

Síntesis de Nanocompuestos de Quitosano/Óxido de Grafeno por el Método de Liofilización como Potenciales Andamios para Ingeniería de Tejidos.

Cesar A. Valencia¹, Carlos D. Grande², H. Fabio Zuluaga^{1*}

1. Laboratorio SIMERQO polímeros, Departamento de Química, Universidad del Valle, Calle 13 # 100-00, Cali, Colombia.

2. Grupo de Investigación de Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico, Km 7, Antigua Vía Puerto Colombia, Barranquilla-Atlántico, Colombia.

KEYWORDS. Andamios porosos, liofilización, Nanocompuesto, Óxido de grafeno, Quitosano.

ABSTRACT: La reparación de tejidos dañados constituye un tema de suma importancia para la medicina por lo que se prepararon nuevos andamios que pueden permitir el crecimiento natural de las células. Estos se prepararon utilizando quitosano (CHIT) y Óxido de grafeno (GO), mediante la técnica de liofilización. El CHIT se extrajo a partir del micelio del hongo *Aspergillus Niger* con un rendimiento del 11,5%, un peso molecular promedio viscoso (Mv) y promedio en peso (Mn) de 18715 g/mol y 6482 g/mol, respectivamente y un grado de desacetilación (DA) de 55,7% y 66,7% calculados por el método potenciométrico y por RMN-¹H respectivamente. Este además se caracterizó por espectroscopia FTIR y RMN-¹H. Por otro lado, el GO se sintetizó empleando un método mejorado de Hummers-Offemann y se caracterizó por FTIR, Raman, microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión de luz dinámica (DLS) y difracción de rayos X (DRX), evaluando la morfología y el grosor de las películas de GO. Posteriormente, se diseñaron tres formulaciones en las que se dispersó el GO en soluciones de CH₃COOH y CHIT, estas se liofilizaron para fabricar los andamios, los cuales se caracterizaron por FTIR, análisis termogravimétrico (TGA) y microscopía electrónica de barrido (SEM), lo que permitió evaluar la resistencia, morfología, porosidad y las interacciones hidrofílicas que se dan en los andamios. Además para analizar su estabilidad en medio fisiológico simulado, se les realizó una prueba de degradabilidad con suero fisiológico, comprobando que los andamios son aptos para fomentar el crecimiento celular de osteoblastos por lo que se espera evaluar estas características *in vitro* e *in vivo* en futuros estudios.

INTRODUCCIÓN

La recuperación de tejidos óseos va de la mano de procesos bioquímicos que se dan a nivel molecular y que se reflejan en el desarrollo celular. Por ello, es pertinente fomentar el crecimiento de las células creando nuevos materiales con características de andamio¹.

Un andamio es un soporte que permite interacciones celulares, que contribuyen a la formación y reparación de tejidos funcionales². Por tanto, los andamios actúan como soportes facilitadores de la migración, adhesión y transporte de células o moléculas bioactivas encargadas de los procesos regenerativos². Los andamios por ende, deben ser estructuras tridimensionales y porosas que sirvan como matriz celular temporal de fomento del crecimiento vascular y celular, mientras se da la regeneración tisular esperada².

El quitosano (CHIT) o poli (1,4'-O-β-2-amino-2-deoxi-D-glucosa), un polisacárido desacetilado derivado de la quitina (figura 1), ha demostrado cumplir con las características necesarias para la producción de andamios³. Su similitud con los glicosaminoglicanos le permite interactuar con las células como si fuera la estructura glucosídica de los proteoglicanos en el tejido óseo¹. Sin embargo, el bajo peso molecular de este polímero impide que tenga estabilidad y resistencia ante los procesos enzimáticos del organismo. Por lo anterior, se busca crear nuevos compuestos donde se copolimerice

o se formen interacciones tipo van der Waals entre el quitosano y otra molécula que le brinde estabilidad y resistencia para que no sea degradado antes de cumplir su ciclo como restaurador celular¹.

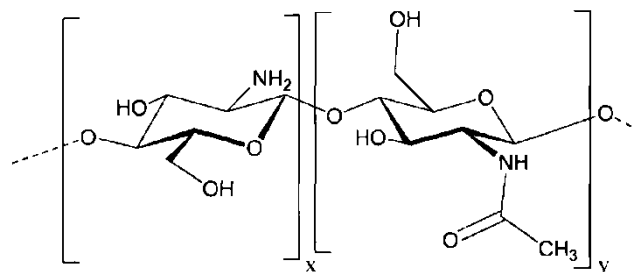


Figura 1. Estructura del quitosano. El subíndice "x" representa la cantidad de monómeros de quitina desacetilada.

Por otra parte, el óxido de grafeno (GO) es una molécula de estructura bidimensional muy resistente, del grosor de un átomo de carbono, pero con gran fortaleza debido a los enlaces tipo σ y las características de resonancia en los enlaces tipo π de los carbonos con hibridación sp^2 . Presenta alta estabilidad y propiedades de un policiclo aromático de baja tensión anular⁴.

El GO también exhibe una hibridación sp^3 que se relaciona con los grupos oxigenados en las inmediaciones y la parte central de la lámina⁵. Los grupos oxigenados que se obtienen en el GO por

oxidación del grafeno, consisten en hidroxilos (OH), epóxidos (COC) y carboxilos (COOH) que le confieren al GO la posibilidad de enlazarse por medio de enlaces de hidrógeno a otras moléculas, como es el caso del CHIT, que a su vez presenta grupos aminas (NH₂) e hidroxilos (OH)⁵. La posible estructura molecular de esta interacción se muestra en la Figura 2.

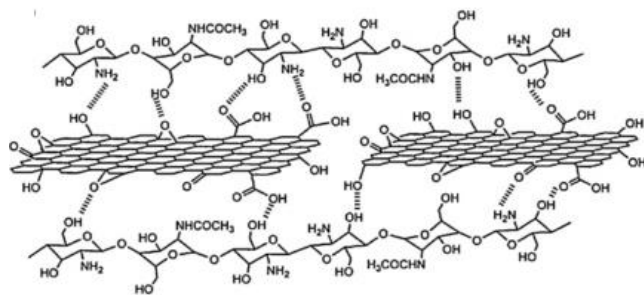


Figura 2. Enlaces de hidrógeno presentados en un nanocompuesto de CHIT/GO⁶.

Por lo anterior, la introducción del GO en el compuesto con CHIT podría mejorar las propiedades mecánicas del andamio haciendo que se degrade lentamente mientras da lugar el crecimiento celular.

