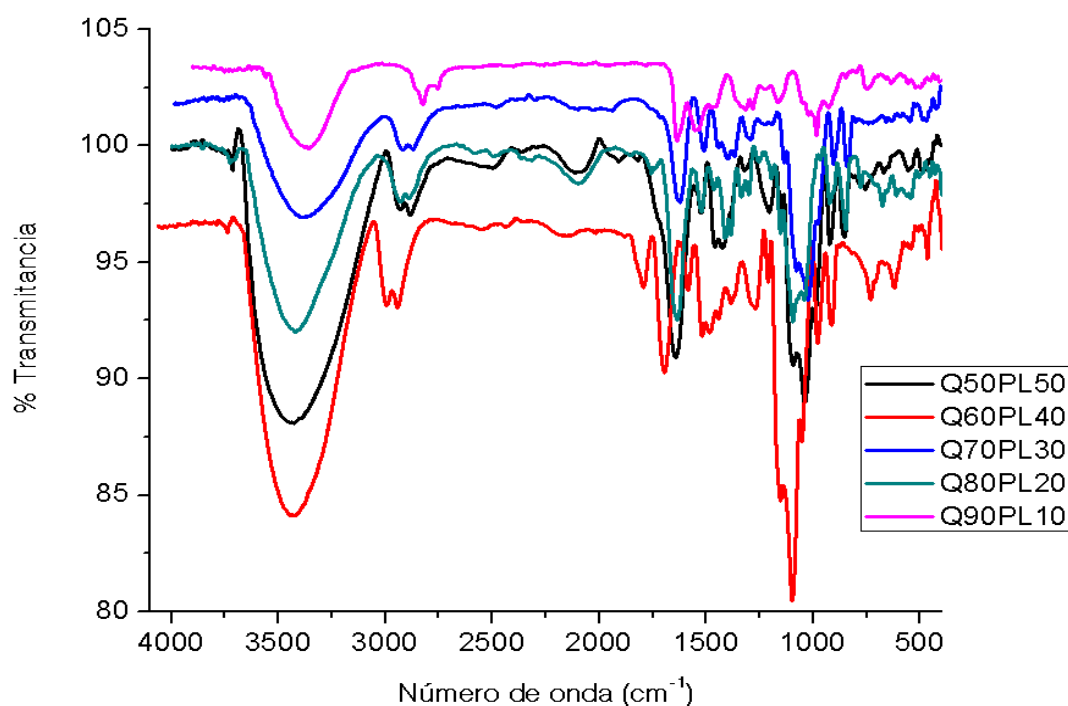
Gráfica 2. Espectros de infrarrojo del quitosano extraído y del quitosano comercial.

Se logra apreciar la vibración de tensión del grupo amino (ν N-H) en 3445 cm^{-1} como una banda amplia y ancha, sin embargo no se logra apreciar el doblete característico de las aminas primarias, debido al solapamiento con las vibraciones de tensión aportadas por los grupos hidroxilo (ν O-H). Enseguida, a 2927 cm^{-1} aparece la vibración de tensión simétrica de los enlaces carbono - hidrógeno (ν_s C-H), luego en 1663 cm^{-1} aparece la vibración de tensión del grupo carbonilo (ν C=O) perteneciente

al grupo acetamido, correspondiente a la banda de amida tipo I por ser una amida N sustituida, mientras que la banda de amida tipo II relacionada con la vibración de deformación (ν N-H) aparece en 1549 cm^{-1} . La vibración de deformación en tijera para los grupos metileno (δ_s C-H) aparece a 1426 cm^{-1} , la vibración de tensión del enlace (ν C-N) conocida como banda de amida tipo III, que se aprecia a 1320 cm^{-1} , después se logra divisar que a 1171 cm^{-1} aparece la vibración de tensión del enlace C-O simple (ν C-O). Finalmente, las bandas localizadas a 1078 y 895 cm^{-1} indican que hay una unión mediante enlaces β -(1,4) glucosídicos en el quitosano, correspondiente al enlace C-O-C (82). Tras haber analizado el espectro infrarrojo del quitosano obtenido no se evidencian bandas debidas a impurezas o subproductos, o disolventes con que se hicieron los lavados, con lo que se asume que el quitosano estaba purificado.

Para evitar comparar todas las bandas de los grupos funcionales del quitosano con espectros infrarrojos de la literatura, destacando en particular las asociadas a la vibración de tensión del grupo carbonilo o banda de amida tipo I (1660 - 1630 cm^{-1}) y la banda de vibración de tensión de los enlaces N-H y O-H (3419 - 3450 cm^{-1}) reportadas por Kumirska (82) y Pawlak (83), coincidiendo con las asignadas para el quitosano obtenido.

Ahora, con relación a los espectros infrarrojo de las películas de quitosano (ver gráfica 3) estas conservan las bandas anteriormente discutidas, con la diferencia que la vibración de tensión del grupo amino (ν N-H) ahora se encuentra solapada con las vibraciones de tensión de los grupos hidroxilo (ν O-H) del polímero, del glicerol y del ácido oleico, alrededor de 3400 cm^{-1} , a 2920 cm^{-1} aparece la vibración de tensión simétrica de los enlaces carbono - hidrógeno (ν_s C-H) tanto del glicerol como del ácido oleico, y alrededor de 1700 cm^{-1} se aprecia débilmente la vibración de tensión del grupo carbonilo (ν C=O) para el ácido oleico, finalmente, cerca de 1600 cm^{-1} aparecen bandas de intensidad media, que representan la vibración de tensión del enlace vinílico (ν C=C).



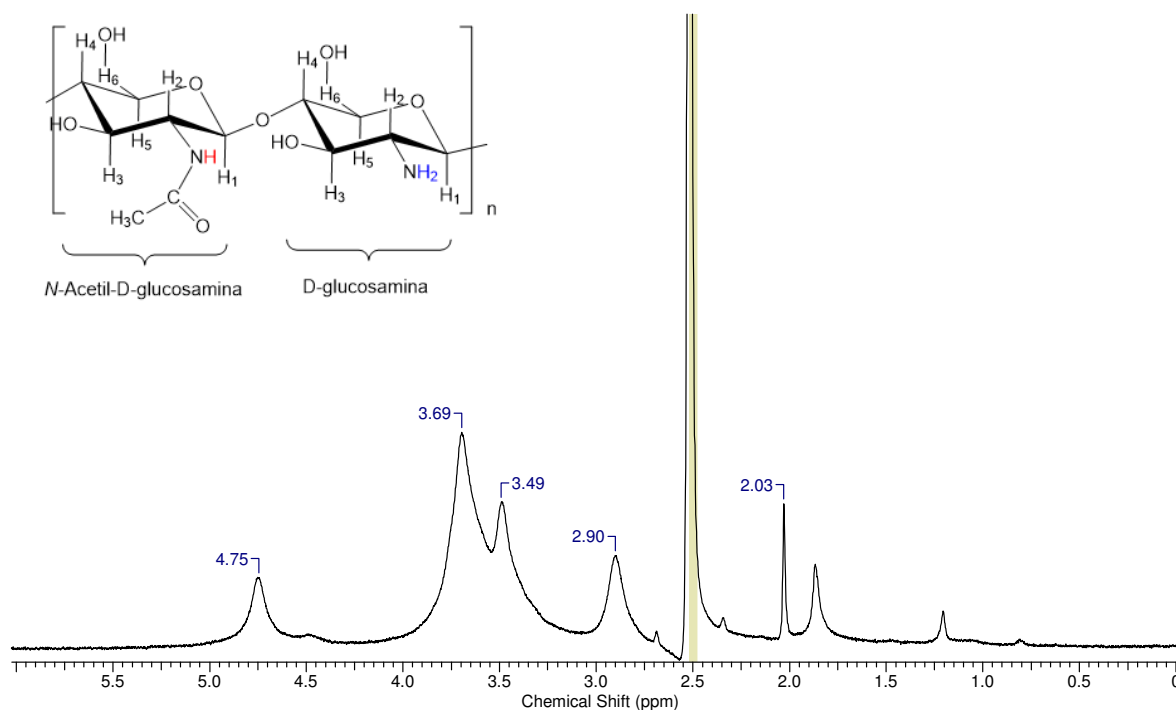
Gráfica 3. Espectros de infrarrojo de las películas de quitosano elaboradas. Q: Quitosano y PL: plastificante.

Las diferencias entre los espectros infrarrojos de las películas se deben a la cantidad de mezcla plastificante adicionada (glicérol y ácido oleico), es por ello que la banda asociada a los grupos -OH del glicérol se ve más intensa en las películas de proporciones 50:50, 60:40 frente a lo observado en las películas donde hay menos contenido de mezcla plastificante (80:20 y 90:10) respectivamente. En los espectros de infrarrojo de la gráfica 3 no se encontraron bandas que indiquen impurezas en las películas obtenidas. Las bandas observadas coinciden con las ya reportadas por Leceta (68) quien trabajó con películas de quitosano y glicérol, y Cárdenas (72) quien trabajó con películas de quitosano, ácido oleico y glicérol.

7.2.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C -CP-MAS) del quitosano

Con respecto al espectro de resonancia magnética protónica, en el quitosano se encuentran las siguientes señales: a 2.03 ppm aparece como un singlete la señal relacionada al grupo metilo de la fracción acetamido (NHCOCH_3) de la *N*-acetil-D-

glucosamina, a 2.90 ppm surge la señal correspondiente al protón H2 de la D-glucosamina, la región comprendida entre 3.49 - 3.69 ppm muestra las señales solapadas de los protones H3-H6 de las unidades de D-glucosamina y *N*-acetil-D-glucosamina, en 3.69 ppm aparece superpuesta la señal correspondiente a los hidrógenos del grupo amino, a 4.75 ppm aparece la señal del protón H1 correspondiente a la D-glucosamina. No se exhibe la señal correspondiente a los grupos amino libres, y la señal del disolvente empleado (DMSO-*d*6) aparece a 2.53 ppm. Estas señales se aprecian en la gráfica 4.

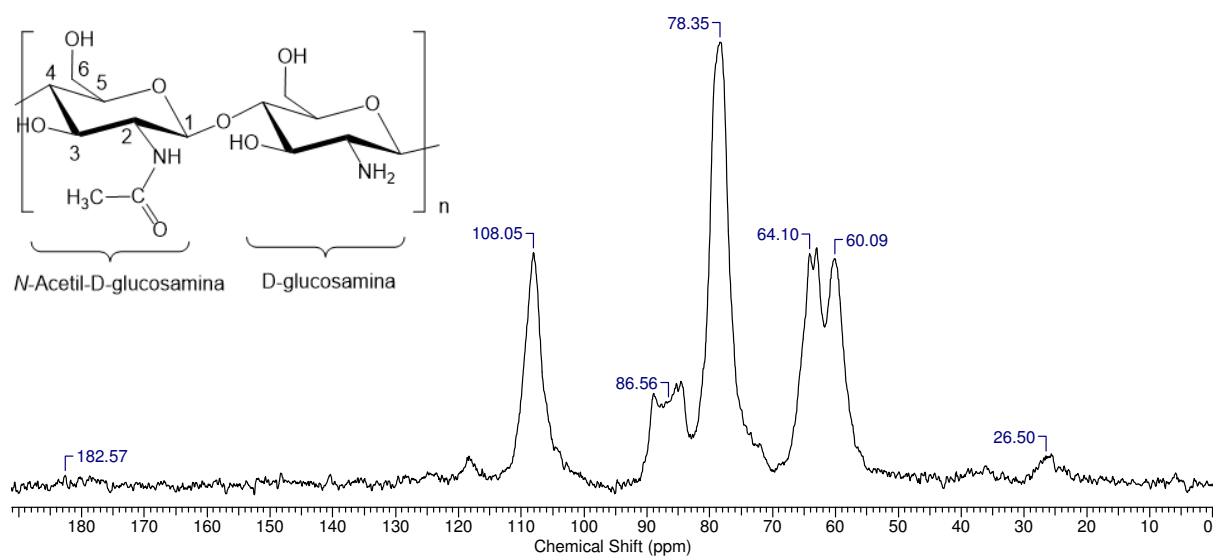


Gráfica 4. Espectro RMN- ^1H de quitosano en $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{DMSO-}d_6$ (25 °C, 400 MHz)

Del espectro se puede inferir que las señales solapadas se pueden atribuir que a las cadenas del polímero se encontraban muy unidas impidiendo distinguir los núcleos individuales, por ejemplo, de los protones H3-H6. El solapamiento también podría reflejar la pérdida de la cristalinidad cuando ocurre la deacetilación de quitina, ya que

en ella se dan varios enlaces de hidrógeno intramoleculares, los cuales le confieren un ordenamiento estructural (2).

Ahora, con respecto al espectro de resonancia magnética de carbono del quitosano, (ver gráfica 5) la asignación de señales es la siguiente: a 26.50 ppm aparece la señal correspondiente al grupo metilo de la fracción acetamido; la señal perteneciente al C2 aparece en 60.09 ppm; luego se aprecia la señal del C6 en 64.10 ppm; las señales de los carbonos C3 y C5 aparecen enseguida en 78.35 ppm, en el caso del C4 su señal aparece en 86.56 ppm; seguidamente, la señal de C1 aparece a 108.05 ppm y finalmente el grupo carbonilo (C=O) perteneciente a la fracción acetamido aparece con poca intensidad en 182.57 ppm, esto se le puede atribuir a que los núcleos de carbono 13 presentan una abundancia baja, y requieren mas tiempo de trabajo por parte del instrumento, es decir, no se observa porque la señal no es mayor que el nivel de ruido de la línea base. A pesar de lo ocurrido, una ventaja de la técnica de CP-MAS frente a la toma normal de un espectro de RMN- 13 C es la resolución del espectro, la cual es mas nítida respecto a un espectro de RMN- 13 C normal. Cabe resaltar que las señales de los carbonos designados como C1 a C6 pertenecen a las fracciones de D-glucosamina y *N*-acetil-D-glucosamina.



Gráfica 5. Espectro RMN- ^{13}C -CP-MAS de quitosano (25°C, 100 MHz)

Ambos espectros de resonancia magnética evidenciaron la pureza del quitosano obtenido, ya que no se encontraron variaciones en los desplazamientos químicos o señales anómalas en los espectros, coincidiendo las señales asignadas con las ya reportadas en la literatura por algunos autores (47, 82).

7.2.3 Determinación del peso molecular promedio en viscosidad del quitosano

El peso molecular del quitosano por viscosimetría capilar se determinó mediante varios parámetros, siendo el primero de ellos la viscosidad relativa η_r que resulta de la relación entre la viscosidad de cada solución del polímero (η) y del solvente empleado (η_A) a la misma temperatura, es decir $\eta_r = \eta/\eta_A$.

Una vez calculada la viscosidad relativa, se determinó la viscosidad específica como $\eta_{sp} = \eta_r - 1$, que se expresa como la viscosidad reducida (η_{sp}/ρ_b), siendo la relación entre la viscosidad específica η_{sp} y la concentración en peso del polímero (ρ_b) cuando su límite tiende a cero, de acuerdo a la ecuación 5.

$$[\eta] = \lim_{\rho_b \rightarrow 0} \frac{\left(\frac{\eta}{\eta_A} - 1\right)}{\rho_b} = \lim_{\rho_b \rightarrow 0} \frac{(\eta_r - 1)}{\rho_b} = \lim_{\rho_b \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{\rho_b} \quad \text{Ecuación 5}$$

La viscosidad intrínseca $[\eta]$ se obtiene al graficar la viscosidad reducida de cada solución en función de la concentración en peso de cada solución diluida del polímero mediante la ecuación 6 de Huggins (45), donde K_H es el coeficiente de Huggins.

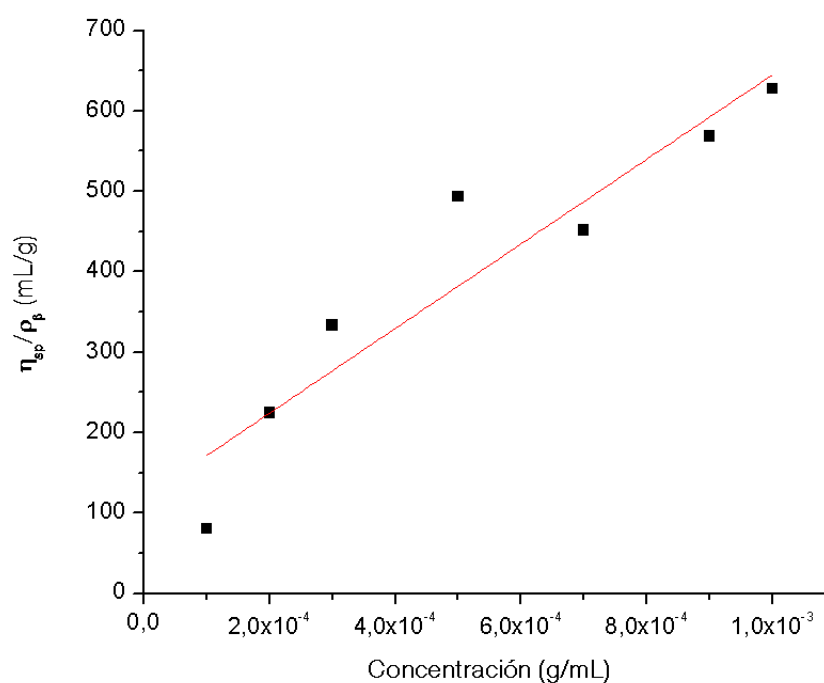
$$\frac{\eta_{sp}}{\rho_b} = K_H [\eta]^2 \rho_b + [\eta] \quad \text{Ecuación 6}$$

La tabla 7 muestra los datos obtenidos para cada solución diluida de quitosano tras realizar las mediciones con el viscosímetro y efectuar los cálculos con las ecuaciones antes descritas.

Tabla 7. Análisis viscosimétrico para el quitosano obtenido (25°C, NaCl 0.2 M / CH₃COOH 0.1 M)

Concentración (g/mL)	Densidad (g/mL)	Tiempo de caída (s)*	η_r	η_{sp}	η_{sp}/ρ_b (mL/g)
1×10^{-4}	0.9498	302.34	1.008	0.008	80.00
2×10^{-4}	0.9534	312.23	1.045	0.045	224.65
3×10^{-4}	0.9585	326.95	1.100	0.100	333.49
5×10^{-4}	0.9602	369.88	1.247	0.247	493.41
7×10^{-4}	0.9663	388.09	1.316	0.316	451.97
9×10^{-4}	0.9668	445.49	1.512	0.512	568.74
1×10^{-3}	0.9835	471.56	1.628	0.628	627.97

Se procede a graficar los datos de la tabla 7, obteniéndose la gráfica 6.



Gráfica 6. Viscosidad reducida de las disoluciones de quitosano en función de la concentración.

Al hacer la regresión lineal y por analogía con la ecuación de Huggins, se obtiene la ecuación 7, la cual se ajusta a los datos de la tabla 7 y la gráfica 6.

$$\frac{\eta_{sp}}{\rho_b} = 526149.63\rho_b + 119.06$$

Ecuación 7

Comparando con la ecuación 6, el término $[\eta]$ corresponde al intercepto y $K_H[\eta]^2$ corresponde a la pendiente de la gráfica. El coeficiente r de la línea recta de la gráfica 6 es de 0.94, lo que indica una buena linealidad en la regresión de los datos.

Finalmente, para conocer el peso molecular promedio por viscosidad se emplea la ecuación 8 de Mark-Houwink-Sakurada (77), que establece una relación entre la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y el peso molecular a encontrar (M_v).

$$M_v = \left(\frac{[\eta]}{K} \right)^{1/\alpha}$$

Ecuación 8

Para el quitosano disuelto en NaCl 0.2 M y CH_3COOH 0.1 M a 25°C, se tienen las constantes empíricas $K=1.81 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$ y $\alpha = 0.93$ de acuerdo a reportes previos de la literatura (45, 77), y como $[\eta]$ es 119.06 mL/g, se sustituyen estos valores en la ecuación 8, encontrándose que el peso molecular promedio en viscosidad para el quitosano extraído es $1.52 \times 10^5 \text{ g/mol}$, valor que es comparable a los obtenidos anteriormente por Muñoz ($1.90 \times 10^5 \text{ g/mol}$) y Díaz ($1.35 \times 10^5 \text{ g/mol}$), quienes trabajaron anteriormente con quitosano de *Aspergillus niger* (55, 73), además el peso molecular es aceptable para la elaboración de dispositivos biomédicos y en este caso películas, puesto que el rango óptimo de peso molecular de quitosano para esta clase de aplicaciones según Kumar (25) está entre $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5 \text{ g/mol}$, mientras que Tetsuya (49) ofrece un rango entre ($1-12 \times 10^4 \text{ g/mol}$), tratándose entonces de un polímero con peso molecular mediano a bajo, lo que facilita su degradación al tiempo que ejerce sus funciones restauradoras.

7.2.4 Determinación del grado de deacetilación del quitosano obtenido

Es importante conocer este parámetro, ya que la solubilidad del quitosano en los disolventes empleados para elaborar las películas dependía en gran medida del mismo.

7.2.4.1 Grado de deacetilación del quitosano por análisis elemental

El grado de deacetilación se determinó para el quitosano extraído y el quitosano comercial, empleando la relación carbono a nitrógeno (C/N), que oscila entre 5.145 (quitina completamente deacetilada y 6.861 (quitina completamente acetilada) de acuerdo a la ecuación 9 (84). Los resultados de cada muestra se indican en la tabla 8.

$$\%DD = 100 - \left(\frac{\frac{C}{N} - 5.145}{1.716} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Tabla 8. Análisis elemental y grado de deacetilación para micelio, quitosano comercial y quitosano obtenido.

Muestra	%C	%H	%N	C/N	%DD
Micelio	41.19	6.67	1.52	27.09	--
Quitosano comercial	39.88	6.61	7.31	5.46	81.90
Quitosano extraído	38.09	6.73	6.84	5.57	75.30

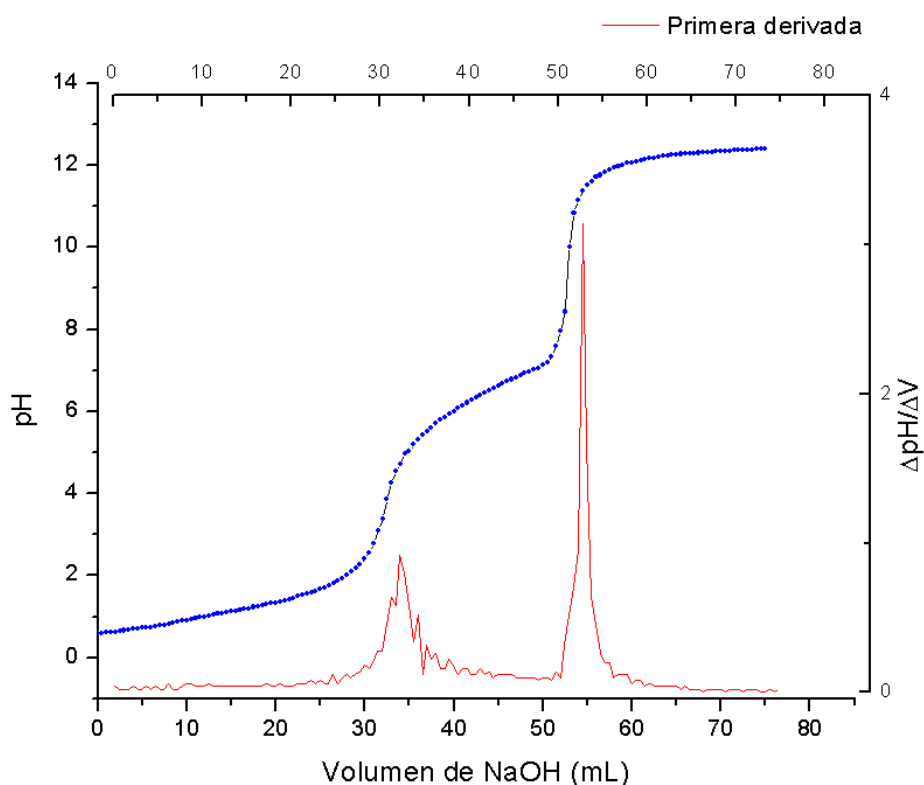
Respecto a los datos de la tabla 8, cabe destacar que antes de hidrolizar el micelio en medio alcalino, la pared celular además de quitina contiene proteínas, azúcares y otros constituyentes, es por ello que el porcentaje de nitrógeno en el micelio es menor (1.52%), y la relación C/N es igual a 27.09. En contraste, cuando ocurre la hidrólisis básica y la deacetilación de la quitina para obtener quitosano (extraído y comercial), el porcentaje de nitrógeno aumenta (6.84 y 7.31%) y la relación C/N tiende a disminuir (entre 5.46-5.57), indicando que la quitina se separó del complejo quitino-glucano inicial, y que en la quitina resultante no todos los grupos acetamido (-NHCOCH₃) lograron transformarse en grupos amino (-NH₂), tras la deacetilación, sin que esto afecte el resultado de las películas producidas.

El valor encontrado de grado de deacetilación por análisis elemental (**75.30%**) es consistente con los reportados anteriormente por autores como Muñoz (74.5 %), Cai (73.6%) y Díaz (77.35%), además son un buen indicativo de la solubilidad del polímero

en ácidos diluidos para su posterior uso, puesto que más del 70% de los grupos amino se encuentran de forma libre en la cadena polimérica (4, 55, 73)

7.2.4.2 Grado de deacetilación de quitosano por valoración potenciométrica

Al realizar la valoración del quitosano con el hidróxido de sodio, se obtienen las gráficas de la valoración con NaOH y de la primera derivada entre el pH y el volumen, permitiendo conocer los puntos de inflexión, como puede observarse a continuación en la gráfica 7.



Gráfica 7. Valoración de quitosano disuelto en HCl 0.3 M con NaOH 0.103 M

Los puntos de inflexión son V_1 , que corresponde al volumen necesario (en mL) para valorar con NaOH el exceso de HCl en la solución y V_2 es el volumen correspondiente a la valoración de los grupos NH_3^+ del quitosano (en mL). Entonces, mediante la ecuación 10 se puede determinar el grado de deacetilación, de acuerdo a Parada (45).

$$\%DD = \frac{16.1 (V_2 - V_1) * M}{w}$$

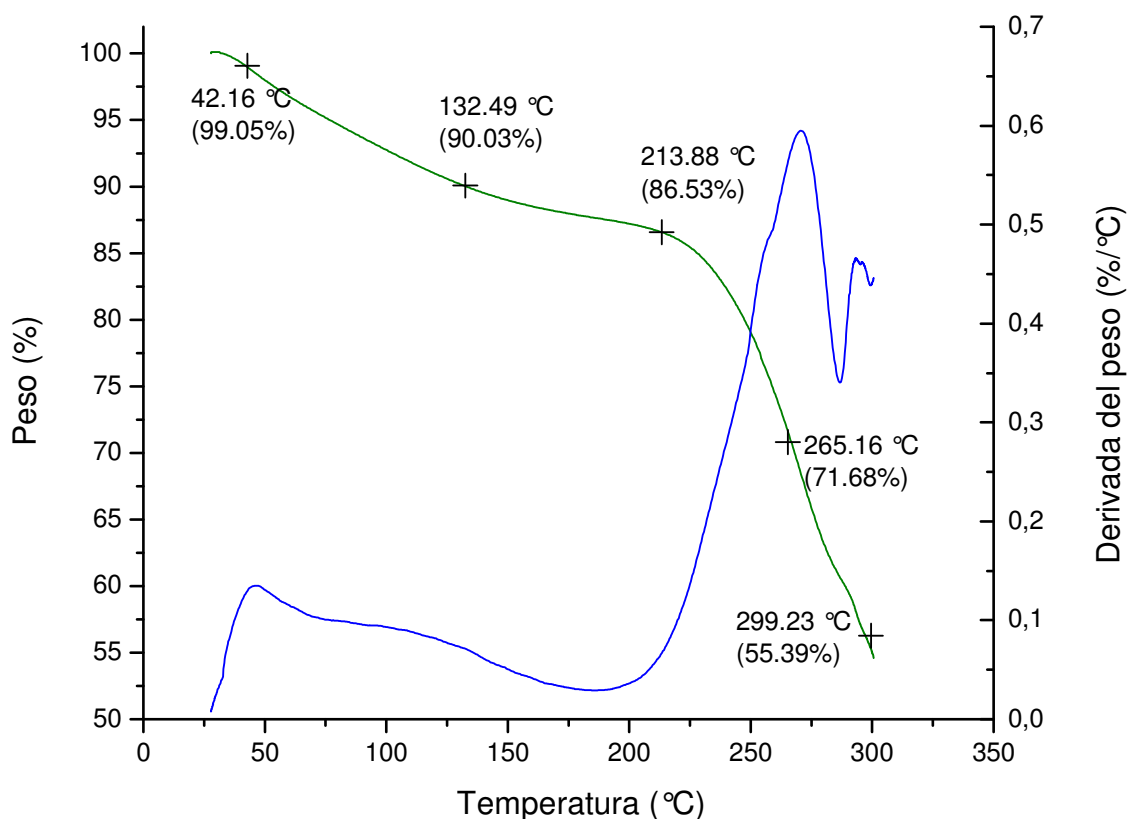
Ecuación 10

En la ecuación anterior, la concentración molar (M) del NaOH empleado es 0.1065 mol/L, w es el peso de la muestra de quitosano (0.5013 g), y los puntos de inflexión son $V_1 = 32.25$ y $V_2 = 52.75$ mL, sustituyendo los datos en la ecuación 10, el grado de deacetilación para el quitosano encontrado mediante valoración potenciométrica fue de 70.11 %, siendo este un valor bueno, ya que el 70% de los grupos amino libres en la cadena polimérica pueden protonarse, favoreciendo la solubilidad del quitosano en medio ácido, para así preparar fácilmente soluciones del polímero. Adicional a lo anterior, la valoración permitió corroborar el carácter de amina primaria y en última instancia el comportamiento ácido base del quitosano, ya que cuando el pH aumentó por encima de 7, el polímero resultó ser insoluble en medio básico, precipitándose como un sólido, al igual que sucedió en el proceso de extracción. En general, el grado de deacetilación del quitosano extraído y determinado por potenciometría (**70.11 %**) resultó bueno, frente a los reportados anteriormente en nuestro grupo por Muñoz (55) y Díaz (73), siendo 74.48% y 64.46%, respectivamente. Con respecto a autores que han trabajado este método, Fattah (85) reportó un 79% de grado de deacetilación para el quitosano extraído de *Aspergillus niger*, Huang (86) reportó un grado de deacetilación para varias muestras de quitosano, entre 77.46-94.61%, entretanto Yang y colaboradores (87) encontraron un grado de deacetilación para el quitosano entre 67-87%, rango en el cual se encontraba el grado de deacetilación del quitosano obtenido por el método potenciométrico.

7.2.5 Caracterización térmica del quitosano obtenido

Mediante análisis termogravimétrico (TGA) se identificaron los perfiles de degradación de la muestra de quitosano extraído, y dependiendo de la temperatura, se pueden identificar diferentes eventos o transiciones en el termograma, estando cada uno de ellos asociado a diferentes pérdidas de masa, de humedad y degradación de la muestra. La primera derivada (línea marcada en azul) permite distinguir las diferentes

transiciones. Observando la gráfica 8, el primer evento térmico se traduce en una pérdida inicial de humedad a una temperatura de 42.16°C, correspondiente al 0.95% de la masa original de la muestra, el segundo evento ocurre a 132.09°C con una pérdida de masa del 9.97%, el tercer evento ocurre en 213.88°C con una pérdida de masa de 13.47%, finalmente, en el cuarto evento a 299.23°C, la muestra ha perdido el 44.61% de su masa original, siendo este un pico acompañado de una pérdida similar a la obtenida por Neto y colaboradores (297.3°C, 41.5%) (88).

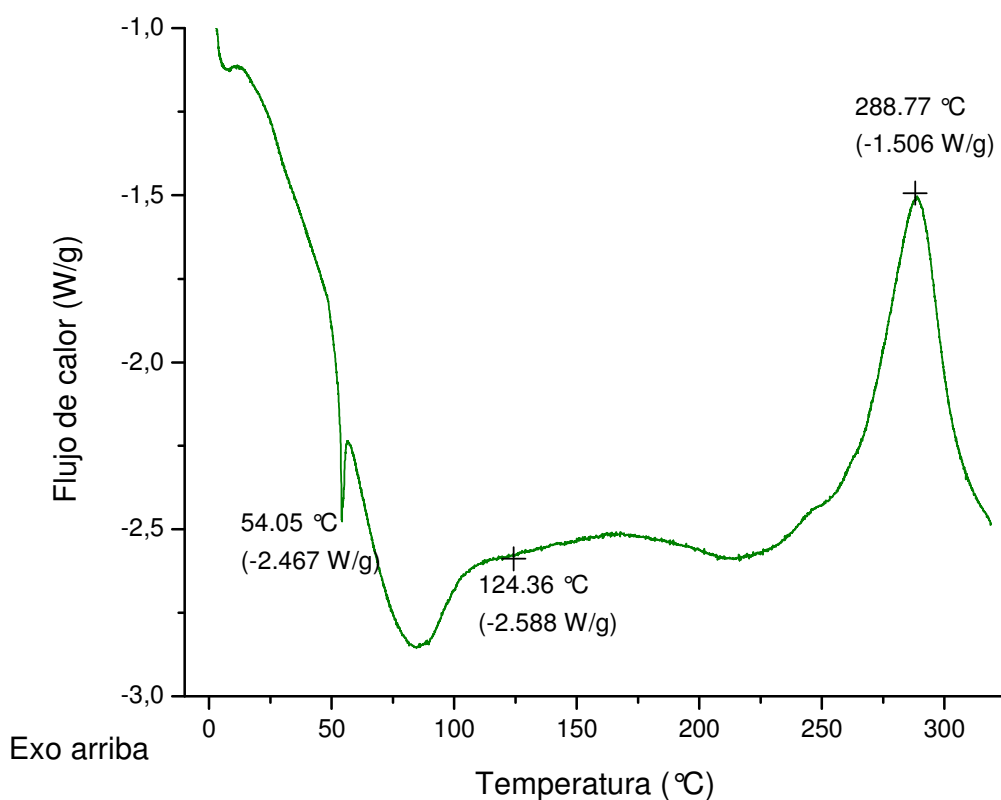


Gráfica 8. Termograma obtenido para el quitosano extraído.

Hasta aquí puede suponerse que las pérdidas de masa del quitosano se asocian a la ruptura entre las cadenas del polímero, que se degradó térmicamente para formar oligómeros y monómeros de D-glucosamina y *N*-acetil-D-glucosamina, por acción del incremento progresivo de la temperatura y el calentamiento. Hay que tener en cuenta que existe una relación entre el grado de deacetilación y la pérdida de peso, según

eso, teniendo en cuenta que el quitosano obtenido presentó un grado de deacetilación entre 70.81-75.30%, lo observado para el TGA obtenido experimentalmente es comparable con muestras que presentan un grado de deacetilación similar, tal es el caso de Fattah (85), quien obtuvo quitosano con un grado de deacetilación del 79%, el cual evidenció una mayor estabilidad térmica frente a otra de sus muestras que presentó un mayor grado de deacetilación (97%). Con respecto al análisis termogravimétrico, queda evidenciado que el quitosano utilizado experimentó mas intensamente la degradación térmica por encima de los 213.88 °C (48, 55).

La gráfica 9 correspondiente a la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para el quitosano obtenido.



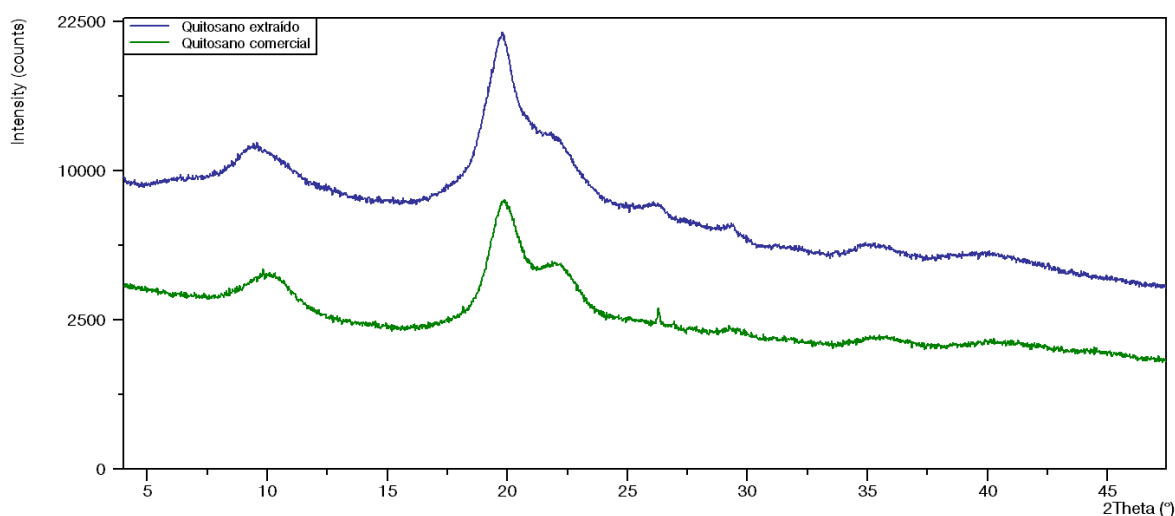
Gráfica 9. Calorimetría de barrido diferencial para el quitosano extraído.