El aumento de estas propiedades ha permitido que se utilicen este tipo de andamios en conservación de alimentos pues además de ser biológicamente activos, tienen propiedades antibacterianas⁷. En un organismo vivo estas propiedades evitarán enfermedades al momento del crecimiento celular. También, por su capacidad para degradarse tan fácilmente en medio acuoso⁸, el organismo se va a encargar de desecharlos sin necesidad de una intervención quirúrgica.

En esta investigación, se prepararon andamios de CHIT extraído del micelio del *Aspergillus Niger* al que se le agregó GO sintetizado por un método mejorado de Hummers-Offemann con el fin de evaluar si los andamios preparados mediante liofilización tienen propiedades y morfología que potencien la regeneración de tejido óseo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de extracción de CHIT. La hidrólisis básica del cuerpo vegetativo (micelio) del hongo superior *Aspergillus Niger* permite la transformación de la quitina contenida en el mismo en quitosano⁹. El porcentaje de extracción fue de 11,5% partiendo de 500 g de micelio limpio y seco. Aunque este rendimiento es similar a los reportados en la literatura¹⁰; es bajo comparado con el porcentaje de extracción de caparazones de crustáceos¹¹ puesto que los micelios normalmente contienen, además de la quitina que es la precursora del CHIT, distintos tipos de polisacáridos como β-glucanos, proteínas y ácidos grasos¹².

Por lo tanto, es posible generar CHIT con porcentajes mayores si la extracción se hace a partir de caparazones de crustáceos ya que más del 60% de su contenido es quitina, sin embargo, en estos puede haber remanentes proteínicos que pueden ser alergénicos por lo que se prefiere usar el micelio¹³. Además, las extracciones de caparazones requieren tratamientos de pigmentos con soluciones tóxicas y digestiones enzimáticas aumentando el riesgo de contaminación¹¹. El micelio, por otro lado, es un residuo producto de la obtención industrial de ácido cítrico por lo que es una materia

prima de fácil adquisición con condiciones de extracción más ligeras que permiten aprovechar un desecho constante para la producción de quitosano de bajo impacto ambiental¹¹.

Grado de desacetilación y caracterización de CHIT por RMN-¹H. La hidrólisis se realizó con NaOH al 40%, una concentración que genera un grado de desacetilación de la quitina mayor al 50%, sin provocar un considerable rompimiento de los enlaces que mantienen unidos a los monómeros por lo que no se reduce tanto el peso molecular del CHIT. El DA= 55,7%, se calculó por método potenciométrico (ver información de soporte) utilizando NaOH 0,101 M como agente titulante y una solución de CHIT en HCl. La siguiente ecuación permite el cálculo del DA por medio de dicho método¹⁴.

$$\%NH_2(DA) = 16,1(y - x) \frac{f}{w} \quad (1)$$

Donde (y) y (x) representan el segundo y primer volumen de equivalencia respectivamente, f es la concentración de la base y w es el peso de CHIT utilizado para la titulación.

El DA se calculó también por un segundo método, utilizando la técnica de RMN-¹H. En esta se utilizó la integración de las señales a δ= 4,74 y δ= 1,85 ppm, correspondientes a los hidrógenos de la amina y del metilo del grupo acetamida del CHIT, respectivamente¹⁵. Estas permitieron el cálculo del DA utilizando la ecuación (2) de relación espectroscópica y grado de desacetilación⁹.

$$\%DA = 100 - \frac{I_{H(D)}}{I_{H(A)} - I_{H(D)}} \times 100 \quad (2)$$

Donde I_{H(D)} corresponde a la integral del protón en la amina del monómero desacetilado e I_{H(A)} corresponde al protón en el metilo de la acetamida del monómero acetilado. El cálculo del DA por este método arrojó un resultado de 66,7% de DA.

Finalmente, se utilizó la técnica de RMN-¹H para la caracterización del CHIT. En este aparece una señal en δ= 3,69 ppm para el protón anomérico del monómero desacetilado y en δ= 3,48 ppm para el protón anomérico del monómero acetilado, además de las señales δ= 4,74 y δ= 1,85 ppm, mencionadas anteriormente, correspondientes a los hidrógenos de la amina y del metilo del grupo acetamida del CHIT, respectivamente¹⁵.

Caracterización de CHIT por espectroscopia FTIR. El espectro IR (figura S3) muestra las bandas características del CHIT¹⁵, siendo la banda de mayor frecuencia a 3360 cm⁻¹ con un hombro de 3273 cm⁻¹ correspondientes a la vibración de tensión O-H de las glucosaminas solapada por la vibración N-H de la amina en el carbono 2 (figura 1), además, en 1552 cm⁻¹ se muestra la banda de vibración de tensión N-H de la amina primaria de la estructura desacetilada. En 1639 cm⁻¹ aparece la banda -CONHC- correspondiente a la tensión del carbonilo del monómero acetilado y por último, en 1076 cm⁻¹ la banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace C-O-C de los carbonos anoméricos¹⁵.

Determinación del peso molecular del CHIT. Para la obtención del peso molecular, se realizó viscosimetría capilar y cromatografía de permeación en gel (GPC). Como los polímeros presentan un peso molecular promedio que depende de la longitud de sus cadenas y en general, polímeros como el quitosano se solubilizan lentamente generando soluciones viscosas, se puede medir el peso molecular promedio viscoso (Mv)¹⁶. Para esto se midieron los tiempos de caída de soluciones de 25 mL con un viscosímetro

ubbelohde, preparadas a partir de una solución patrón (ver información de soporte), cuyas concentraciones se muestran en la tabla S1; asimismo, se midieron las densidades de las soluciones y la constante β del viscosímetro ($3,31 \times 10^{-5}$) que se calcula con el tiempo de caída del agua. A partir de estos datos, se calculó la viscosidad específica para graficarla en función de la concentración (figura 3). Y aunque dicha función presenta poca linealidad debido a que las soluciones viscosas que se forman se solubilizan parcialmente puesto que el proceso de solubilidad es lento; se puede relacionar dicha función con el peso molecular por medio de la viscosidad intrínseca.

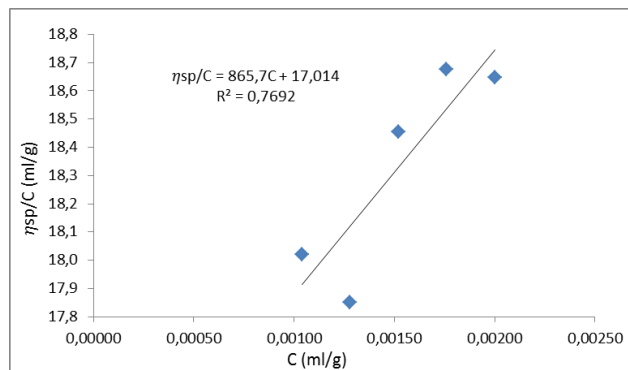


Figura 3. Curva de viscosimetría. Viscosidad específica vs concentración.