En la gráfica 9 aparece una depresión (pico endotérmico) entre 54.05-110°C debido a la evaporación del agua que pudo tener el quitosano en su estructura, siendo consistente con la deshidratación del polímero observada en el TGA (89). La temperatura de transición vítrea (T_g) para el quitosano extraído (con un grado de deacetilación entre 70.81-75.30%) apareció en el pico exotérmico a 124.36°C, ya que en ese punto se da una variación en la pendiente, debido al incremento del flujo de calor, siendo la temperatura escogida en el punto medio de la línea donde se presenta la pendiente. El valor de T_g encontrado experimentalmente está incluido dentro del rango de T_g propuesto por Kittur (120-140°C) para un quitosano con un grado de deacetilación del 75% (89), o de acuerdo a lo obtenido por Fattah (85), que presentó un quitosano con un grado de deacetilación de 79% y una T_g de 128.95°C

Cabe resaltar que respecto a la determinación de la T_g del quitosano existe una controversia, puesto que al ser un polímero que depende de la fuente de origen y metodología de extracción, presenta variaciones en sus propiedades (cristalinidad, peso molecular y grado de deacetilación), sin que haya un valor absoluto para T_g . Un ejemplo de ello surge de acuerdo a lo presentado por Neto y colaboradores (88), donde la T_g puede oscilar entre -23 a 203 °C, e incluso ocurriría a temperaturas altas como 203.8°C de acuerdo a Sakurai (90), aunque la determinación de la T_g a esa temperatura se vería limitada por la degradación que experimentaría la muestra, sin que ocurra la posibilidad de que la T_g para el quitosano ocurra a temperaturas superiores a los 200°C. El último pico de la gráfica 9 es exotérmico y aparece a 288.7°C, el cual indica que el polímero está experimentando la descomposición térmica de las unidades de D-glucosamina, según lo establecido por Guinesi (91), quien sugiere el rango en que debe aparecer este pico (264-325°C) para el quitosano con un grado de deacetilación alrededor del 70-80%. De acuerdo a lo encontrado en el análisis térmico, el quitosano presentó cierta cristalinidad procedente de las cadenas de alfa-quitina, y además el polímero no resultó ser totalmente amorfo, presentando entonces secciones amorfas y cristalinas, comparándolo con los resultados de Fattah (85).

7.2.6 Caracterización de quitosano por difracción de rayos X

Los difractogramas para el quitosano obtenido y el quitosano comercial (ver gráfica 10) indican que se trata de un polímero con secciones amorfas, constituido por cadenas de α -quitina dadas sus anchas señales que se encuentran localizadas a valores de reflexiones 2θ por debajo de 25° . Para el quitosano extraído se aprecian tres reflexiones, la primera de ellas se localiza a 9.51° con un espaciamiento d de $9.20 \text{ \AA}$, la segunda reflexión se percibe en 19.78° con espaciamiento d de $4.48 \text{ \AA}$ y la última reflexión aparece como un hombro a 26.30° con espaciado d de $3.40 \text{ \AA}$. Los valores del espaciamiento d se refieren a la distancia entre los diferentes planos de las cadenas que originalmente presentaban la distribución de α -quitina, que en la red de átomos de la cadena de quitosano comprenden una estructura o zona cristalina, siendo estos valores de espaciamiento similares a los encontrados por Zhang ($9.41 \text{ \AA}$, $4.61 \text{ \AA}$ y $3.79 \text{ \AA}$) para cada una de las señales del quitosano (92), los cuales no difieren respecto a otros reportes de la literatura, como el de Gartner (48) cuyos valores fueron ($9.50 \text{ \AA}$, $4.62 \text{ \AA}$ y $4.44 \text{ \AA}$), corroborando además que el quitosano obtenido no era enteramente amorfo. Por otro lado, queda descartado que la distribución en las cadenas de quitosano fuese de β -quitina, puesto que de ser así, la reflexión inicial a 9.51° estaría ausente (47).



Gráfica 10. Difractogramas de rayos X para muestras de quitosano extraído y comercial

7.3 Diseño experimental en la elaboración de películas de quitosano

Respecto al diseño de las películas de quitosano se tuvo en cuenta varios criterios: la influencia del ácido empleado en la disolución de quitosano, la concentración del polímero, la ausencia o presencia de plastificantes, y la proporción entre el polímero y la mezcla plastificante en cada película. Una de las razones por las cuales se emplearon cajas Petri de polietileno en todo el estudio, se debió a que el material del cual estaban hechas las cajas, al presentar grupos metileno en su estructura ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), actuaba como antiadherente, por ende las películas de quitosano se desprendían fácilmente del recipiente. Caso contrario ocurriría si las cajas Petri hubiesen sido de vidrio, ya que los grupos silanoles (Si-OH), presentarían enlaces de hidrógeno con el quitosano, dificultando su desmoldado. De acuerdo a reportes previos de la literatura (39, 60, 61, 93), se le indicó al software Minitab 16® los niveles para las variables, los cuales fueron:

Concentración del polímero (CP): 1 y 2% p/v

Concentración de glicerol (CG): 0.5 y 1.0% v/v

Concentración de ácido oleico (CA): 0.75% y 1.0% v/v

Se elige trabajar el diseño experimental a dos niveles, por ser uno de los más sencillos al no requerir demasiadas réplicas y gasto excesivo de materiales y reactivos para observar la tendencia de acuerdo a la respuesta generada. Seguidamente, el software determinó el orden de las corridas de cada experimento y arrojó las respuestas de acuerdo a cada mezcla (ver tabla 9), siendo la variable de respuesta un indicador de cual mezcla obtendría probablemente las mejores características.

Tabla 9. Datos generados por el software Minitab para realizar el diseño experimental.

Corrida	CG	CP	CA	Respuesta
1	0.5	1.0	0.75	48.20
2	1.0	1.0	0.75	54.90
3	0.5	2.0	0.75	29.70
4	1.0	2.0	0.75	34.30
5	0.5	1.0	1.0	34.96
6	1.0	1.0	1.0	99.97
7	0.5	2.0	1.0	40.01
8	1.0	2.0	1.0	45.03
9	0.5	1.0	0.75	42.96
10	1.0	1.0	0.75	57.50
11	0.5	2.0	0.75	21.90
12	1.0	2.0	0.75	32.80
13	0.5	1.0	1.0	34.99
14	1.0	1.0	1.0	99.96
15	0.5	2.0	1.0	35.02
16	1.0	2.0	1.0	42.02

Donde CP: concentración del polímero; CA: concentración ácido oleico y CG: concentración glicerol. De acuerdo a las respuestas arrojadas, el software construyó la tabla 10, que determina cuales variables ejercían algún efecto sobre el diseño experimental para preparar las películas de quitosano.

Tabla 10. Efectos estimados sobre las tres variables y las interacciones entre ellas en el diseño experimental.

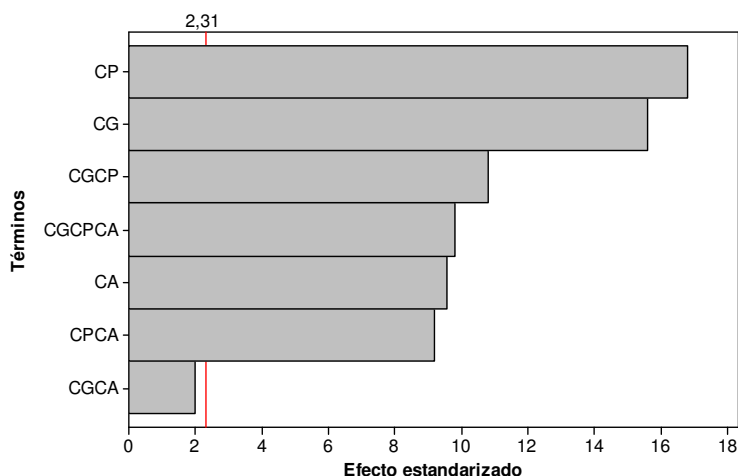
Términos	Efecto	Coeficiente de cada variable	Desviación coeficiente	p (error asociado)
Constante	80	47.38	0.7906	0.000
CG	22.25	11.12	0.3210	0.000
CP	-24.25	-12.12	0.7520	0.000
CA	13.25	6.62	1.6510	0.000
CG*CP	-15.25	-7.63	0.8033	0.000
CG*CA	13.25	6.62	0.6542	0.000
CP*CA	-2.75	-1.38	0.9808	0.120
CG*CP*CA	-14.25	-7.12	0.6903	0.000

Donde CP: concentración del polímero; CA: concentración ácido oleico y CG: concentración glicerol.

De acuerdo a la tabla 10, la ecuación de regresión que se ajusta al diseño elegido (por analogía con la ecuación 3) es:

$$Y=47.38 +11.12*CG-12.12*CP+ 6.62*CA -7.63 CG*CP+ 6.62CG*CA -7.12CG*CP*CA + 80 \quad \text{Ecuación 11}$$

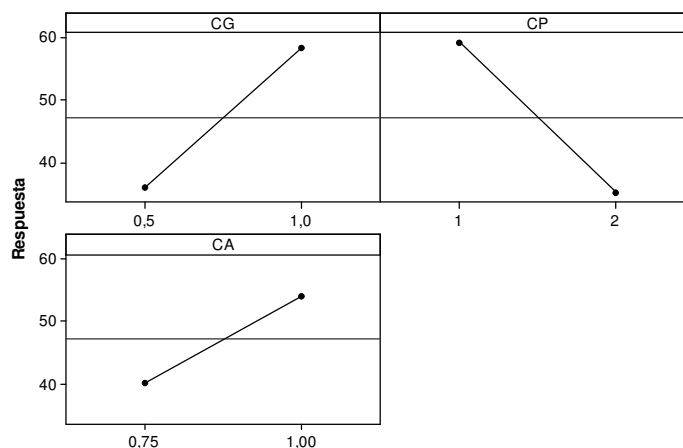
No se considera la interacción entre la concentración del polímero y la concentración del ácido oleico (CP*CA) pues el valor de p debe ser ≤ 0.05 . A continuación el software generó las gráficas que representan como cada una de las variables ejerce su influencia sobre la respuesta del diseño experimental. En la gráfica 11 se indican las interacciones entre las variables, que pueden afectar el diseño experimental, el software Minitab 16 indica que deben tomarse las interacciones entre las variables que se encuentren por encima del valor 2.31 (cumplen con la condición CP; CG; CG*CP; CG*CP*CA; CA y CP*CA). No obstante, se eligen las variables más influyentes sobre el resultado final de las películas, correspondientes a las concentraciones de glicerol y quitosano (CG y CP) respectivamente.



Gráfica 11. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados. CP: concentración del polímero; CA: concentración ácido oleico y CG: concentración glicerol.

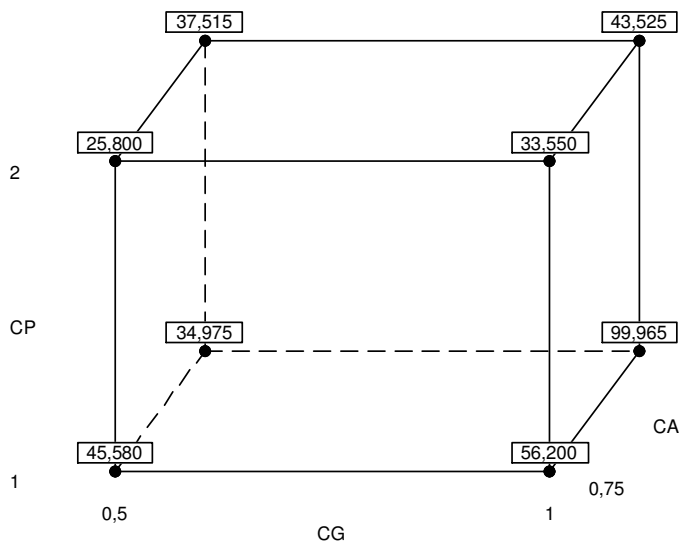
La gráfica 12 determina los efectos de cada una de las variables sobre el diseño experimental sobre los valores de la respuesta. Los valores superiores en cada cuadro ofrecen las mejores interacciones y son los que se deben elegir al momento de la preparación de las películas. De acuerdo a ello, la concentración de glicerol (CG) a

elegir debe ser 1.0% (respuesta de 58), la concentración del polímero (CP) debe ser del 1.0% (respuesta de 57) y la concentración de ácido oleico (CA) debe ser de 1.0% (respuesta de 55).



Gráfica 12. Efectos de cada variable sobre la respuesta. CP: concentración del polímero; CA: concentración ácido oleico y CG: concentración glicerol.

Finalmente en la gráfica 13, los valores más altos de cada lado del cubo indican cuales deben ser las concentraciones de solución a utilizar en cada variable.



Gráfica 13. Interacción cúbica para elegir los valores de las variables. CP: concentración del polímero; CA: concentración ácido oleico y CG: concentración glicerol.

Según la gráfica 13, el valor más alto para CP (polímero) es 45.580, el de CG (glicerol) es 56.200 y finalmente el de CA (ácido oleico) es 99.965, por ende las concentraciones de CP, CG y CA deben ser del 1% p/v o v/v en cada caso.

7.4 Consideraciones en la elaboración de películas de quitosano

7.4.1 Efecto del tipo de ácido en el diseño de las películas (sin plastificante)

Se conoce que el quitosano es soluble en algunos solventes orgánicos diluidos, tal es el caso de los ácidos fórmico, cítrico, propiónico y láctico, por el hecho de que el grupo amino presenta un pKa de 6.3 una vez se protona a valores de pH bajos, siendo también soluble en ácidos inorgánicos como clorhídrico y fosfórico (94). Por tal razón se utilizaron los ácidos antes mencionados (a excepción del propiónico), todos en concentración del 1% v/v, para elaborar películas de quitosano sin la adición de plastificante, y comprobar si en efecto eran los disolventes apropiados de acuerdo a lo reportado por la literatura (39, 60, 73, 93). Los resultados se ilustran en la figura 23.

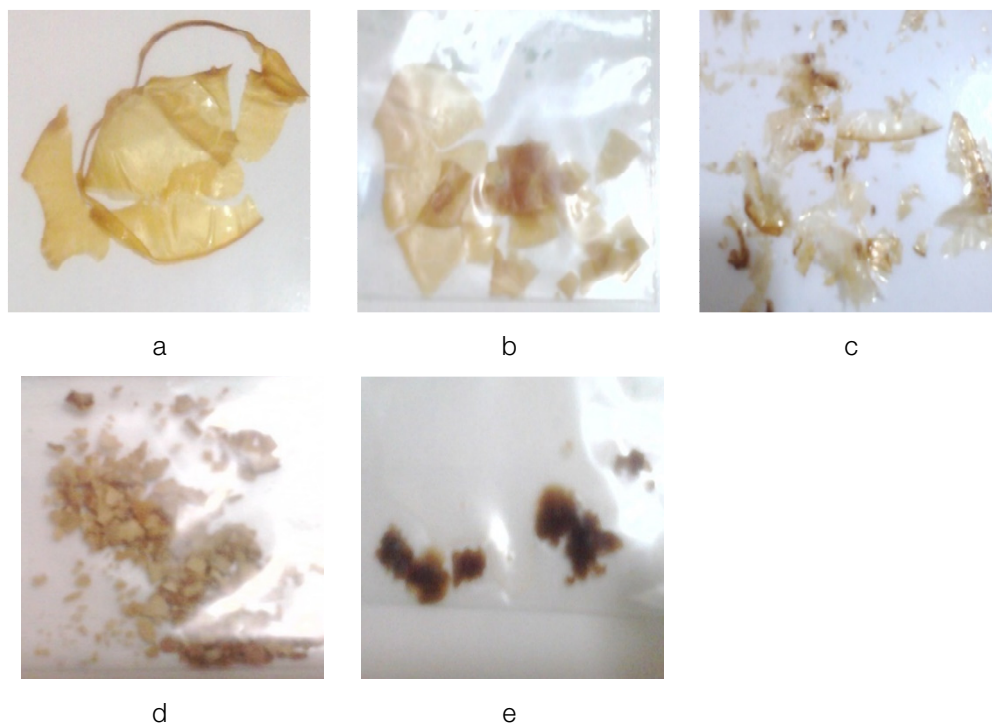


Figura 23. Películas de quitosano elaboradas con ácido fórmico (a), ácido cítrico (b), ácido láctico (c), ácido clorhídrico (d) y ácido fosfórico (e). Todos los ácidos en concentración 1% v/v

Se observa que en ningún caso se formó una película continua y uniforme, esto en parte se debería a la ausencia de plastificante (el cual permitiría la separación de las cadenas de quitosano). Debido a que las películas de quitosano no se formaron utilizando ácidos cítrico, fórmico y láctico estando todos a una concentración de 1% v/v, se optó por incrementar la concentración, para establecer si influiría o no en la formación de películas, así que se incrementó la misma hasta el 5% v/v para cada uno de los ácidos orgánicos, obteniéndose mejores resultados (ver la figura 24).

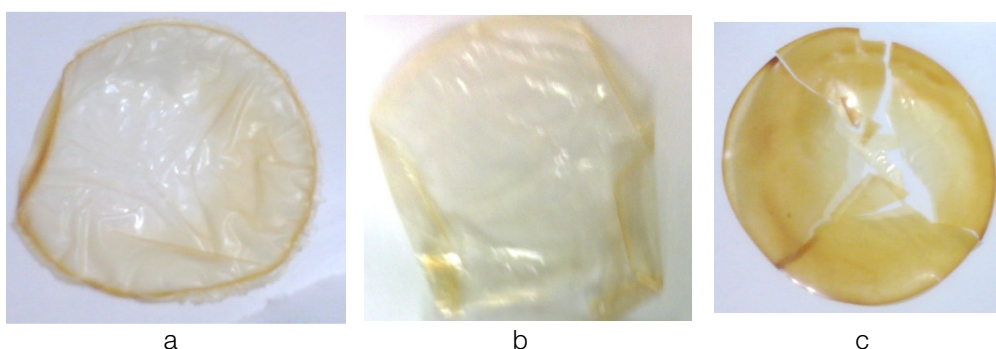


Figura 24. Películas de quitosano elaboradas con ácido fórmico (a), ácido láctico (b) y ácido cítrico (c). Todos los ácidos en concentración 5% v/v

En el caso del ácido fórmico (figura 25) al presentar un tamaño molecular inferior al de los otros dos ácidos orgánicos (láctico y cítrico), no daría lugar a impedimentos estéricos, además al ser soluble en agua se disocia en ella liberando iones H^+ , necesarios para la protonación de los grupos amino, al mismo tiempo los contraiones formiato ($HCOO^-$) contribuyen a la formación de los enlaces de hidrógeno en las películas finales, estas interacciones son acordes a lo señalado por Chen y Kim (94, 95). Debido a lo anterior, este sería un solvente alternativo en la formación de películas, pudiéndose usar en lugar del ácido acético.