La viscosidad intrínseca es el valor del intercepto de la curva de viscosimetría específica y se simboliza como $[\eta]$. La ecuación de Mark Houwink-Sakurada relaciona esta viscosidad con las constantes k ($1,81 \times 10^{-3}$) y α (0,93) previamente establecidos para dichas condiciones¹⁷.

$$M_v = \left(\frac{[\eta]}{K} \right)^{1/\alpha} \quad (3)$$

El M_v calculado para el CHIT extraído fue de 18715 g/mol, un peso bajo debido a que la quitina en los micelios de hongos superiores es de menor peso que la contenida en crustáceos, adicional a esto, cuando se hace la hidrólisis, además de la desacetilación, ocurre un rompimiento de las cadenas poliméricas lo cual reduce más el peso molecular¹⁸.

Para la realización del GPC se utilizó la guía USP para la medición de CHIT por cromatografía.¹⁹

Se utilizó como fase móvil NaNO_3 0,15 M y HCOOH 0,5 M y se realizó una curva de calibración con estándares de pululano (figura S4), un polisacárido similar al CHIT por lo que las mediciones de peso molecular de CHIT no son exactas, pero son suficientes para su análisis y comparación. La estructura del pululano se muestra a continuación (figura 4).

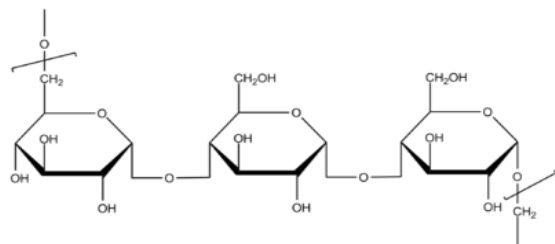


Figura 4. Estructura del pululano.

El pico correspondiente al CHIT aparece a los 22,3 minutos y utilizando la curva de calibración se calcula el peso molecular promedio en número (M_n) que resultó ser 6481,87 g/mol, este valor es menor que el M_v pues el M_n representa el peso total de todas las moléculas presentes en la muestra del polímero dividido entre el número total de moles, mientras el M_v se relaciona con una menor cantidad de moles, solo las de bajo peso molecular¹⁶.

Síntesis del GO. A partir de 3 g de grafito se obtuvieron 5 g de óxido de grafeno (GO), esto indica que ocurrió un proceso de oxidación lo cual produce un incremento en los pesos moleculares. Como estos grupos están dentro de la estructura bidimensional, aumentan su peso total produciendo un rendimiento superior al 100%.

Para la obtención de GO, se utilizó un método mejorado de Hummer's y Offemann²⁰. Normalmente en los métodos modificados, se utilizan soluciones de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$ para que la reacción no sea tan exotérmica por lo que estas pueden tardar de 1-2 semanas²⁰. Marcano, D y colaboradores, comprobaron que utilizar una solución 9:1 $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4$ no solo mejora el rendimiento de la reacción, sino que disminuye el tiempo de reacción a 6-12 h por lo que ese método se llevó a cabo²⁰. El uso de la mezcla de ácidos permite que el KMnO_4 que se utiliza para la oxidación reaccione completamente con el grafito en una reacción muy exotérmica, por lo cual aumenta el rendimiento y la velocidad de reacción. Cualquier remanente de la oxidación es eliminado con H_2O_2 ²⁰.

Caracterización del GO por espectroscopia FTIR. El espectro IR (figura S5) muestra las bandas características del GO²¹ siendo la banda de mayor frecuencia a 3363 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del O-H que se complementa con la banda del enlace C-OH a 1151 cm^{-1} para los grupos hidroxilos del GO. A 1651 cm^{-1} aparece la banda de tensión $\text{C}=\text{C}$ característica de los dobles enlaces en el anillo policíclico aromático del grafeno. A 1078 cm^{-1} aparece la banda C-O-C característica de los epóxidos. La banda del $\text{C}=\text{O}$ se encuentra desplazada a una frecuencia más baja por las interacciones del enlace de hidrógeno intramolecular, esto hace que se solape con la banda del $\text{C}=\text{C}$. Además, la banda se encuentra debilitada ya que los grupos carbonilo solo se encuentran alrededor de la lámina²¹.

Caracterización del GO por espectroscopia Raman. El espectro Raman (figura S6) muestra las dos únicas bandas características del GO. La banda D= 1358 muestra las interacciones $\text{sp}^2\text{-sp}^3$ entre los carbonos del GO y los grupos ricos en oxígeno, mientras la banda G= 1598 muestra las interacciones $\text{sp}^2\text{-sp}^2$ de los enlaces $\text{C}=\text{C}$. Se midió además el grado de oxidación del GO relacionando la intensidad de ambas bandas²². El grado de oxidación resultó ser del 80%, por lo que este porcentaje de GO se encuentra oxidado²².

Caracterización del GO por difracción de rayos X (DRX). El difractograma del GO (figura S7) muestra el pico de dispersión característico en el ángulo de $9,75^\circ$. Normalmente este pico aparece en 10^{21} y representa la dispersión causada por los grupos $-\text{COOH}$ que le confieren un aumento de tamaño a las láminas de GO en comparación al grafeno²¹. En el espectro de DRX aparecen también otros picos entre $20\text{-}40^\circ$ que son característicos del óxido de grafito²¹, esto indica que puede haber entre 2 y 10 láminas de GO superpuestas cuando el GO no se encuentra dispersado en una solución acuosa. Este factor pierde relevancia al preparar los andamios