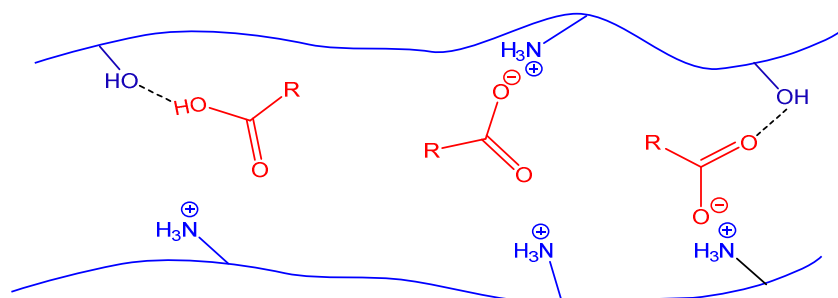


Figura 25. Posibles interacciones del ácido fórmico con la cadena de quitosano (ácido acético si $R=CH_3$). Fuente: autoría propia.

El resultado para el ácido láctico puede justificarse, debido a dos factores: por sus propiedades físicas es un compuesto hidratado (presenta agua enlazada, además de grupos hidroxilo en el segundo carbono, lo que significaría la presencia de enlaces de hidrógeno tanto inter como intramoleculares, y de fuerzas intermoleculares, que favorecerían la formación de las películas resultantes (ver figura 26).

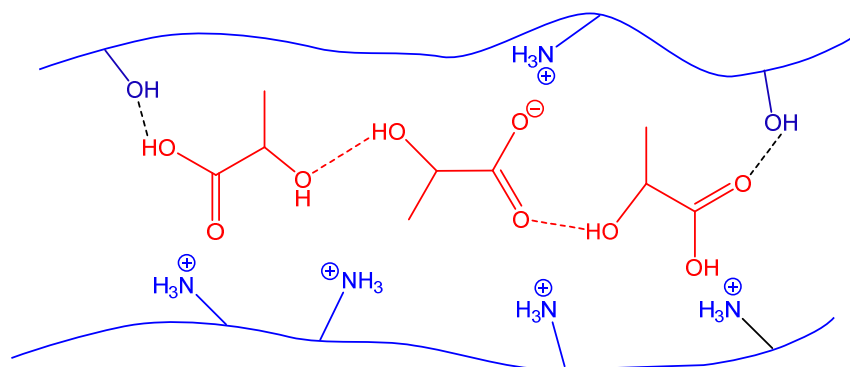


Figura 26. Posibles interacciones del ácido láctico con la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia

Para el caso del ácido cítrico utilizado, la diferencia respecto a los demás ácidos orgánicos consistió en que por sus propiedades físicas (sólido blanco trihidratado) tuvo que disolverse previamente en agua antes de mezclarse con el quitosano. Por tal razón, el contenido de agua sería mayor en la película final, siendo esto una ventaja en el sentido de que habría lugar a una mayor formación de enlaces de hidrógeno y de

fuerzas intermoleculares que mantendrían unida a la película resultante; sin embargo al haber una mayor proporción de agua en la disolución de quitosano con ácido cítrico, no todo el polímero se solubilizaría pues este es insoluble en agua. Frente a esto, el ácido cítrico presenta como ventaja la presencia de grupos carboxilo ionizables, y debido a eso, hay varios lugares o sitios de unión e interacción entre los grupos amino protonados, favoreciendo así las fuerzas intermoleculares y enlaces de hidrógeno (ver figura 27).

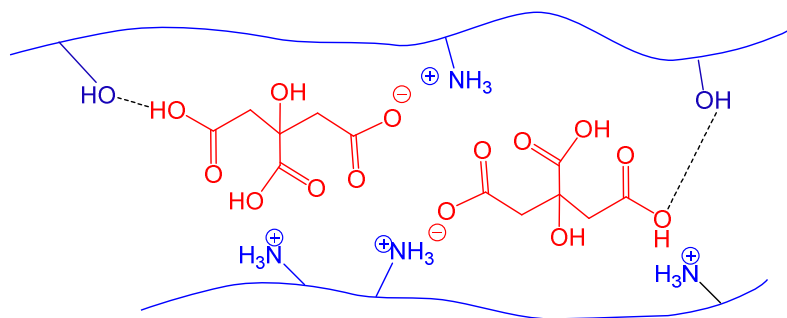


Figura 27. Posibles interacciones del ácido cítrico con la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia

En general, los ácidos orgánicos comparten en común el hecho de que al aumentar la concentración de los ácidos hasta el 5% v/v, habría una mayor distribución de iones H^+ que reaccionarían con los grupos amino libres del quitosano ($-NH_2$) para transformarse en grupos amino protonados ($-NH_3^+$), pues según Gartner (81), este grupo protonado estaría rodeado de un contraión, facilitando la solubilidad del quitosano; al mismo tiempo, la presencia de los contraiones (formiato, citrato y lactato) induciría la existencia de enlaces de hidrógeno y de fuerzas intermoleculares, que contribuyeron a la formación de las películas en ausencia de agentes plastificantes. Además de lo anterior, las cadenas de quitosano conservan la distribución original de alfa-quitina en sus diferentes planos (determinada por rayos X), en donde también hay presentes enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, que le conceden una estructura cristalina y ordenada a las cadenas del polímero, contribuyendo al refuerzo de las uniones antes mencionadas (2, 24).

Si bien las películas se formaron con los ácidos orgánicos mencionados, se prefiere por practicidad el uso del ácido acético, dado que se requiere una menor concentración del mismo para solubilizar al quitosano (solamente del 1% v/v), conllevando a un menor gasto de este reactivo. Con relación al uso de los ácidos inorgánicos (HCl y H_3PO_4) los resultados de las películas de quitosano con ambos a una concentración del 5% v/v, se muestran en las figuras 28a y 28b, aun así, no se logró obtener películas uniformes y continuas.

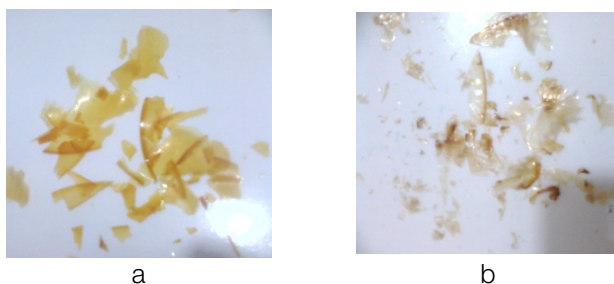


Figura 28. Películas de quitosano elaboradas con ácido clorhídrico (a) y ácido fosfórico (b). Todos los ácidos en concentración 5% v/v

Una de las razones por las cuales el quitosano no formó películas con los ácidos inorgánicos (aun habiendo aumentado la concentración del 1%v/v al 5% v/v) se debe a que al estar en disolución acuosa, aunque los ácidos solubilizaron al polímero, no consiguieron formar enlaces de hidrógeno, puesto que la disociación conduce a los iones H^+ y a los contraiones Cl^- y $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$.(96) Además, el hidrógeno solo forma enlaces o "puentes" con el oxígeno, nitrógeno y fluor, mas no ocurre lo mismo con cloro y fósforo, dejando como únicas opciones a las interacciones de tipo electrostático, siendo estas interacciones insuficientes como para permitir que se forme una película.

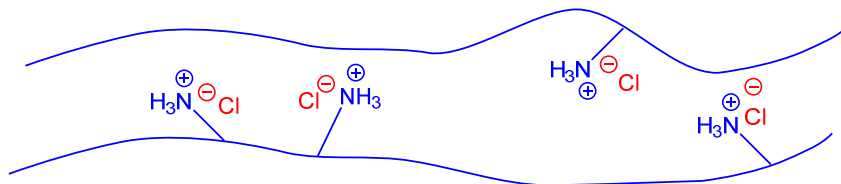


Figura 29. Posibles interacciones del ácido clorhídrico con la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia

De forma similar, se indican las interacciones de la cadena de quitosano con el ácido fosfórico, es probable que los enlaces de hidrógeno ocurran por los oxígenos del grupo dihidrogenofosfato y que estos ayuden a la formación de las películas.

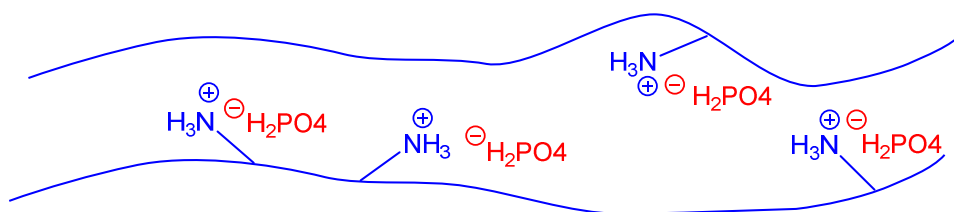


Figura 30. Posibles interacciones del ácido fosfórico con la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia

7.4.2 Efecto del uso de ácido acético (sin plastificante) en las películas de quitosano

La flexibilidad y resistencia de las películas de quitosano a elaborar, depende en cierta medida del uso de un plastificante (39, 60, 67). Se conoce que el ácido acético, además de solubilizar el quitosano, podría contribuir a la flexibilidad de las películas (81), por ello se decidió verificar si en realidad esto era factible. En la figura 31 se observan algunas películas elaboradas con quitosano disuelto en ácido acético al 1% v/v sin usar plastificante, las cuales presentaron un color amarillo pálido, aspecto quebradizo, pliegues en la superficie. Es de suponer que el resultado no difirió mucho del observado con los otros ácidos igualmente capaces de solubilizar el quitosano.

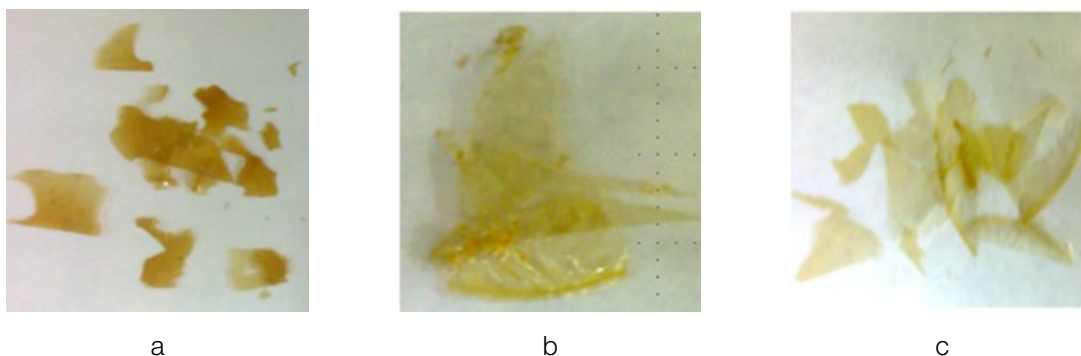


Figura 31. Películas de quitosano al 1% disueltas en ácido acético al 1% v/v sin plastificante adicionado (a-c).

La explicación a lo observado es exactamente similar a la indicada para los ácidos orgánicos, comenzando desde la protonación de los grupos amino en la cadena de quitosano, siendo rodeados por el contraion acetato (CH_3COO^- , ver figura 25), y que en solución acuosa, se presentarán enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares con las cadenas de quitosano, que prevalecen una vez se hayan evaporado los disolventes, ayudando a la formación de las películas. Cabe resaltar que el aspecto transparente observado en las películas se podría deber al carácter amorfo de las mismas (determinado por rayos X), sin que esto implique que todo material transparente necesariamente sea amorfo, ya que el carácter cristalino sería el responsable del comportamiento frágil y quebradizo. Claramente, en ausencia de plastificante, las películas se fracturaron, siendo esto inaceptable para el uso regenerativo propuesto (81).

7.4.3 Influencia de la proporción de quitosano y de la mezcla plastificante sobre las películas diseñadas

De acuerdo a las observaciones anteriores, se optó por emplear quitosano disuelto en ácido acético al 1% v/v, junto con la mezcla plastificante de ácido oleico y glicerol (en concentración del 1% en v/v y relación 1:1) para determinar si se obtenían películas estables. La figura 32 ilustra las películas de quitosano elaboradas en diferentes proporciones. En general las películas en donde la proporción de quitosano y mezcla plastificante fue de 60:40; 70:30; 80:20 y 90:10 presentaron una buena apariencia, destacándose las películas de proporciones 80:20 y 90:10 (figuras 32d y 32e), las cuales al contener una mayor cantidad del polímero y una baja proporción de plastificante fueron las seleccionadas para los estudios biológicos.

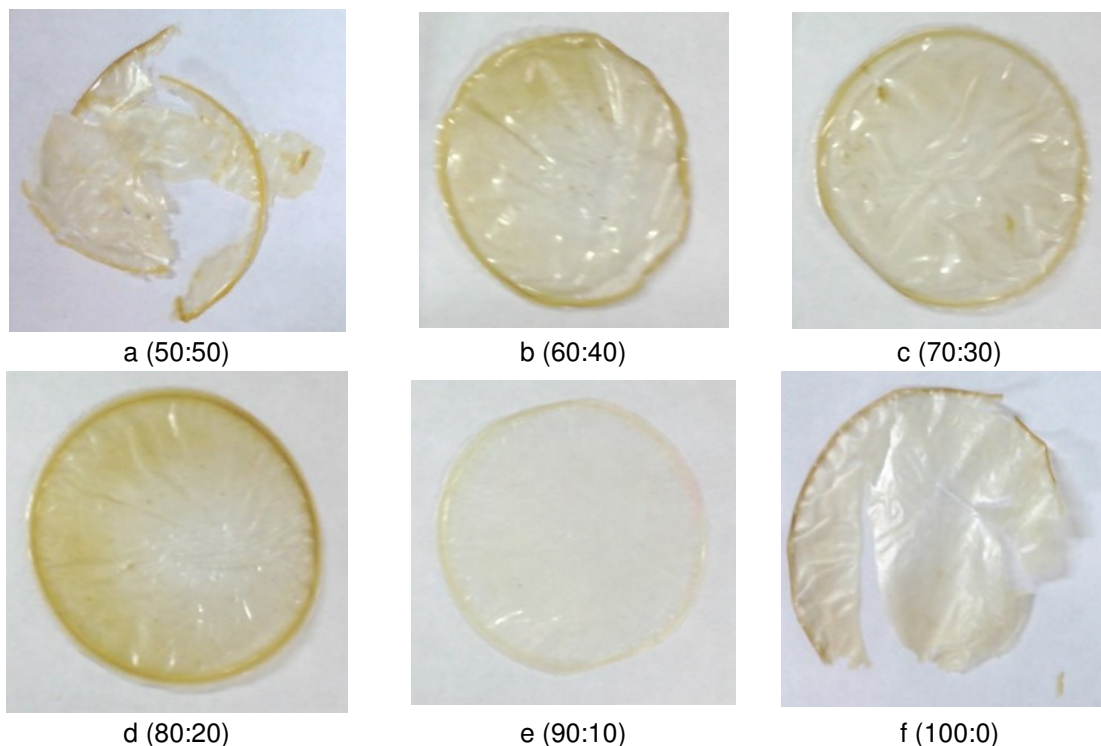


Figura 32. Películas de quitosano en diferentes proporciones (polímero: plastificante). La muestra f no posee plastificante.

Las películas exhibieron transparencia (dado el carácter amorfo que presenta el quitosano), presentando una superficie continua, y a la vez exhibieron flexibilidad y suavidad al tacto, aunque se presenciaron algunos pliegues en la superficie, atribuido a que se acumuló una mayor cantidad de solución en algunas zonas del recipiente donde se prepararon, y que la evaporación de los disolventes no fue simultánea, aunque el quitosano se haya disuelto por completo en ácido acético al 1% v/v. A diferencia de las situaciones anteriores, la inclusión del glicerol como plastificante favoreció la formación de los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares entre las cadenas de quitosano, permitiendo así la formación de las películas sin que estas se fracturen, y a su vez separando las cadenas del polímero, esto también pudo suceder en parte por la repulsión iónica entre los contraiones acetato(67).

Una posible explicación a la formación de películas con plastificante se debe a que el glicerol se introdujo entre las cadenas de quitosano, permitiendo que existiera un espacio entre ellas, reduciendo así la fricción y las fuerzas de atracción

intermoleculares entre las cadenas de quitosano, favoreciendo la flexibilidad de las mismas, a modo de segmento blando (97). Otra posible explicación se debe a que la rigidez de las cadenas del quitosano disminuyó debido a la formación de enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o interacciones de tipo iónico (67) entre el glicerol, el quitosano y los grupos acetato, como se puede apreciar en la figura 33

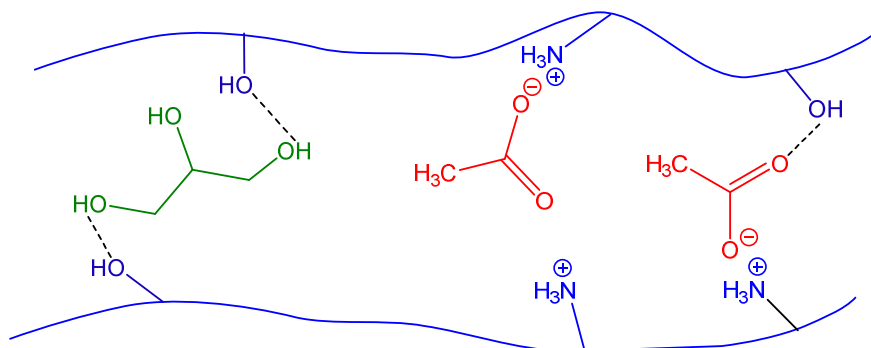


Figura 33. Enlaces de hidrógeno entre el glicerol (color verde) y los grupos amino protonados de la cadena de quitosano. Fuente: autoría propia.