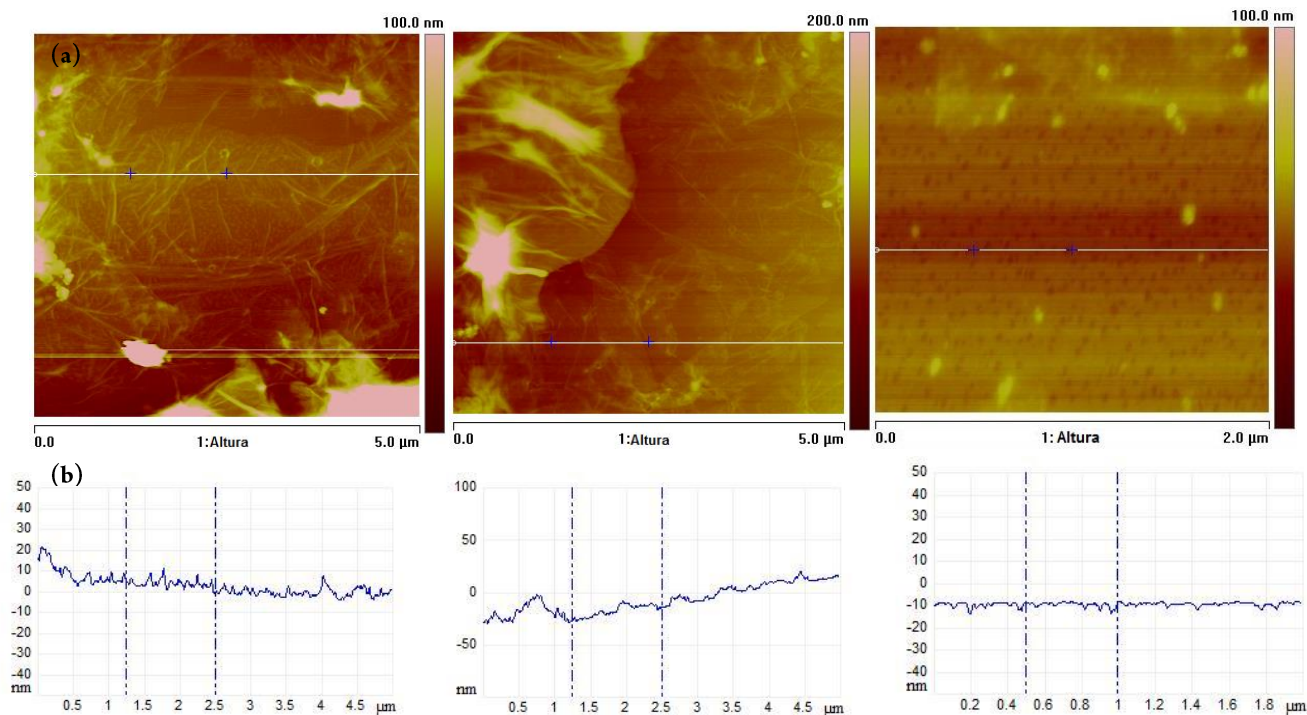


Figura 5. (a) Microscopía de fuerza atómica de láminas de GO seccionadas (b) grosor seccional de cada lámina en función de su altura.

ya que el óxido de grafito es dispersado, separando las láminas y formando de nuevo el GO. Esto se verificó por microscopía de fuerza atómica (AFM) donde las mediciones se hacen dispersando el GO en solución.

Microscopía de fuerza atómica (AFM) del GO. En la figura 5 se muestran las imágenes microscópicas de la muestra de GO dispersada en solución acuosa de 5.0 μm y 2.0 μm de área. Los perfiles de grosor de una sección de cada una de ellas se observan en (b). En cada caso, el grosor se acerca a los 0 nm a lo largo de cada sección puesto que el grosor de una lámina de GO no debe superar el grosor de un átomo de carbono²³, sin embargo, pueden existir algunas aglomeraciones en las que se alcanzan grosores de hasta 20 nm. Independiente de esto, se deja en evidencia que en solución cada lámina aparece de forma individual bien dispersada y tiene un grosor adecuado.

Tamaño de partícula de GO por dispersión dinámica de la luz (DLS). Se determinó la distribución del tamaño de partícula de las láminas de GO utilizando DLS (Figura S8). El diámetro medio de las láminas es de 531,2 nm. Como el tamaño es bajo, las láminas no se superponen al ser dispersadas en solución permitiendo la construcción de andamios sin aglomeraciones de GO.

Preparación de andamios de CHIT/GO por liofilización. Los andamios se prepararon siguiendo un protocolo similar al de Mohandesa, F y colaboradores²⁴. Debido a que el peso molecular del CHIT obtenido es bajo, la cantidad de CHIT que se utiliza para la elaboración de andamios debe ser alto²⁴. Por esa misma razón, la solución debe ser sometida a una agitación considerable para que se produzca la dispersión completa del compuesto.

El GO por otro lado, se somete a ultrasonido para separar las láminas que están superpuestas (como lo muestra el DRX) para formar de nuevo GO, eliminando las aglomeraciones del compuesto. Esto da lugar a una interacción eficiente entre el CHIT y el GO donde la rugosidad de la superficie a nanoescala del GO, y su es-

tructura bidimensional, establecen una interacción que adhiere las películas de GO a las cadenas del CHIT. Esto le brinda al CHIT características de un polímero de alto peso molecular además de propiedades mecánicas que caracterizan a las láminas individuales del GO⁴.

Se utilizaron tres formulaciones para la preparación de los andamios. Una sin GO y las otras dos con 0,5% y 1,0% de GO para comparar la morfología, estabilidad térmica y potencial biológico de cada andamio, y además, evaluar el efecto del aumento de GO sobre las propiedades de cada uno.

Posteriormente, con el proceso de liofilización se congelaron las muestras y a baja presión se sublimó el solvente, produciendo una estructura sólida y estable (figura 6) debido a la fuerte adhesión interfacial entre las láminas de GO bien dispersadas y la matriz polimérica del CHIT⁶. La estructura bidimensional nanométrica del GO encuentra facilidad para alinearse entre las cadenas del polímero. Las características hidrofílicas de dichas láminas y del CHIT les confieren una compatibilidad favorable en cuanto a la formación de enlaces de hidrógeno evidenciado en el FTIR⁶ por lo que se forman estructuras homogéneas, resistentes a solventes acuosos como lo demuestra la prueba de degradación hidrolítica y cuya porosidad y rugosidad le proveen buenas propiedades como andamio que estimulen el crecimiento celular tal y como se evidenció en el análisis de SEM².

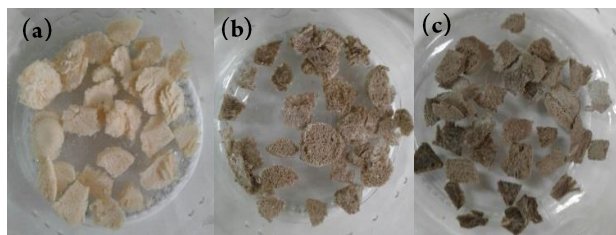


Figura 6. Andamios liofilizados de CHIT (a) sin GO, (b) con 0,5% de GO y (c) con 1,0% de GO.

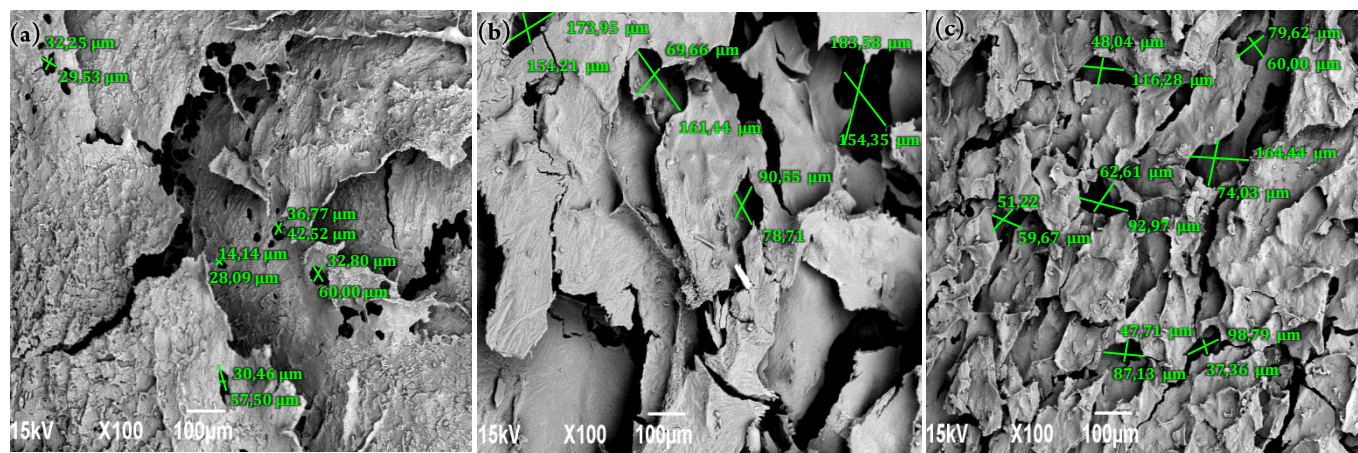


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de los andamios de CHIT (a) sin GO, (b) con 0,5% de GO y (c) con 1,0% de GO

Caracterización de los andamios por espectroscopia FTIR.

El espectro IR de los andamios (figura S9) presenta bandas de ambos compuestos. La señal de la banda a mayor frecuencia cercana a los 3360 cm^{-1} que para ambos compuestos representa la vibración de tensión de O-H, se ve debilitada al aumentar la cantidad de GO.

Esto sucede por las interacciones entre vibraciones moleculares de los hidroxilos de ambos compuestos donde la intensidad de los sobretonos aumenta y la de la banda fundamental disminuye²⁵, esto y la disminución de la frecuencia de la banda demuestra que existe una interacción de enlace de hidrógeno que se da entre los hidroxilos del CHIT y el GO⁶. Lo mismo ocurre en 1070 cm^{-1} donde está la banda de tensión del enlace C-O-C pues los grupos epóxido también interactúan con los grupos OH del CHIT⁶. En este caso, esta tendencia no es tan marcada como en la banda del hidroxilo debido a que la banda del C-O-C también hace parte del enlace glucosídico del CHIT, estos grupos oxigenados no son susceptibles a interactuar por este tipo de enlace⁶.

A su vez, entre 1704 cm^{-1} y 1726 cm^{-1} aparece la banda correspondiente al -COOH- que antes estaba debilitada y en una frecuencia más baja debido a los enlaces de hidrógeno intramoleculares del GO²¹. En los andamios los oxígenos de los carboxilos se están enlazando intermolecularmente con las moléculas oxigenadas del CHIT por lo que su frecuencia aumenta y ya no se solapan con la banda del C=C dejando en evidencia a los carboxilos del GO⁶.

Las otras bandas de enlaces que no hacen parte de las interacciones de hidrógeno como la banda de tensión del C-C y la de -CONHC- de la amida N- sustituida permanecen intactas⁶.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los andamios.

En la figura 7 se muestran 3 imágenes microscópicas de los andamios preparados con las 3 formulaciones respectivamente.

Cada composición muestra porosidad e interconexión pero la morfología varía conforme se aumenta la cantidad de GO en cada caso. En (a) que corresponde al CHIT en ausencia de GO, se percibe menos porosidad y rugosidad que en las demás muestras, además la mayoría de estos poros no supera los $50\mu\text{m}$, tamaño necesario para la proliferación celular²⁶. Por esta razón, es menos probable que las células se aglomeren en esta estructura; (b) y (c) que contienen 0.5% y 1.0% de GO, por el contrario, presentan mayor cantidad de poros y escamas. La formulación de 1,0% de GO muestra mayor cantidad de poros que a su vez son más uniformes,

con un tamaño promedio de $76,56 \pm 33,4\mu\text{m}$ superando el umbral para el crecimiento celular. Esta estructura más homogénea que podría promover una proliferación celular óptima, es el resultado de la interacción del CHIT y el GO cuyas interacciones hidrofílicas le brindan estabilidad⁶. Esto se verificó con el análisis termogravimétrico y la prueba de degradabilidad.

Análisis termogravimétrico (TGA) de los andamios. Las curvas termogravimétricas de los andamios se muestran en la figura S10. El termograma del andamio de CHIT sin GO (a) muestra dos pérdidas de masa durante el aumento de temperatura como sucede normalmente en el TGA del polímero sin liofilizar²⁷. La primera pérdida (26,5%) ocurre entre $71,1^\circ\text{C}$ y $128,6^\circ\text{C}$ y corresponde a la masa remanente de agua en el CHIT que no está absolutamente seco, ni siquiera después de la liofilización. Esta pérdida también es apreciable en los andamios con 0,5% de GO (b) y 1,0% de GO (c), sin embargo en estos últimos se pierde menos de la mitad de la masa acuosa que se degradó en (a), debido a que al aumentar la temperatura, dichos nanocompuestos tienden a comportarse como hidrogeles²⁸, los enlaces de hidrógeno entre ambos compuestos se debilitan permitiendo que las cadenas de CHIT se estiren moviéndose libremente, lo que aumenta la posibilidad de interactuar con otras láminas de GO, generando un mayor entrecruzamiento y una red tridimensional afín al agua, por lo que esta no es eliminada con facilidad²⁸.