Ahora, con respecto al ácido oleico (que presenta un carácter lipófilo), por ser ácido graso, puede decirse que permite que las películas presenten tengan flexibilidad, aunque no va a interaccionar con la disolución acuosa de quitosano y glicerol pues es insoluble en agua; sin embargo, el ácido graso al estar disuelto en etanol, se incorpora temporalmente en la mezcla final, durante el periodo de agitación mecánica. Dicha mezcla se separa de nuevo tras cesar la agitación (al depositar cada mezcla en las cajas Petri de polietileno) la parte polar (solución de quitosano y glicerol) se separaría de la parte apolar (solución de ácido oleico en etanol). Al ocurrir la evaporación de solventes (principalmente agua y etanol), la película de quitosano exhibió un acabado liso en la superficie, presentando cada película un carácter relativamente hidrófobo, aportado por el ácido oleico, por ende este compuesto también contribuyó a reducir la atracción entre las cadenas de quitosano (39), pues al presentar una larga cadena de grupos metileno, podría actuar como si fuera un segmento blando.

Finalmente, cabe destacar que las películas obtenidas fueron estables y similares a las obtenidas por autores como Vargas (39), Cárdenas (60) y Leceta (68), siendo idóneas respecto a la aplicación para la cual fueron dirigidas en este trabajo.

7.5 Caracterización de las películas de quitosano con plastificante

Además de la caracterización por espectroscopía infrarroja (ya discutida), se realizaron las correspondientes caracterizaciones morfológicas y mecánicas de las películas de quitosano.

7.5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) para las películas de quitosano

Con respecto a la morfología de la película de quitosano 80:20, se puede apreciar a una ampliación de 200x (figura 34a) una superficie continua y homogénea en toda la extensión de la película, en donde las protuberancias, pliegues y arrugas presentadas se deben al secado y evaporación de los respectivos disolventes y plastificantes que conformaban la película por acción del calor, esto ocurrió durante el tiempo que la disolución se mantuvo en el horno eléctrico.

En otra región de la micrografía, igualmente a 200x (figura 34b), se logra evidenciar poros cuyo tamaño, de acuerdo a la escala en la figura, se encuentra en el rango de 100 micrómetros, lo cual indica que serían posibles zonas de andamiaje en donde se alojarían células que permitirían el crecimiento de nuevos tejidos. Además de los poros, también se encuentran unos pequeños gránulos presentes en la superficie, los cuales apenas se percibían, por eso se detallaron mejor a una ampliación a 1000x (figura 34c), estos probablemente corresponden a los remanentes de la mezcla plastificante empleada, que se aglutinaron con el polímero y no lograron integrarse a la mezcla en disolución; no obstante, los pequeños gránulos no afectaron al material elaborado, el cual permaneció homogéneo en toda su extensión.

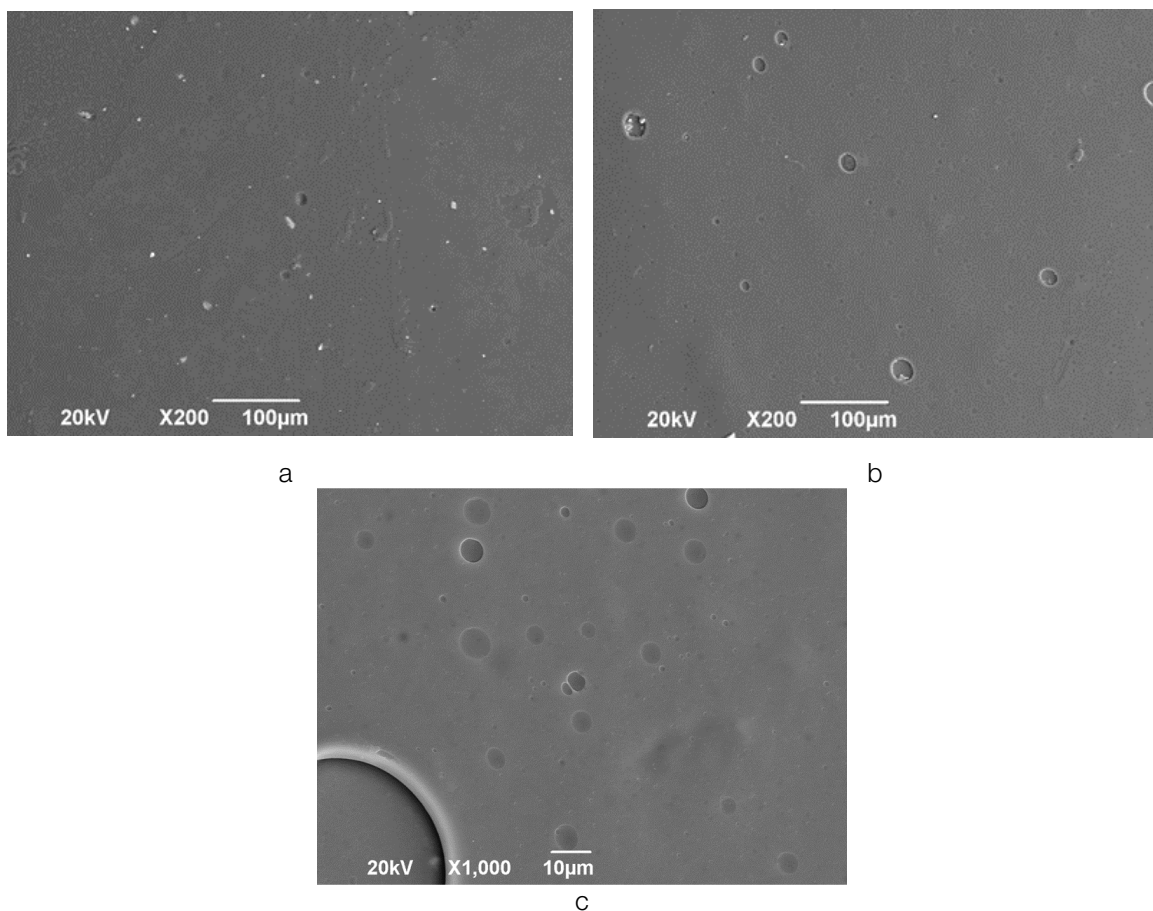


Figura 34. Micrografías película de quitosano (80:20). Aumentos de 200x (a, b) y 1000x (c).

De manera similar a la película de proporciones 80:20, la morfología de la película de proporción 90:10 muestra a una ampliación de 200x uniformidad y continuidad en toda su extensión, no obstante la presencia de pequeños poros y la aparición de una leve protuberancia o arruga causada durante la evaporación de los disolventes que constitúan al material evidencian que su superficie si bien era uniforme no era totalmente lisa (figura 35a). Con una ampliación mayor, a 1000x (figura 35b), se aprecian tanto porosidades como zonas bien definidas en forma de pequeños grumos que evidencian una acumulación de la mezcla plastificante, la cual como ya se mencionó, no se evaporó totalmente durante el calentamiento y secado de la película.

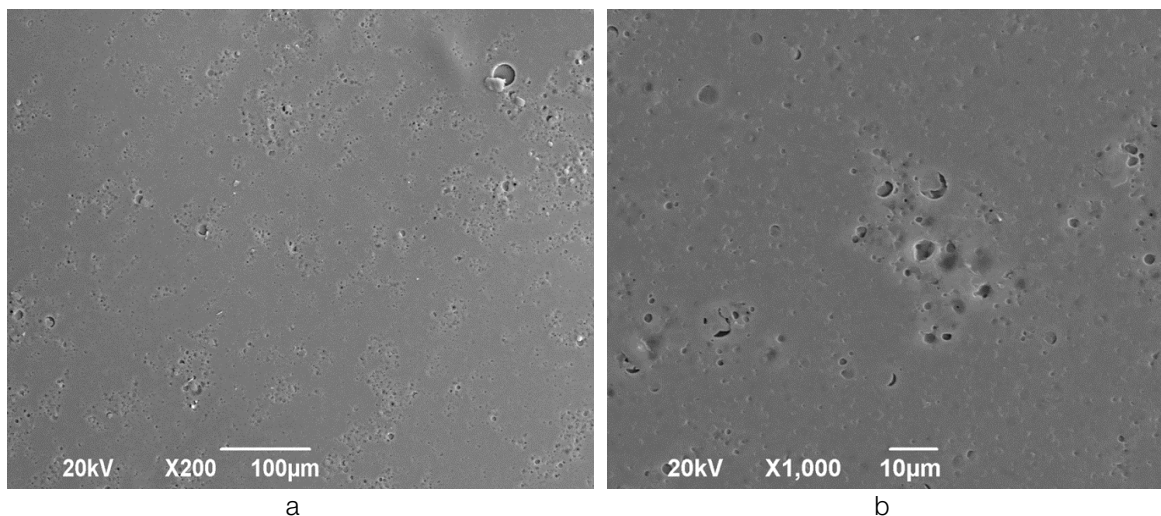


Figura 35. Micrografías película de quitosano (90:10). Aumentos de 200x (a) y 1000x (b).

Finalmente, la morfología de la película sin plastificante, de composición 100:1 se aprecia a una ampliación de 200x completamente continua y uniforme en extensión, sin que se presenten arrugas o pliegues en superficie debido a que al no presentar mezcla plastificante, no se da lugar a la formación de estos, habiendo solamente quitosano disuelto en ácido acético diluido, el cual se evaporó dejando solamente la película (figura 36a). Una ampliación superior a 1000x mostró pequeñas partículas que posiblemente pertenezcan al quitosano que no logró disolverse en la disolución de ácido acético diluido (figura 36b). Esta película no presentó poros a diferencia de las anteriores, dada la ausencia de mezcla plastificante. Una explicación a esto se puede atribuir al hecho de que los plastificantes, además de separar las cadenas del polímero y de concederle flexibilidad, podrían ser capaces de dejar pequeños espacios entre ellas (39).

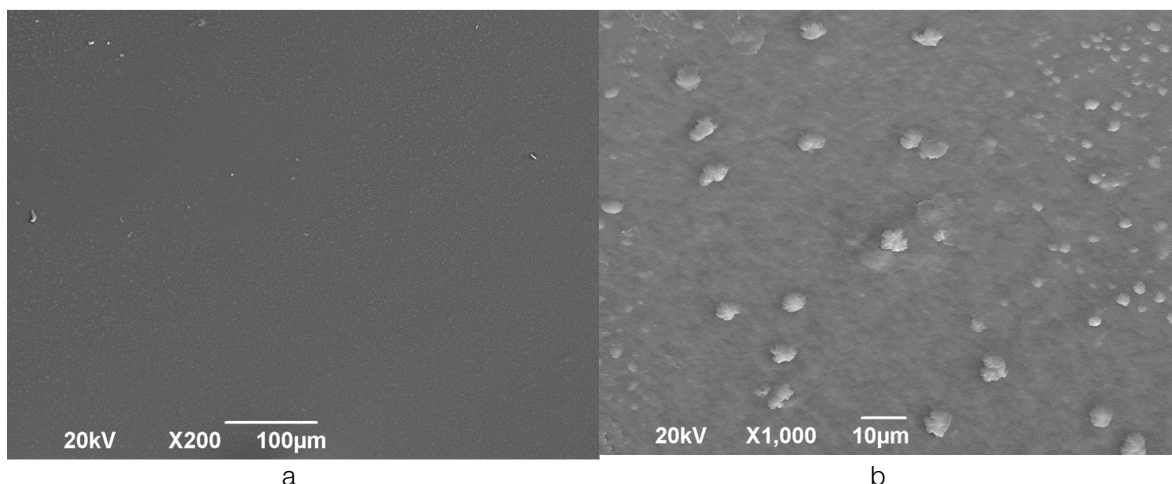


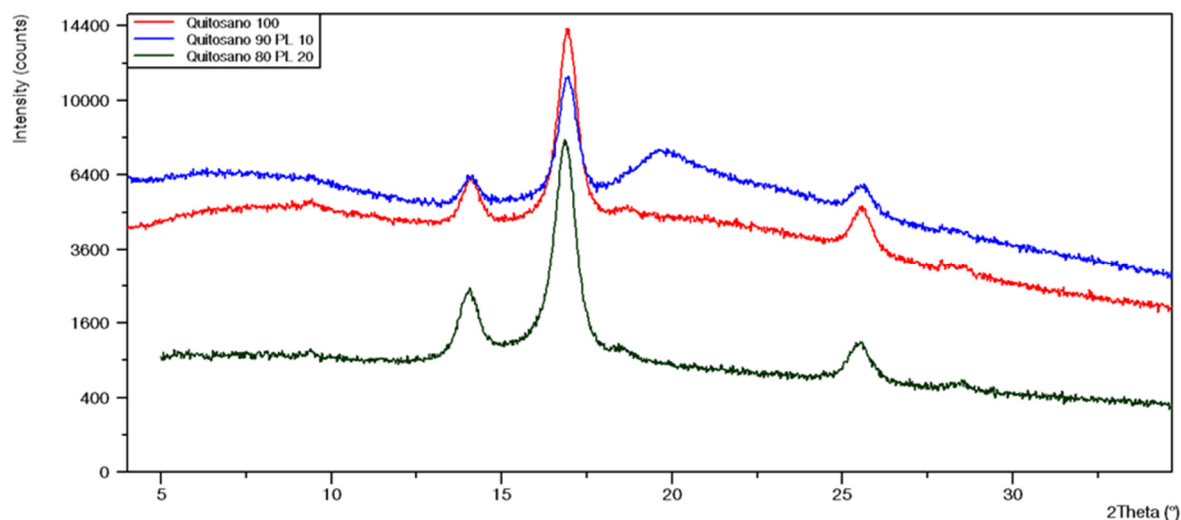
Figura 36. Micrográficas película de quitosano sin plastificante: aumentos de 200x (a) y 1000x (b).

En general, se puede decir que gracias a la porosidad exhibida en las películas hay transporte de oxígeno, de nutrientes y de masa para los factores de crecimiento, facilitando así la replicación celular (98), para que en últimas ocurra la producción de nuevos tejidos, debido a que el quitosano es un material que posee afinidad con los elementos de la matriz extracelular (42). Incluso, aun si el dispositivo elaborado no hubiese ofrecido una forma porosa, los poros pueden formarse *in situ* una vez el material se haya implantado, funcionando a modo de andamio, siendo aptas para la aplicación final. Estas dos situaciones se presentaron en las películas elaboradas. Añadiendo a lo anterior, el tamaño de poro en las películas de composición 80:20 y 90:10 oscilaba entre 1-100 micrómetros, haciendo del material sintetizado en el laboratorio un dispositivo apto para su uso como andamio, siendo comparable con andamios similares de quitosano (extraído desde el hongo *Gongronella butleri* (con un peso molecular de 5×10^4 g/mol y un grado de deacetilación de 77%) (99) combinados con fibroblastos humanos, que presentaban una porosidad entre 60 a 90 micrómetros con un tamaño de poro promedio de 84 micrómetros. Cabe resaltar que el tamaño de poro es un parámetro útil de acuerdo al tejido a regenerarse, pues en el caso de que el tejido sea blando (piel, por ejemplo), el tamaño de poro promedio debe ser de 40-140 micrómetros para un adecuado crecimiento celular, (100) y de tratarse de tejidos rígidos (como el óseo), los andamios deben tener un tamaño de poro promedio de

100-135 micrómetros para inducir el crecimiento de hueso, prefiriéndose un tamaño superior a 300 micrómetros para vascularización y formación ósea. (101)

7.5.2. Caracterización de las películas de quitosano por rayos X

En el caso de los difractogramas de las películas de quitosano (en proporciones 80:20, 90:10 y 100:0) se encuentran patrones similares a los observados anteriormente para el polímero en forma sólida, puesto que las reflexiones características que suelen aparecer entre 9-20° se ven desplazadas ligeramente hacia otros valores de reflexión (13, 16 y 25°), respectivamente, en las películas finales resultantes (ver gráfica 14).

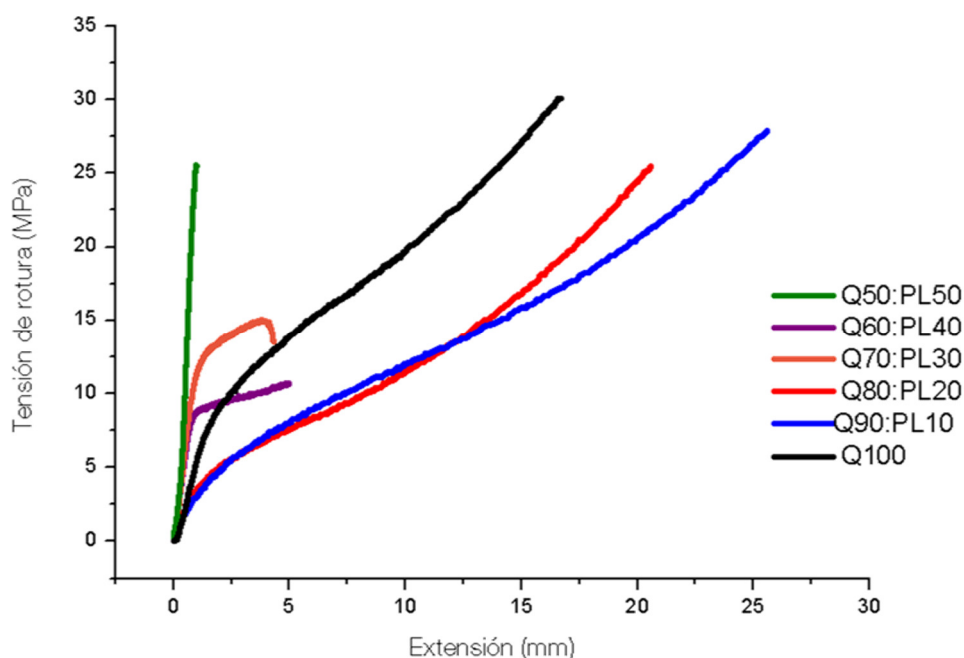


Gráfica 14. Difractogramas de rayos X para las películas de quitosano. Película sin plastificante (línea roja); película en proporción 80:20 (línea verde); película en proporción 90:10 (línea azul).

Esto podría deberse a que el quitosano en las películas ya no se encuentra organizado en forma de sólido granular, porque la adición de glicerol y ácido oleico le confirieron una forma distinta, en la que el material exhibió algo de transparencia, posiblemente atribuida al carácter amorfo del quitosano (sin que esto implique que todo material que sea transparente deba ser necesariamente amorfo). Los resultados obtenidos son comparables a los obtenidos por Wang (102), quien también observó un ligero desplazamiento de sus señales respecto de las del quitosano sin la adición de plastificante.

7.5.3 Propiedades mecánicas de las películas de quitosano obtenidas

Las películas de quitosano, al ser materiales muy delgados, no permitieron la realización de ciertos ensayos mecánicos como por ejemplo pruebas de dureza e indentación (en donde un punzón realiza presión sobre el material de acuerdo a la norma ASTM E384) dado que el grosor presentado por el material era inferior al requerido para este propósito, además el punzón ejercería la presión sobre los soportes y mordazas antes que sobre el material a estudiar. Tampoco fue posible realizar ensayos de rasgado (norma ASTM D1922) debido a que el material era muy delgado. Por tal motivo, se eligieron los ensayos de tensión de acuerdo a lo sugerido por la norma ASTM D638, ya que mediante estos, se podía comprobar cuales películas de quitosano eran las indicadas para ser implantadas en los biomodelos animales. La gráfica 15 corresponde a la relación entre la tensión de rotura versus extensión del material estirado para cada una de las composiciones de las películas.



Gráfica 15. Tensión de rotura versus extensión para las películas de quitosano. Q: quitosano y PL: plastificante.

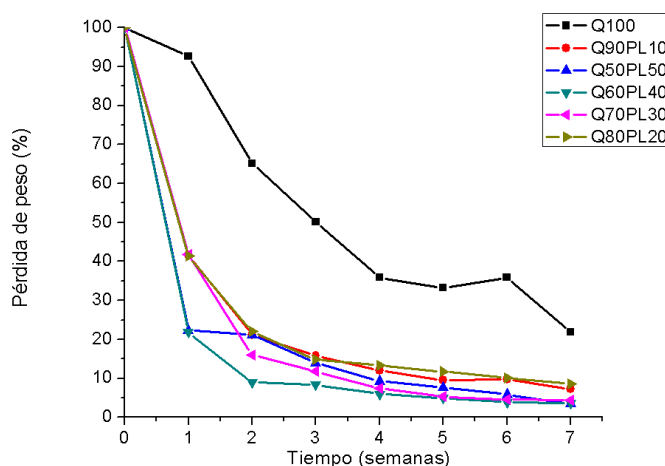
De la gráfica de tensión de rotura vs extensión, se puede concluir que con el incremento del contenido de la mezcla plastificante en la película, la tensión de rotura requerida para que se presente una falla estructural será menor (tal como ocurrió en las películas de proporciones 50:50, 60:40 y 70:30), puesto que van a exhibir algo de flexibilidad, mientras que si el contenido de plastificante es menor (como se observó en las películas de proporciones 80:20, 90:10, y 100:1 o sin plastificante), la tensión de rotura y la extensión serán mayores para que las cadenas del polímero experimenten la mencionada falla, la cual ocurre en el último punto de la gráfica en todos los casos.

Una evidencia de cambio en las propiedades mecánicas se puede apreciar en la gráfica 15, dado que la tensión de rotura en la película de quitosano sin plastificante es inicialmente de 30.06 MPa, y disminuye hasta 25.50 y 27.90 MPa en las películas de proporciones 80:20 y 90:10, respectivamente. Así mismo la extensión, que inicialmente es de 16.7 mm para la película sin plastificante, se incrementa hasta 20.6 y 25.6 mm para las películas de proporciones 80:20 y 90:10 respectivamente. Esto indica que la mezcla plastificante reduce la rigidez de las películas de quitosano conforme aumentan la flexibilidad y la elongación proporcionadas por el plastificante, dado que este aísla las cadenas del polímero, siendo esto representado por segmentos blandos (aportados por el glicerol y el ácido oleico) frente a los segmentos duros (cadenas unidas de quitosano). Dicha tendencia no ocurrió de igual manera en las demás películas, puesto que si se compara la tensión de rotura y extensión de la película de quitosano sin plastificante (30.06 MPa y 16.7 mm) frente a estos mismos parámetros en las películas de proporciones 50:50 (26 MPa y 3 mm), 60:40 (12 MPa y 5 mm) y 70:30 (9 MPa y 6 mm), puede decirse que hubo una disminución en la tensión de rotura por la adición de mezcla plastificante; sin embargo no experimentaron una extensión apreciable. Este hecho podría atribuirse a las interacciones presentadas entre las cadenas de quitosano con la mezcla plastificante, es decir, la separación entre las cadenas del quitosano fue excesiva, hecho que no contribuyó a favorecer la flexibilidad, puesto que las películas de proporciones 50:50, 60:40 y 70:30,

presentaron una cantidad de mezcla plastificante más elevada frente a las películas de proporciones 80:20 y 90:10. Finalmente, y de acuerdo a los resultados aportados por los ensayos mecánicos de tensión, las películas de proporciones 80:20 y 90:10 son aptas para su uso en implantación, dada la flexibilidad presentada. Los resultados obtenidos son comparables a los reportados por autores como Suyatma (67), quien obtuvo para una película de quitosano de proporción 80:20 una tensión de rotura y estiramiento de 31.8 MPa y 45 mm, respectivamente, y de forma similar Azad(70) obtuvo una tensión de rotura de 35.2 MPa para una película de quitosano sin plastificante con un grado de deacetilación del 75%, esto quiere decir que los resultados de tensión de rotura obtenidos son idóneos y adicional a ello, dan un indicio de cuál sería la resistencia a la rotura que soportarían las películas implantadas en los modelos animales.

7.5.4 Estudios de degradación hidrolítica

El comportamiento que podrían adquirir las películas de quitosano al degradarse en el interior de los biomodelos animales simulando condiciones fisiológicas se puede apreciar en la gráfica 16, en donde la tendencia de las muestras inmersas en la solución reguladora de fosfatos durante un periodo de siete semanas, a pH 7.47 y 37°C, es hacia la pérdida gradual de peso conforme avanza el tiempo.



Gráfica 16. Perfil de degradación hidrolítica (pérdida de peso en función del tiempo) para las películas de quitosano elaboradas. Q: quitosano y PL: plastificante.

Se aprecia que la película sin plastificante exhibió una degradación lenta frente a las películas de quitosano con plastificante (en proporciones 50:50 a 90:10), esto se puede atribuir a que la solución reguladora de fosfatos fue incapaz de desintegrar la película de quitosano, algo que si sucedió en el caso de las películas de quitosano con plastificante, pues la presencia de la mezcla plastificante además de ayudar en la separación de las cadenas del polímero y conferir flexibilidad a las películas, al disolverse en la solución de fosfatos hace que estas pierden consistencia, siendo mas fácilmente degradables. Si bien todas las películas de quitosano con plastificante estuvieron sometidas a las mismas condiciones de trabajo, cabe señalar que las películas de quitosano (en proporción 80:20 y 90:10), al presentar un mayor contenido del polímero respecto a la cantidad plastificante, se degradaron mas lentamente, siendo poco disueltas por la solución de fosfatos frente a las películas de proporciones 50:50, 60:40 y 70:30, las cuales al presentar un mayor contenido de mezcla plastificante, se degradaron fácilmente ante la solución reguladora de fosfatos, la cual fue capaz de disolver la mezcla plastificante presente en las películas elaboradas. En la gráfica 16, se aprecia que en la semana 3.5 del estudio hay entre 6-15% de material remanente, y en la semana 7 se encuentra entre un 2-9% de material remanente (estos resultados no incluyen a la película sin plastificante). De extrapolar estos resultados hacia condiciones *in vivo*, es probable que quedaría poco material remanente al cabo de 21 días de implantación; sin embargo, este estudio no permite comparar el periodo de tiempo en el que se degradaron las películas de forma *in vitro* respecto al periodo de implantación *in vivo*, puesto que al interior de los modelos animales la degradación del material polimérico se daría mucho más eficientemente y en un menor tiempo dada la acción de los macrófagos, fagocitos, enzimas y fluidos fisiológicos(41), frente a lo que se observaría en la situación *in vitro* donde apenas se simulaban el pH y la temperatura fisiológicas, en una solución salina reguladora de fosfatos. Los resultados de la degradación hidrolítica de las películas de quitosano obtenidas son similares a los de Tomihata (103), pues al cabo de la primera semana sus materiales ya se habían

degradado entre un 30-60%, mientras que el material experimental se degradó un 30-50% en igual periodo de tiempo.

7.6 Estudio de biocompatibilidad del quitosano en modelos animales.

De acuerdo a la norma ISO 10993 sección 6 (80), el periodo de implantación seleccionado fue de 21 días, tiempo suficiente en que las películas de quitosano se degradarían al interior de cada uno de los biomodelos. Según los resultados de las caracterizaciones mecánicas anteriores, las películas de quitosano seleccionadas para implantación fueron las de proporciones 80:20; 90:10 y 100:0. Cabe señalar que las muestras implantadas se absorbieron en cuatro de los cinco biomodelos experimentales sin dejar restos de material, solamente en uno de ellos se presentó encapsulamiento, sin que esto represente una respuesta a cuerpo extraño. En general el aspecto macroscópico de la dermis se aprecia completamente sano sin mostrar indicios de inflamación, indicando que se presentó biocompatibilidad tal como era de esperarse, esto puede apreciarse en la figura 37b. No obstante la inspección macroscópica no indica que tanto del material quedó presente al interior de los biomodelos, ni tampoco da una clara evidencia de que tan sano estaban los tejidos antes y después de la implantación, para ello se analizaron las histologías en la sección 7.6.1

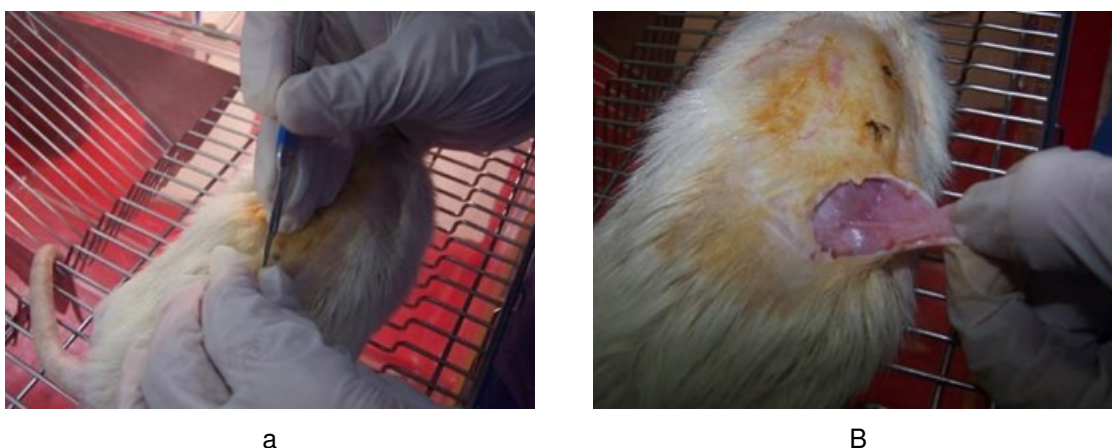


Figura 37. Incisión en la región dorsal (a) y recuperación de las muestras (b) luego de 21 días de implantación.

7.6.1 Análisis histológico

Para diferenciar los tejidos en las zonas de las implantaciones, se hizo uso de la mezcla hematoxilina: eosina para tinción. La hematoxilina, al ser un componente básico realiza el teñido de las estructuras ácidas en tonos azul violeta o púrpura (concretamente el núcleo celular); mientras que la eosina, al ser un compuesto ácido se encarga de la tinción de las estructuras básicas en tonos de color rosado, como por ejemplo el citoplasma y los tejidos musculares. Los resultados histológicos mostraron que aunque la constitución corporal de cada biomodelo era la misma, se presentaron diferencias individuales tanto en la fisiología de los animales, como en la morfología de las películas, esto explica el por qué los materiales implantados se degradaron a diferentes velocidades. Se muestran solamente las histologías relacionadas a los biomodelos 1, 3 y 6 (en los biomodelos 2 y 5 las histologías son similares al biomodelo 1). Cabe resaltar que el estudio histológico realizado presentó resultados comparables a los previamente reportados en la literatura por otros autores (38, 103). En el caso del primer biomodelo experimental denominado N1D1, en las figuras 38a y 38b se evidencia que el tejido conectivo en color rosa claro es normal, denso e irregular. Hay presencia de folículos pilosos (óvalos fucsia alargados) rodeados de glándulas sebáceas (esferas blanquecinas pequeñas). Cerca de la dermis profunda se observan adipocitos (línea ancha de color blanco), luego aparece una línea de queratina, localizada en la parte mas externa de la piel. Se observa el músculo (gránulos en color rosado) en contacto con la dermis profunda. No hay evidencia de cuerpos extraños o restos de material.

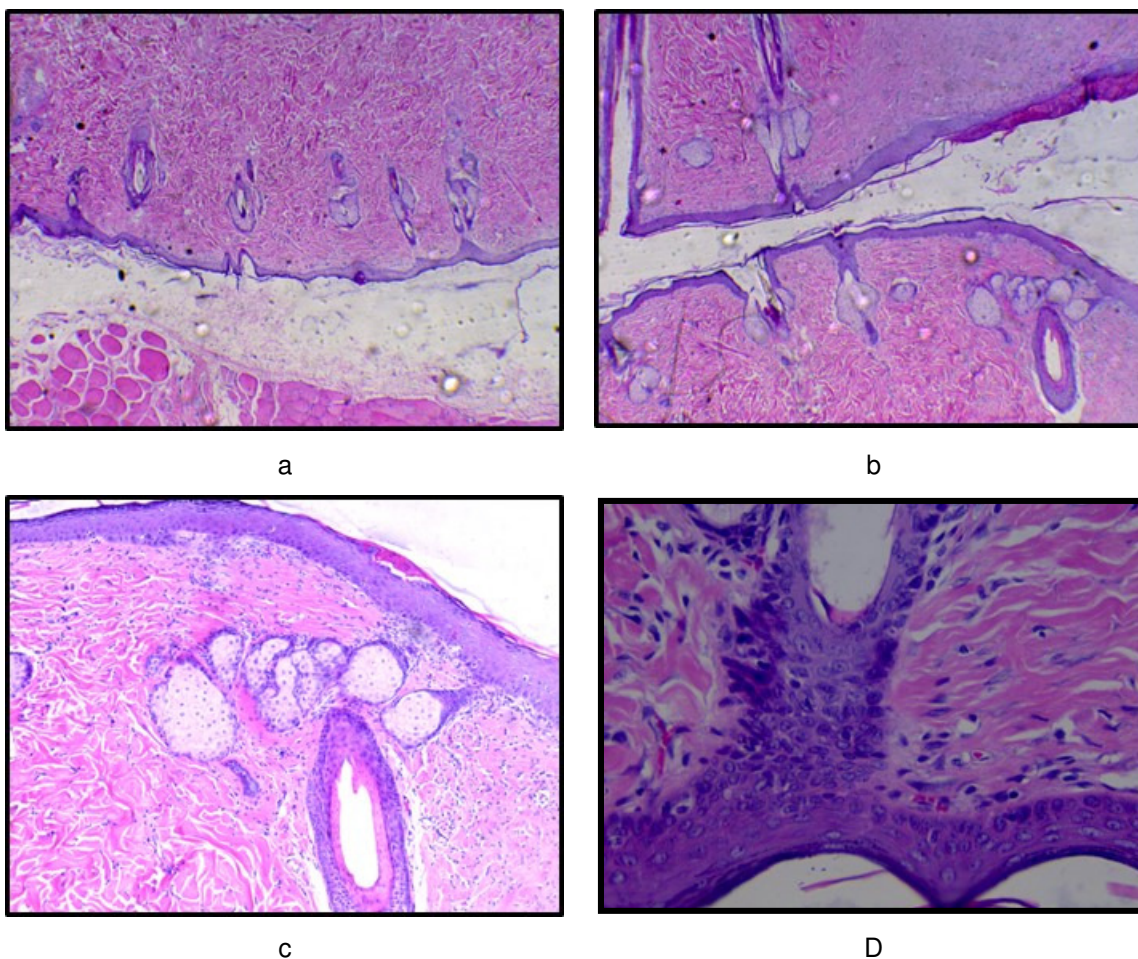


Figura 38. Histologías para el modelo N1D1: aumentos (a) y (b) 4x, (c) 10x y (d) 40x.

En la figura 38c se indica claramente la epidermis (línea continua de tono violeta claro), y debajo de la misma aparece el tejido conectivo (color rosa claro) junto a un folículo piloso (óvalo alargado), rodeado de glándulas sebáceas (esferas blancas). El aumento a 40x de la figura 38d, muestra la acumulación de fibroblastos (células pequeñas de color azul-violeta) cerca al folículo piloso y en medio del tejido conectivo (rosa claro). Para el caso del tercer biomodelo experimental (denominado N3D1) se encontró material polimérico, esto se detalla en la figura 39a, cuyo aumento a 4x muestra el tejido conectivo ampliamente distribuido (color rosa claro), hay presencia de folículos pilosos y glándulas sebáceas (tonos blancos). En la dermis profunda se muestran los adipocitos igualmente de color blanco y finalmente se observa la capa muscular, en color fucsia claro, siendo de aspecto normal.

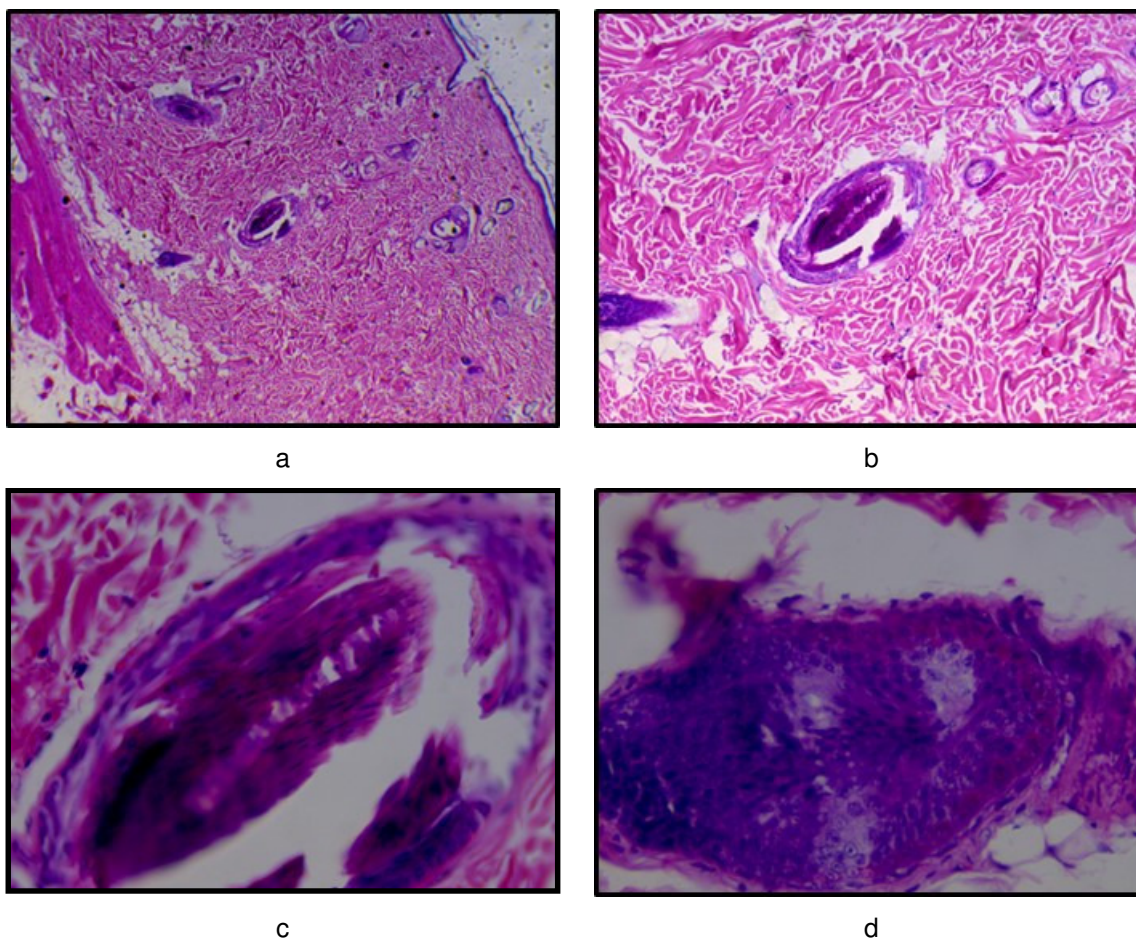


Figura 39. Histologías para el modelo N3D1: aumentos (a) 4x, (b) y (c) 10x y (d) 40x.