La segunda pérdida (33,8%) de masa del andamio sin GO (a) con un máximo de degradación en $253,0^\circ\text{C}$ corresponde a la degradación de las cadenas de CHIT²⁷. En comparación, para los andamios con contenido de GO, la temperatura de descomposición es de $270,5^\circ\text{C}$ y $273,9^\circ\text{C}$ para (b) y (c) respectivamente. Esto demuestra que existe una fuerte interacción debido a los enlaces de hidrógeno entre las cadenas del CHIT y el GO⁴, lo que le brinda la estabilidad térmica de un polímero con mayor peso molecular²⁸.

Para los andamios con contenido de GO, aparece además una tercera temperatura de degradación con pérdidas de 19,3% y 17,6% en $485,6^\circ\text{C}$ y $481,8^\circ\text{C}$ para (b) y (c) respectivamente. Esta se atribuye a la remoción de los grupos funcionales oxigenados más estables del GO²³ y a la eliminación de restos aromáticos del mismo²³, por lo que esta degradación no se da en los andamios que carecen de GO.

Prueba de degradabilidad de los andamios en suero fisiológico. La figura 8 muestra los andamios agregados en medio acuoso esterilizado al 0,90% p/v de NaCl. Se evaluó su degradabilidad de

manera cualitativa en este medio ya que se espera realizar las pruebas biológicas *in vitro* de crecimiento celular de osteoblastos en el mismo medio, por esta razón los andamios deben tener propiedades que les permita degradarse lentamente mientras se da el proceso.

El andamio de CHIT sin GO (a) se degradó completamente, disolviéndose en el medio fisiológico en 5 min mientras los andamios cuyas composiciones contienen GO no se disuelven en el medio pues cuentan con las propiedades mecánicas que otorga el GO cuando interactúa con las moléculas de CHIT⁴. Por otra parte, el andamio con 0,5% de GO (b) pierde algo de volumen con respecto al de 1,0% (c) que conserva su grosor al tener una mayor interconexión entre ambas moléculas como se muestra en las imágenes de SEM.

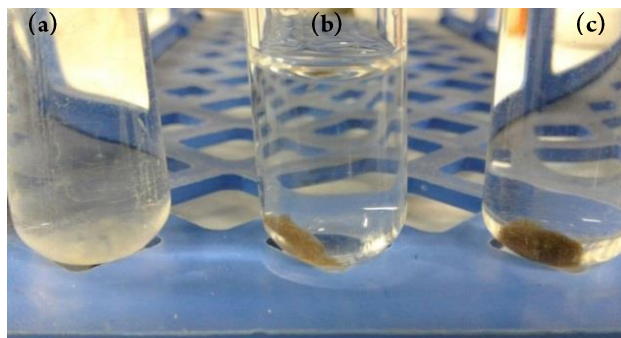


Figura 8. Prueba de degradabilidad de los andamios de CHIT (a) sin GO, (b) con 0,5% de GO y (c) con 1,0% de GO agregados en suero fisiológico.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Extracción y purificación de CHIT¹⁰. Se dispusieron 500 g de micelio del hongo *Aspergillus Niger* en tres frascos de precipitados y se agregaron 2 L de agua a cada uno. Con un agitador mecánico marca Heidolph RZR 2020 se mezcló cada solución para limpiar el micelio y, a continuación, se filtró en tela. El micelio se recolectó y el proceso de lavado se repitió 6 veces para eliminar las impurezas que no hacen parte del micelio.

Se dispersó el micelio limpio en 2 bandejas y se dejó secar a 90 °C durante 48 h en un horno, una vez seco se agregó a un balón de una boquilla de 5 L y a este se le agregó, en una proporción de 5:1, una solución de NaOH al 40% para hidrólisis (5 mL de solución de NaOH 40% p/v por cada gramo de micelio lavado y seco). Esta solución se agitó mecánicamente a 1300 rpm durante 5 h y a una temperatura de 120 °C y luego de completar la reacción esta se retiró y se filtró.

El sólido filtrado, que parece una masa parduzca de micelio hidrolizado, se recolectó y se lavó siguiendo el protocolo de lavado descrito anteriormente hasta alcanzar un pH próximo a 8, en este punto el micelio parece una masa café clara.

El micelio obtenido se repartió en un frasco de precipitado y se le agregó 3 L de agua, mientras se agitó a 1300 rpm, se le agregó ácido acético glacial, gota a gota, hasta alcanzar un pH de 3.8 para disolver el CHIT. Esta solución se filtró de nuevo y el filtrado se volvió a hidrolizar con NaOH al 30% agregado gota a gota hasta alcanzar un pH de 9,8 para precipitar el CHIT, el cual toma un aspecto blanco y floculante.

El CHIT se filtró en papel cuantitativo y se puso a secar por 24 h a 60 °C. Para purificarlo se solubilizó de nuevo con ácido acético y se recuperó con NaOH, se filtró, se secó y se calculó el rendimiento.

Síntesis mejorada de GO²⁰. En un erlenmeyer de 500 mL puesto en un refrigerador con hielo, se mezclaron 3 g de grafito, 9 g de KMnO_4 y una solución de 100 mL 9:1 H_2SO_4 : H_3PO_4 agregada muy lentamente con agitación magnética constante, a esta solución se le aplicó ultrasonido por 3 h en un sonicador Branson 2800 con reflujo de agua fría para evitar que la temperatura sobrepasara los 25 °C. Luego, se agregaron otros 9 g de KMnO_4 y se aplicó sonicación por 3 h más sin dejar que la temperatura superara los 40 °C. Se agregó una solución 0,03 v/v de H_2O_2 hasta que se observó efervescencia y se lavó con H_2O -miliQ en centrifuga hasta que se alcanzó un pH neutro. Se realizó un último lavado con CH_3OH y se secó en un horno al vacío a 60 °C por 2 h para obtener 5 g de GO.

Elaboración de andamios de CHIT/GO por el método de liofilización²⁴. Se pulverizó y se tamizó el CHIT para lograr un tamaño de partícula uniforme. El GO por otro lado, se dispersó en agua y se le aplicó ultrasonido por 30 min para provocar la exfoliación y separación de las láminas. Ambos compuestos se dispersaron en 3 soluciones de 80 mL de CH_3COOH 2% como se muestra a continuación (tabla 1) y se les aplicó agitación a 10000 RPM por 1 h en un equipo dispersor para homogeneizar.

Tabla 1. Formulaciones para la preparación de andamios de CHIT/GO por el método de liofilización.

Formulación (% p/p)	CH_3COOH 2% (g)	CHIT (g)	GO (g)
0 GO	80	19,5	0
0,5 % GO	80	19,0	0,5
1 % GO	80	18,5	1,0

Por cada formulación se completaron 2 tubos falcon con 30 mL de solución cada uno y se congelaron a -9,8 °C por 24 h.