En la figura 39b, el aumento a 10x revela la presencia de material correspondiente a la película de quitosano implantada en proporción 90:10, que se ha teñido de color violeta por acción de la hematoxilina, debido a que cuando el pH se torna ácido, los grupos amino del quitosano presente en la película se protonan, pudiendo reaccionar con la hematoxilina, exhibiendo el color violeta. En la figura 39c con aumento a 10x se puede apreciar que una parte de la película de quitosano ha sido degradada ya que una cavidad de color blanco apareció alrededor de la misma, adicionalmente una capa de fibroblastos rodea al material implantado, encapsulándolo. Finalmente, la figura 39d con aumento a 40x muestra que el material polimérico estaba rodeado de fibroblastos, la presencia de tres cavidades (zonas claras al centro) alrededor de la película implantada, denotan que hubo degradación o reabsorción del material, y en la zona

inferior se observan adipocitos de color blanco. En el sexto biomodelo experimental (denominado N6D1) la película de quitosano se degradó por completo, pues en la figura 40a con aumento a 10x no hay indicios de material, solamente se aprecian el epitelio (línea densa de color violeta claro), el tejido conectivo normal de tipo denso no modelado (tono rosa claro), folículos pilosos (óvalos alargados), glándulas sebáceas (esferas pequeñas de color blanco) y vasos sanguíneos (pequeñas esferas coloreadas de color rosa claro). Rodeando al tejido conectivo hay tejido fibrótico, el cual induce cicatrización en aquella zona. En la figura 40b con aumento a 40x se ilustran claramente tres capas: la primera se refiere al estrato corneo (color rosa claro), una capa intermedia (estratos granulosos y espinosos, de color violeta), y finalmente una densa capa de queratina color fucsia, además de fibroblastos (pequeñas células coloreadas de azul) rodean estas tres capas.

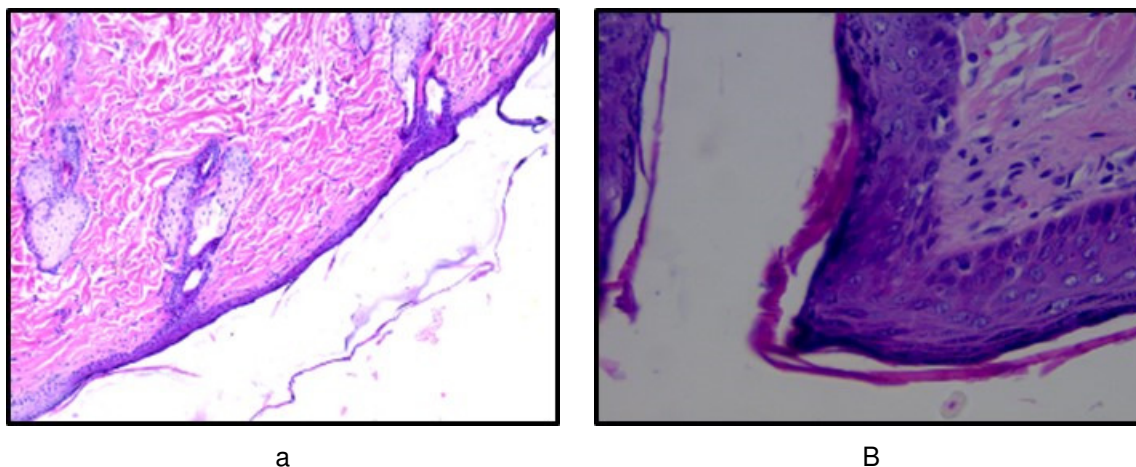


Figura 40. Histologías para el modelo N6D1: ampliaciones (a) 10x y (b) 40x.

Llama la atención que la película de quitosano comercial usada como material de control implantada al sexto biomodelo (denominado N6D2) no se degradó por completo, ya que el material se encapsuló como si fuera un cuerpo extraño. La figura 41a (aumento de 4x) muestra claramente la presencia de tejido epitelial con queratina (capa violeta), la dermis superficial y profunda (en color fucsia claro). El tejido conectivo se muestra denso y no modelado (igualmente en color fucsia), la capa muscular de aspecto granuloso se ve rodeada de tejido fibrótico. Al centro de la imagen, la figura

41b (aumento a 10x) se logran apreciar cuerpos extraños color malva claro, proveniente de la película de quitosano comercial, rodeados de una densa capa de fibroblastos (células pequeñas color azul violeta). Las figuras 41c y 41d (con aumentos a 40x) muestran que el material de control además de ser encapsulado fue fraccionado en trozos, probablemente una parte del mismo haya sido degradado antes de ser encapsulado, además la hematoxilina reaccionó con el material polimérico encapsulado, tiñéndole de un color fucsia claro, dada la protonación de los grupos amino del quitosano, al igual que ocurrió con el tercer biomodelo experimental.

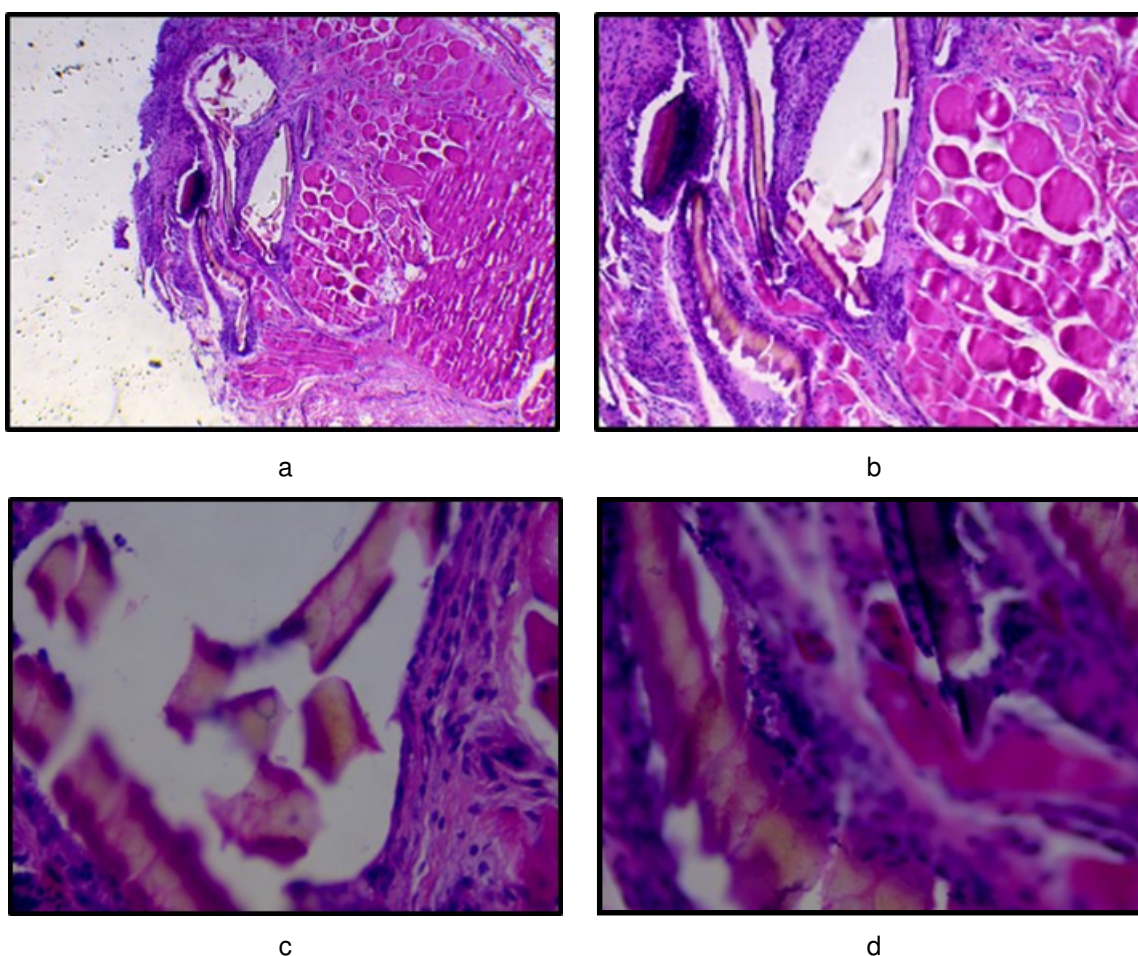


Figura 41. Histologías para el modelo N6D2: aumentos (a) 4x, (b) 10x (c) y (d) 40x.

Hasta aquí puede decirse que el material presente en la bolsa subcutánea de cada modelo animal no presentó respuestas inflamatorias en la región de implantación, salvo

lo ocurrido en el biomodelo N3D1 en donde hubo presencia de material polimérico degradándose, y en el biomodelo N6D2, donde si hubo encapsulamiento; sin embargo en los demás biomodelos experimentales se dio una respuesta rápida por parte de las células creadoras de tejidos, como fue el caso de los fibroblastos, encargados de sintetizar nuevos tejidos y de mantener en buen estado la matriz celular. Se concluye que los resultados histológicos de este proyecto dan a entender que los materiales sintetizados pueden ser utilizados en regeneración de tejidos, con resultados comparables a los de Brito y colaboradores (104), quienes también implantaron películas de quitosano a ratas Wistar. La tabla 11 resume los aspectos relacionados respecto al material implantado en todos los biomodelos experimentales.

Tabla 11. Resumen de los resultados histológicos*.

Materiales implantados	Modelo	Epitelio	Apariencia histológica				¿Material presente?
			Dermis superficial	Dermis profunda	Tejido conjuntivo	Capa muscular	
Película de quitosano extraído y plastificante (relación 90:10)	N1D1	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No
	N2D1	Normal	Normal	Normal	Normal	Tejido fibrótico cicatrizal	No
	N3D1	Normal	Normal	Material purpura sin degradar	Normal	Normal	Si
	N5D1	Normal	Normal	Normal	Normal	Tejido fibrótico cicatrizal	No
	N6D1	Normal	Normal	Normal	Normal	Tejido fibrótico cicatrizal	No
Película de quitosano comercial y plastificante (relación 90:10)	N1D2	Normal	Normal	Normal	Normal	Tejido fibrótico cicatrizal	No
	N2D2	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	No
	N3D2	Normal	Normal	Normal	Normal	Tejido fibrótico cicatrizal	No
	N5D2	Normal	Normal	Normal	Normal	Tejido fibrótico cicatrizal	No
	N6D2	Normal	Normal	Material sin degradar	Normal	Tejido fibrótico cicatrizal	Si

*El biomodelo N4 falleció antes de realizar el estudio. N# es el número del biomodelo (1-6). D1: películas de quitosano sintetizadas. D2: películas de quitosano comercial usadas como material de control.

7.6.2 Interacción de las películas de quitosano al interior de los biomodelos experimentales

El quitosano aunque fue biocompatible e inocuo tras su implantación, no es un compuesto que se produzca naturalmente al interior del organismo de los biomodelos estudiados, tal como sucedió en el biomodelo N6D2 en donde fue reconocido como un cuerpo extraño. Como consecuencia de ello, es probable que se haya metabolizado o degradado al interior de los cuerpos de los otros modelos animales por la acción de los macrófagos y fagocitos, transformándose en subproductos presentes en la matriz extracelular como pueden ser los glicosaminoglucanos, D-glucosamina y *N*-acetil-D-glucosamina. Otra posible forma de degradación del polímero al interior de los modelos animales ocurrió mediante la liberación de enzimas, como por ejemplo la lisozima, que es capaz de romper las uniones tipo $\beta(1,4)$ entre las cadenas de quitosano, transformándolas en oligosacáridos o monómeros de D-glucosamina (103). La figura 42 indica cómo sería la ruptura de los enlaces O-glucosídicos por parte de la enzima lisozima.

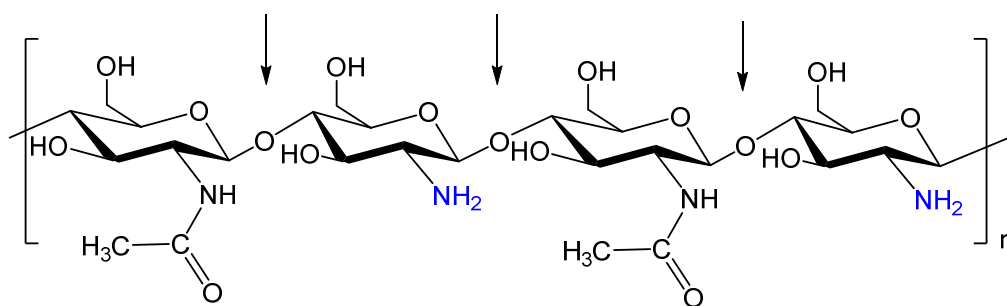


Figura 42. Posibles sitios de acción de la lisozima. Adaptado de Tomihata (103)

Adicionalmente, los fluidos fisiológicos propios de cada biomodelo animal pudieron degradar las películas (siendo reconocidas como cuerpos extraños), minimizando su presencia al interior del organismo mediante hidrólisis o cambios en el pH, de acuerdo a lo señalado por Renkema (41). Esto último no pudo comprobarse, debido a que no se monitoreó el comportamiento enzimático o fisiológico en los modelos animales durante los 21 días de estudio.

8. CONCLUSIONES

Se logró la extracción, identificación y caracterización del quitosano extraído del micelio del hongo *Aspergillus niger* (provisto por la empresa Sucroal S.A) con un rendimiento de reacción del 5.02% en base seca.

El quitosano fue caracterizado estructuralmente mediante espectroscopía FTIR, RMN (^1H y ^{13}C -CP-MAS). Dentro de sus propiedades fisicoquímicas, la masa molecular promedia fue de 1.52×10^5 g/mol, el grado de deacetilación (determinado por dos métodos diferentes) está comprendido entre 70.81-75.30%. El análisis térmico mostró estabilidad del polímero en el barrido en que se trabajó, la calorimetría de barrido diferencial dio a conocer que la temperatura de transición vítrea (T_g) fue de 124.36°C , y por difracción de rayos X se corroboró su carácter amorfo, tanto en el polímero como la transparencia en las películas de quitosano.

En cuanto a las propiedades mecánicas, las películas de quitosano demostraron tener resistencia, exhibieron algo de transparencia y flexibilidad. Además mediante diseño experimental se comprobó que la concentración idónea tanto para el polímero, como para la mezcla plastificante debía ser del 1% p/v o v/v según el caso. Así mismo, las películas de quitosano fueron lo suficientemente estables bajo condiciones fisiológicas simuladas durante un periodo de siete semanas luego de ser sometidas a pruebas de degradación hidrolítica.

Mediante microscopía electrónica de barrido se pudo estudiar la morfología de las películas obtenidas, ya que las micrográficas permitieron elucidar que el material aparentemente uniforme y continuo presentaba algunos pliegues y porosidad, haciéndolo una plataforma apta para el crecimiento celular, y por ende la regeneración de tejidos.

Los estudios *in vivo* realizados demostraron que las películas de quitosano después de 21 días de implantación no se encontraban presentes al interior de la mayoría de los biomodelos experimentales, habiéndose reabsorbido por completo, demostrando

su carácter biocompatible y biodegradable, sin afectar el tejido conectivo y sus alrededores.

Se presume que las películas de quitosano interactuaron con los fluidos fisiológicos y enzimas presentes en el organismo de los biomodelos experimentales, ya que el polímero pudo degradarse y metabolizarse hacia subproductos que constituyen la matriz extracelular, como es el caso de los glicosaminoglucanos, y residuos de D-glucosamina y *N*-acetil-D-glucosamina. De igual manera, los componentes plastificantes utilizados (glicerol y ácido oleico) no presentaron reacciones adversas en los biomodelos a los que se les implantó; salvo en uno de ellos, donde se presentó encapsulamiento de un fragmento del material polimérico de control implantado (reconocido como un cuerpo extraño) y que fue encapsulado hasta ser degradado por acción de los macrófagos y enzimas.

Por último, lo interesante y novedoso de este trabajo es que las películas elaboradas provienen de quitosano del hongo *Aspergillus niger*, ya que este quitosano obtenido está exento de sustancias alergénicas y nocivas al provenir de una fuente de origen no animal, a diferencia de otros trabajos en donde se utiliza quitosano comercial o industrial, con posibles alérgenos provenientes de las fuentes marinas, que podrían inducir rechazo del material implantado.

9. PERSPECTIVAS

9.1 Extracción de quitosano

Con respecto al proceso de obtención del quitosano del micelio de *Aspergillus niger*, se desea orientar la producción del mismo a escala industrial, así mismo se proponen cambios como utilizar enzimas (en lugar de NaOH) las cuales pueden ser capaces de hidrolizar los enlaces entre la quitina y los azúcares glucanos, y a su vez, utilizar enzimas que remuevan el grupo acetilo, para así minimizar la generación de efluentes básicos en el proceso actual, con consecuencias ambientales favorables y orientadas a la química verde. Así mismo emplear los glucanos resultantes (como subproducto de la extracción del quitosano) y aprovechar sus propiedades nutraceuticas y medicinales.