Posteriormente los 6 tubos se pusieron en un liofilizador LABCONCO Freezone 4.5 a una presión de 0,12 mbar y a -52 °C por 48 h para sublimar completamente el solvente de CH_3COOH generando los andamios. Finalmente, estos se recortaron con un bisturí a 1 mm de espesor y 5 mm de diámetro aproximadamente para su caracterización, pruebas biológicas y futuras inserciones en hueso y piel de rata

Materiales y mediciones físicas. El micelio del Hongo *Aspergillus niger* se obtuvo de la empresa Sucroal. El resto de reactivos están disponibles de manera comercial. Las mediciones de RMN-

¹H se realizaron en un RMN Bruker Ultra Shield de 400 MHz empleando como disolvente DMSO-d₆, las mediciones de FTIR se realizaron en un equipo infrarrojo marca Thermo Modelo Nicolet 6700 empleando pastillas de KBr, para las mediciones de GPC se utilizó un HPLC agilent 1200 con 2 columnas Shodex ohpak de polímero entrecruzado y un detector de índice de refracción, la determinación por Raman se realizó en un Microscopio Raman Confocal Renishaw InVia Reflex., las mediciones de DRX se hicieron en un difractorómetro marca X'pert PRO - PANalytical, Radiación: k(alfa1) de 1.540598 y k(alfa2) de 1.544426 provenientes de un ánodo de cobre con voltaje acelerador de electrones de 45 kV y

corriente para generar electrones de 40 mA, con rejilla óptica de haz incidente de 1/4° y 1/8°, rejilla de haz difractado de 75 mm, rejilla soler de 0.04 rad y un detector PIXel en modo Scanning con una longitud activa (°) de 2.5108, tamaño de paso 0.0197°, rango de 2θ de 4° - 90° y tiempo por paso 304.390 s, las microscopías de fuerza atómica se tomaron en un AFM multimodo (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA) equipado con un sistema de control Nanoscope Iva (software versión 6.14r1), las mediciones de tamaño de partícula por DLS se midieron en un Zetasizer Nano ZS, las microscopías electrónicas de barrido (SEM) se tomaron en un equipo JEOL, JSM-6490LA (Japan) donde cada muestra fue cubierta con un baño de cobre y el análisis termogravimétrico se realizó en una termobalanza TA instruments 2050, ajustada en un rango de temperatura de trabajo entre 25-400 ° C.

CONCLUSIÓN

Al obtener un grado de desacetilación superior al 50% se demostró que la quitina contenida en el micelio del hongo *Aspergillus Niger* se hidrolizó para producir quitosano con un porcentaje de extracción del 11,5% con base al peso inicial seco.

El bajo peso molecular del quitosano obtenido está relacionado con sus bajas propiedades mecánicas, razón por la que se combinó con óxido de grafeno, cuyas características le proporcionaron un aumento de estabilidad y resistencia que se vio reflejado en la caracterización y la prueba de degradación hidrolítica de los andamios.

El óxido de grafeno se sintetizó por un método mejorado de Hummer's y Offeman con un rendimiento superior al 100%, esto junto a los espectros de FTIR y Raman permitieron demostrar que la oxidación se completó. Las imágenes de AFM y el DRX mostraron que se formó óxido de grafeno después de la síntesis.

A partir de estos dos compuestos se elaboraron exitosamente andamios utilizando el método de liofilización, ya que su espectro FTIR mostró una disminución en la intensidad y frecuencia de las bandas características de los grupos oxigenados de ambos compuestos, se evidenció la interacción por enlaces de hidrógeno entre ambas moléculas conforme se aumentó la cantidad de GO.

El TGA y la prueba de degradación en suero fisiológico corroboraron esta interacción al mostrar que los andamios con composiciones mayores de óxido de grafeno tienden a degradarse menos. Las imágenes SEM mostraron que la morfología, interconexión y porosidad de los andamios les permite tener potencial para generar crecimiento celular de osteoblastos por lo que se pueden utilizar para hacer futuras pruebas de biocompatibilidad e inserciones en seres vivos.

CONTENIDO ASOCIADO

Información de soporte. La información de soporte se encuentra disponible de la página 9 en adelante.

INFORMACIÓN DEL AUTOR

Autor de Correspondencia

* H. Fabio Zuluaga: hector.zuluaga@correounivalle.edu.co

Contribución de los autores

Todos los autores han aprobado la versión final del manuscrito.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de investigaciones de la Universidad del Valle y al Centro de Excelencia en Nuevos Materiales CENM, por la financiación de esta investigación.

ABREVIACIONES

CHIT, quitosano; GO, óxido de grafeno; DA, Grado de desacetilación; RMN-¹H, resonancia magnética nuclear protónica; FTIR, espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier; GPC, cromatografía de permeación en gel; Mv, peso molecular promedio viscoso; Mn, peso molecular promedio en número; DRX, difracción de rayos X; AFM, microscopía de fuerza atómica; DLS, dispersión dinámica de la luz; SEM, microscopía electrónica de barrido; TGA, análisis termogravimétrico.