9.2 Producción de películas de quitosano

Es deseable que se preparen películas de quitosano que también sean mezcladas con otros polímeros tales como alginato o colágeno en el caso de la regeneración de tejidos blandos, y para el caso de la regeneración de tejido óseo, se pretende realizar su mezcla con ácido poli-L-láctico, ácido poliglicólico o poli-ε-caprolactona. Como consecuencia, surge la propuesta de emplear otros agentes plastificantes para las películas de quitosano de acuerdo al (los) polímero (s) con el que se desee mezclar.

Utilizar disoluciones de fármacos e incorporarlos a las películas de quitosano para su uso tópico, y aprovechar las propiedades de quitosano como agente hemostático en la producción de vendajes a partir de las películas del polímero para su uso en heridas abiertas que comprendan una gran extensión.

Elaborar películas de quitosano para usos múltiples (recubrimientos para protección de alimentos y fármacos).

Estudiar la morfología de las películas de quitosano haciendo uso de microscopía electrónica de barrido (SEM) mediante cortes en la sección transversal, para examinar

la forma en que se integran los componentes en las películas, y así mismo realizar un estudio mas detallado sobre su resistencia y propiedades mecánicas

9.3 Estudios de implantación *in vivo*

Elaborar matrices de quitosano, para posteriormente incluir las células habiendo determinado cuales son los factores de crecimiento responsables de la regeneración en los diferentes tejidos y órganos donde se vayan a implantar las películas.

10. PRESENTACIONES EN EVENTOS

Los resultados parciales y definitivos de este trabajo fueron presentados en sociedad en los siguientes eventos:

- XIII Simposio latinoamericano de polímeros (SLAP), Universidad de los Andes (Bogotá, Colombia) Septiembre 24 a 28 de 2012
- II Simposio de química, Universidad del Valle (Cali, Colombia), Octubre 29 a Noviembre 2 de 2012
- III Simposio de química, Universidad del Valle (Cali, Colombia), Octubre 28 a Noviembre 1 de 2013

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Meyer, U.; Meyer, T.; Handschel, J.; Wiesmann, H. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*; Springerli.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; p. 1016.
- (2) Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603–632.
- (3) Dutta, P. K.; Dutta, J.; Tripathi, V. S. Chitin and chitosan : Chemistry , properties and applications. *J. Sci. Ind. Res.* **2004**, *63*, 20–31.
- (4) Cai, J.; Yang, J.; Du, Y.; Fan, L.; Qiu, Y.; Li, J.; Kennedy, J. F. Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64*, 151–157.
- (5) Kurita, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol. (NY)*. **2006**, *8*, 203–26.
- (6) Zuluaga, F. Algunas aplicaciones del Acido poli-L-láctico. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **2013**, *37*, 125–142.
- (7) Sucroal. Micelio. <http://sucroal.com.co/product/micelio/> (accessed November 15, 2013).
- (8) Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *944*, 62–73.
- (9) Drury, J. L.; Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351.
- (10) Madhally, S. V; Matthew, H. W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1133–42.
- (11) Sachlos, E.; Czernuszka, J. T. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cell. Mater.* **2003**, *5*, 29–40.
- (12) Reece, J.; Urry, L.; Cain, M.; Wasserman, S.; Minorsky, P.; Jackson, R. *Biology Campbell*; 8th ed.; Pearson Education: San Francisco, California, USA, 2009; p. 1472.

- (13) Ratner, B.; Hoffman, A.; Schoen, F.; Lemons, J. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*; 3rd ed.; Academic press: San Diego, California, USA, 2013; p. 1555.
- (14) Gartner, L.; Hiatt, J. *Texto atlas de histología*; 2nd ed.; McGraw Hill: Santiago de Chile, 2001; p. 531.
- (15) George, J. H. S. Engineering of Fibrous Scaffolds for use in Regenerative Medicine Department of Materials, Tesis de Doctorado (Ingeniería de materiales). Imperial College. Department of materials, 2009, p. 200.
- (16) Gobin, A. S.; Butler, C. E.; Mathur, A. B. Repair and regeneration of the abdominal wall musculo facial Defect Using Silk Fibroin-Chitosan Blend. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 3383–3394.
- (17) Garlotta, D. A Literature Review of Poly (Lactic Acid). *J. Polym. Environ.* **2002**, *9*, 63–84.
- (18) Peñaranda Armbricht, J. Síntesis de Ácido Poli(L-Láctico) de Alto Peso Molecular, Aplicación en Electrohilado Y Fabricación de Matrices Usadas en Crecimiento Celular de Fibroblastos, Tesis de Maestría (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química, 2013.
- (19) Correa, L. S.; Godoy, J. E. Extracción de quitosano y fabricación de bloques porosos de ácido poliláctico/quitosano para la regeneración de tejido óseo, Tesis de pregrado (Ingeniería de materiales). Universidad del Valle. Facultad de ingeniería. Escuela de Ingeniería de materiales., 2011.
- (20) Correa Aguirre, J. P.; Betancur Escobar, J. Síntesis y caracterización de ácido poli (L-láctico) y su aplicación en dispositivos de fijación ósea, Tesis de pregrado (Ingeniería de materiales). Universidad del Valle. Facultad de ingeniería. Escuela de Ingeniería de materiales., 2010.
- (21) Brohem, C. A.; Cardeal Da Silva, L. B.; Tiago, M.; Soengas, M.; Berlanga, S.; Stuchi, S. Artificial Skin in Perspective : Concepts and Applications. *Pigment cell melanoma Res.* **2011**, *24*, 35–50.
- (22) Klar, A. S.; Güven, S.; Biedermann, T.; Luginbühl, J.; Böttcher-haberzeth, S.; Meuli-simmen, C.; Meuli, M.; Martin, I.; Scherberich, A.; Reichmann, E. Biomaterials Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with. *Biomaterials* **2014**, *35*, 5065–5078.

- (23) Kearns, V.; Macintosh, A. C.; Crawford, A.; Hatton, P. V. Silk-based Biomaterials for Tissue Engineering. *Top. tissue Eng.* **2008**, 4, 1–19.
- (24) Khor, E. *Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise*; 1st ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2001; p. 148.
- (25) Ravi Kumar, M. N. . A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, 46, 1–27.
- (26) Se-Kwon Kim. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*; CRC Press, Ed.; Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2011; pp. 3–37.
- (27) Cundumí, N.; Arango, J. Diseño del proceso de obtención de Quitosana a partir de Micelio, subproducto en la síntesis de Ácido Cítrico, Tesis de Pregrado (Ingeniería Química). Universidad del Valle. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química., 1994.
- (28) Gadd, G.; Gow, N. A. *The growing fungus*; 1st ed.; Chapman & Hall: Oxford, 1995; p. 473.
- (29) Pellizzari, E. E. Generalidades de los hongos. http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/410/Modulo_2/generalidades_de_hongos.pdf (accessed December 20, 2013).
- (30) Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. *Brock, Biología de Los Microorganismos*; 10th ed.; Pearson Education: New York, 2004; p. 483.
- (31) Sánchez, C.; Viña, A. Aspergillus y pulmón. *Arch. Bronconeumológico* **2004**, 40, 26–34.
- (32) Mislovicová, D.; Masárová, J.; Bendzálová, K.; Soltés, L.; Machová, E. Sonication of chitin-glucan, preparation of water-soluble fractions and characterization by HPLC. *Ultrason. Sonochem.* **2000**, 7, 63–8.
- (33) Muzzarelli, R.; Morgan, F. United States Patent 4,282,351. **1981**, 82.
- (34) Dos Santos, Z. M.; Caroni, A. L. P. F.; Pereira, M. R.; da Silva, D. R.; Fonseca, J. L. C. Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 2591–5.
- (35) Concha Fritz, A. del C. Evaluación de la acción del quitosano como atrapador de contaminantes inorgánicos en efluentes líquidos industriales de la novena

región., Tesis de Ingeniero de Ejecución en Química. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Ciencias. Departamento de Química, 2004.

- (36) Lárez Velásquez, C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Rev. Iberoam. polímeros* **2003**, 4, 91–109.
- (37) ASTM International. Standard Guide for Biocompatibility Evaluation of Medical Device Packaging materials (F2475-11), 2011, 1–4.
- (38) Vandevord, P. J.; Matthew, H. W. T.; Desilva, S. P.; Mayton, L.; Wu, B.; Wooley, P. H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 59, 585–590.
- (39) Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocoll.* **2009**, 23, 536–547.
- (40) ASTM International. Standard Terminology of Environmental Labeling of Packaging Materials and Packages (D5488-94), 1994, 1–15.
- (41) Renkema, G. H. Cloning of a cDNA Encoding Chitotriosidase, a Human Chitinase Produced by Macrophages. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26252–26256.
- (42) Sánchez, A.; Sibaja, M.; Vega-Baudrit, J.; Madrigal, S. Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Rev. Iberoam. polímeros* **2007**, 8, 241–267.
- (43) Fukamizo, T.; Honda, Y.; Goto, S.; Boucher, I.; Brzezinski, R. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. *Biochem. J.* **1995**, 311 (Pt 2, 377–83.
- (44) Wang, W.; Du, Y.; Qiu, Y.; Wang, X.; Hu, Y.; Yang, J.; Cai, J.; Kennedy, J. F. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 74, 127–132.
- (45) Parada, L. G.; Miranda, R.; Salvador, S. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Rev. Iberoam. polímeros* **2004**, 5, 1–16.
- (46) Orozco, Y. Obtención de perlas de quitosano por reticulación con propiedades para la inmovilización enzimática y su aplicación en un reactor a escala de laboratorio, Tesis de Maestría (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química, 2007.

- (47) Abdou, E. S.; Nagy, K. S. a; Elsabee, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 1359–67.
- (48) Gartner, C.; Peláez, C. A.; López, B. L. Characterization of chitin and chitosan extracted from shrimp shells by two methods. *e-Polymers* **2013**, *10*, 748–763.
- (49) Nwe, N.; Furuike, T.; Tamura, H. *Production of Fungal Chitosan by Enzymatic Method and Applications in Plant Tissue Culture and Tissue Engineering : 11 Years of Our Progress , Present Situation and Future Prospects*; Intech: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 135–162.
- (50) White, S. a; Farina, P. R.; Fulton, I. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, *38*, 323–8.
- (51) Synowiecki, J.; Ali, N.; Quawi, A. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chem.* **1997**, *60*, 605–610.
- (52) Miyoshi, H.; Shimura, K.; Watanabe, K.; Onodera, K. Characterization of some fungal chitosans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 1901–1905.
- (53) Rungsardthong, V.; Wongvuttanakul, N.; Kongpien, N.; Chotiwaranon, P. Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 589–593.
- (54) Balanta, D. Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente y en el tratamiento de aguas, Tesis de Pregrado (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química, 2009.
- (55) Muñoz, G. A. Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* para la liberación controlada de fármacos, Tesis de Maestría (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química, 2012.
- (56) Skorik, Y. a; Pestov, A. V; Yatluk, Y. G. Evaluation of various chitin-glucan derivatives from *Aspergillus niger* as transition metal adsorbents. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 1769–75.
- (57) Kumaresapillai, N.; Ameer Basha, R.; Sathish, R. Production and Evaluation of Chitosan from *Aspergillus Niger* MTCC Strains. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2011**, *10*, 553–8.

- (58) Moussa, S. H.; Tayel, A. a; Al-Turki, A. I. Evaluation of fungal chitosan as a biocontrol and antibacterial agent using fluorescence-labeling. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *54*, 204–8.
- (59) Khor, E.; Lim, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2339–2349.
- (60) Cárdenas, G.; Anaya, P.; von Plessing, C.; Rojas, C.; Sepúlveda, J. Chitosan composite films. Biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 2397–405.
- (61) Zamora-Mora, V.; Sibaja, M.; Vega-baudrit, J. Diseño de un biofilm a partir de colágeno de pieles de tilapia y de quitosano de camarón como soporte para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Rev. Iberoam. polímeros* **2010**, *11*, 607–619.
- (62) Paulino, A. T.; Santos, L. B.; Nozaki, J. Removal of Pb²⁺, Cu²⁺, and Fe³⁺ from battery manufacture wastewater by chitosan produced from silkworm chrysalides as a low-cost adsorbent. *React. Funct. Polym.* **2008**, *68*, 634–642.
- (63) Gamage, A.; Shahidi, F. Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and proteins from water. *Food Chem.* **2007**, *104*, 989–996.
- (64) Crini, G.; Badot, P.-M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 399–447.
- (65) Chen, J.-K.; Yeh, C.-H.; Wang, L.-C.; Liou, T.-H.; Shen, C.-R.; Liu, C.-L. Chitosan, the marine functional food, is a potent adsorbent of humic acid. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2488–98.
- (66) Vieira, M. G. A.; da Silva, M. A.; dos Santos, L. O.; Beppu, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 254–263.
- (67) Suyatma, N. E.; Tighzert, L.; Copinet, A.; Coma, V. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3950–7.
- (68) Leceta, I.; Guerrero, P.; de la Caba, K. Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93*, 339–46.

- (69) Peh, K.; Khan, T.; Ch'ng, H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2000**, *3*, 303–11.
- (70) Azad, A. K.; Sermsintham, N.; Chandkrachang, S.; Stevens, W. F. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **2004**, *69*, 216–22.
- (71) Zivanovic, S.; Li, J.; Davidson, P. M.; Kit, K. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1505–10.
- (72) Cárdenas, G.; Díaz, J.; Meléndrez, M. F.; Cruzat, C. Physicochemical properties of edible films from chitosan composites obtained by microwave heating. *Polym. Bull.* **2008**, *61*, 737–748.
- (73) Díaz Bojorge, D. A. Actividad antifúngica del quitosano sobre semillas de maíz (*Zea mays*) afectadas por el hongo *Fusarium oxysporum*, Tesis de Pregrado (Química). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química, 2010.
- (74) Inciarte Valbuena, A.; Chávez Huerta, A.; López, A.; Rincón Colina, M. Obtención y caracterización de películas de quitosano elaborado a partir de los desechos de la industria cangrejera. *Rev. Iberoam. polímeros* **2012**, *13*, 77–88.
- (75) Leceta, I.; Guerrero, P.; Ibarburu, I.; Dueñas, M. T.; de la Caba, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *J. Food Eng.* **2013**, *116*, 889–899.
- (76) Levine, I. *Fisicoquímica Volumen 2*; McGraw Hill, Ed.; 5th ed.; McGraw Hill: Madrid, 2002; p. 1194.
- (77) Kasaai, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68*, 477–488.
- (78) ASTM International. Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics (D638-10), 2010, 1–16.
- (79) ASTM International. Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants (F1635-11), 2011, *i*, 1–7.

- (80) International Standard Organization. Biological evaluation of medical devices - Part 6: tests for local effects after implantation (ISO 10993), 2009, 6, 1–38.
- (81) Gartner, C.; López, B. L.; Sierra, L.; Graf, R.; Spiess, H. W.; Gaborieau, M. Interplay between structure and dynamics in chitosan films investigated with solid-state NMR, dynamic mechanical analysis, and X-ray diffraction. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 1380–6.
- (82) Kumirska, J.; Czerwicka, M.; Kaczyński, Z.; Bychowska, A.; Brzozowski, K.; Thöming, J.; Stepnowski, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar. Drugs* **2010**, 8, 1567–636.
- (83) Pawlak, A.; Mucha, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochim. Acta* **2003**, 396, 153–166.
- (84) Kasaai, M. R.; Arul, J.; Charlet, G. Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2000**, 38, 2591–2598.
- (85) Abdel-Fattah, W. I.; Jiang, T.; El-Bassyouni, G. E.-T.; Laurencin, C. T. Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan microsphere matrices for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2007**, 3, 503–14.
- (86) Huang, H.; Lin, W.; Lin, J. Chitosan Obtained from Cell Wall of *Aspergillus Niger* Mycelium. *Chem. Res. Chinese Univ.* **2004**, 20, 156–158.
- (87) Cai, J.; Yang, J.; Du, Y.; Fan, L.; Qiu, Y.; Li, J.; Kennedy, J. F. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Carbohydr. Polym.* **2006**, 65, 211–217.
- (88) Neto, C. G. T.; Giacometti, J. a.; Job, a. E.; Ferreira, F. C.; Fonseca, J. L. C.; Pereira, M. R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydr. Polym.* **2005**, 62, 97–103.
- (89) Kittur, F. S.; Harish Prashanth, K. V.; Udaya Sankar, K.; Tharanathan, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydr. Polym.* **2002**, 49, 185–193.
- (90) Sakurai, K.; Maegawa, T.; Takahashi, T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly (N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer (Guildf)*. **2000**, 41, 7051–7056.

- (91) Guinesi, L. S.; Cavaleiro, É. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochim. Acta* **2006**, *444*, 128–133.
- (92) Zhang, Y.; Xue, C.; Xue, Y.; Gao, R.; Zhang, X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1914–7.
- (93) Epure, V.; Griffon, M.; Pollet, E.; Avérous, L. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 947–952.
- (94) Chen, J. L.; Zhao, Y. Effect of molecular weight, acid, and plasticizer on the physicochemical and antibacterial properties of β -chitosan based films. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, E127–36.
- (95) Kim, K. M.; Son, J. H.; Kim, S.; Weller, C. L.; Hanna, M. A. Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type. *J. Food Sci. E Food Eng. Phys. Prop.* **2006**, *71*, 119–124.
- (96) Romanazzi, G.; Gabler, F. M.; Margosan, D.; Mackey, B. E.; Smilanick, J. L. Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology* **2009**, *99*, 1028–36.
- (97) Casariego, a.; Souza, B. W. S.; Vicente, a. a.; Teixeira, J. a.; Cruz, L.; Díaz, R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocoll.* **2008**, *22*, 1452–1459.
- (98) Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1387–408.
- (99) Nwe, N.; Furuike, T.; Tamura, H. The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration Templates Are Significantly Enhanced by Chitosan from. *Materials (Basel)*. **2009**, *2*, 374–398.
- (100) Bakar, A.; Hilmi, M.; Halim, A. S.; Hassan, A.; Lim, C. K.; Noorsal, K. In vitro characterization of a chitosan skin regenerating template as a scaffold for cells cultivation. *Springerplus* **2013**, *2*, 79–88.

- (101) Murphy, C. M.; Haugh, M. G. The effect of mean pore size on cell attachment , proliferation and migration in collagen glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering . *Biomaterials* **2010**, *31*, 461–466.
- (102) Wang, J.-W.; Hon, M.-H. Preparation of poly(ethylene glycol)/chitosan membranes by a glucose-mediating process and in vitro drug release. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96*, 1083–1094.
- (103) Tomihata, K.; Ikada, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* **1997**, *18*, 567–75.
- (104) Mattos de Brito, M. K.; Pellizzon, C. H.; Schellini, S. A.; Galvão, C.; Padovani, C. R. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. *An. Bras. Dermatol.* **2009**, *84*, 35–40.