REFERENCIAS

- (1) Yaylaci, S. U.; Sen, M.; Bulut, O.; Arslan, E.; Guler, M. O.; Tekinay, A. B. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Glycosaminoglycan-Mimetic Peptide Nano Fibers. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, 2, 871–878.
- (2) *Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products*; ASTM International, West Conshohocken, 2002.
- (3) Tchetchoua, V. T.; Atanasova, G.; Aqil, A.; Fil, P.; Garbacki, N.; Vanhootehem, O.; Deroanne, C.; Christine, J.; Nussgens, B.; Poumay, Y.; et al. Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. *biomacromol* **2011**, 12, 3194–3204.
- (4) Kelly, K. F.; Billups, W. E. Synthesis of Soluble Graphite and Graphene. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46 (1), 4–13.
- (5) Suk, J. W.; Piner, R. D.; An, J.; Ruoff, R. S. Mechanical Properties of Monolayer Graphene Oxide. **2010**, 4 (11), 6557–6564.
- (6) Pan, Y.; Wu, T.; Bao, H.; Li, L. Green Fabrication of Chitosan Films Reinforced with Parallel Aligned Graphene Oxide. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 83 (4), 1908–1915.
- (7) Grande, C.; Mangadla, J.; Fan, J.; De Leon, A.; Delgado-Ospina, J.; Rojas, J.; Rodrigues, D.; Advincula, R. Chitosan Cross-Linked Graphene Oxide Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity for Application in Food Industry. *Symp. Macromol.* **2017**, 374 (1), 1600114.
- (8) Fan, J.; Grande, C. D.; Rodrigues, D. F. Biodegradation of Graphene Oxide-Polymer Nanocomposite Films in Wastewater. *Environ. Sci. Nano* **2017**, 4, 1808–1816.
- (9) Kurmirska, J.; Czerwica, M.; Kaczynski, Z.; Bychowska, A.; Brzozowski, K.; Thoming, J.; Stepnowski, P. Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Mar. Drug* **2010**, 8 (5), 1567–1636.
- (10) Correa, L. S.; Godoy, J. E.; Zuluaga, F.; Valencia, C. Elaboración de Andamios Porosos Osteoinductivos de Poli (Ácido L-Láctico)/Quitosano Para La Regeneración de Tejido Óseo. *Rev. Col. Mat* **2015**, 6, 34–53.
- (11) Sadighara, P.; Moghadam, H. T.; Eskandari, S.; Salehi, A. Optimization of Extraction of Chitosan and Carotenoids from Shrimp Waste. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* **2015**, 2 (5), 36–38.
- (12) Murillo, W.; Dávila, L. R. Glucanos En Hongos Superiores, Polisacáridos Con Un Interesante Espectro de Actividad Biológica. *Química e Ind.* **2017**, 29 (1), 25–30.
- (13) Trevor, A.; Katzung, B. *Pharmacology: Examination and Board Review*, 11th ed.; McGraw Hill: California, 2015.
- (14) Wang, H.; Qian, C.; Roman, M. Effects of pH and Salt Concentration on the Formation and Properties of Chitosan – Cellulose Nanocrystal Polyelectrolyte – Macroion Complexes. *biomacromol* **2011**, 12, 708–3714.
- (15) Elsaid, N.; Jackson, T. L.; Elsaid, Z.; Alqathama, A.; Somavarapu, S. PLGA Microparticles Entrapping Chitosan-Based Nanoparticles for the Ocular Delivery of Ranibizumab. *Mol. Pharm.* **2016**, 13, 2923–2940.
- (16) Zuluaga, F.; Gómez, F. *Introducción a La Química de Polímeros*;

- Universidad del Valle: Cali, 2015.
- (17) Novoa-carballal, R.; Fernandez-megia, E.; Riguera, R. Dynamics of Chitosan by ^1H NMR Relaxation. *biomacromol* **2010**, *110* (310), 2079–2086.
 - (18) Vo, D.; Whiteley, C. G.; Lee, C. Hydrophobically Modified Chitosan-Grafted Magnetic Nanoparticles for Bacteria Removal. *Ind. Eng. Chem* **2015**, *54*, 9270–9277.
 - (19) *Official Monographs/Chitosan GPC*; USP-NF35, 2017; pp 7601–7605.
 - (20) Marcano, D. C.; Kosynkin, D. V.; Berlin, J. M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L. B.; Lu, W.; Tour, J. M. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* **2010**, *4* (8), 4806–4814.
 - (21) Losic, D. From Graphene Oxide to Reduced Graphene Oxide: Impact on the Physiochemical and Mechanical Properties of Graphene – Cement Composites. *Appl. Mater. interfaces* **2017**, *9*, 43275–43286.
 - (22) Lo, D.; Lo, M.; Garc, J. L.; Vela, M. M. Evolution of the Raman Spectrum with the Chemical Composition of Graphene Oxide. *J. Phys. Chem.* **2017**, *121*, 20489–20497.
 - (23) Shen, J.; Hu, Y.; Shi, M.; Lu, X.; Qin, C.; Li, C.; Ye, M. Fast and Facile Preparation of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Nanoplatelets. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (13), 3514–3520.
 - (24) Mohandesa, F.; Salavati-Niasari, M. Freeze-Drying Synthesis, Characterization and in Vitro Bioactivity of Chitosan/graphene Oxide/hydroxyapatite Nanocomposite. *RSC Adv* **2014**, *4*, 25993–26001.
 - (25) Zuluaga, F.; Yates, B.; Insuasty, B. *Análisis Orgánico Clásico Y Espectral*; Universidad del Valle: Cali, 2015.
 - (26) Zhang, P.; Wu, H.; Wu, H.; Zhongwen, L.; Jing, X.; Chen, X. RGD-Conjugated Copolymer Incorporated into Composite of Poly (Lactide- Co -Glycotide) and Poly (L -Lactide) -Grafted Nanohydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *biomacromol* **2011**, *12*, 2667–2680.
 - (27) Barata, J. F. B.; Pinto, R. J. B.; Serra, V. I. R. C. V.; Silvestre, A. J. D.; Trindade, T.; Grac, M.; Neves, P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Daina, S.; Sadocco, P.; et al. Fluorescent Bioactive Corrole Grafted-Chitosan Films. *biomacromol* **2016**, *17*, 1395–1403.
 - (28) Han, D.; Yan, L. Supramolecular Hydrogel of Chitosan in the Presence of Graphene Oxide Nanosheets as 2D Cross-Linkers. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 296–300.

Contenido

Metodología...	10
1. Sección experimental...	10
1.1 Grado de desacetilación de CHIT por método potenciométrico....	10
1.2 Viscosimetría capilar para el cálculo del Mv.	10
Tablas de soporte ...	10
Tabla S1. Concentraciones y tiempos de caída de soluciones tomadas en un viscosímetro de ubbelohde.....	10
Figuras de soporte ...	10
Figura S1. (a) Titulación potenciométrica de CHIT (b) Segunda derivada de la titulación ...	10
Figura S2. RMN del CHIT ...	11
Figura S3. FTIR del CHIT ...	12
Figura S4. Curva de calibración de GPC con estándares de pululano....	12
Figura S5. FTIR del GO.....	13
Figura S6. Raman del GO ...	13
Figura S7. DRX del GO ...	14
Figura S8. DLS del GO ...	14
Figura S9. FTIR de los andamios de CHIT/GO	15
Figura S10. Curva termogravimétrica de los andamios CHIT (a) sin GO, (b) con 0,5% de GO y (c) con 1,0% de GO.	15

Metodología

1. Sección experimental

1.1 Grado de desacetilación de CHIT por un método potenciométrico.

Para el cálculo del DA se realizó una titulación potenciométrica de CHIT con un pHmetro WTW pH 3310, se utilizó una solución de NaOH 0,101 M previamente estandarizado con $C_8H_5KO_4$ como agente titulante y una solución de 0,253 g de CHIT en 20 ml HCl 0,3M.

1.2 Viscosimetría capilar para el cálculo del Mv.

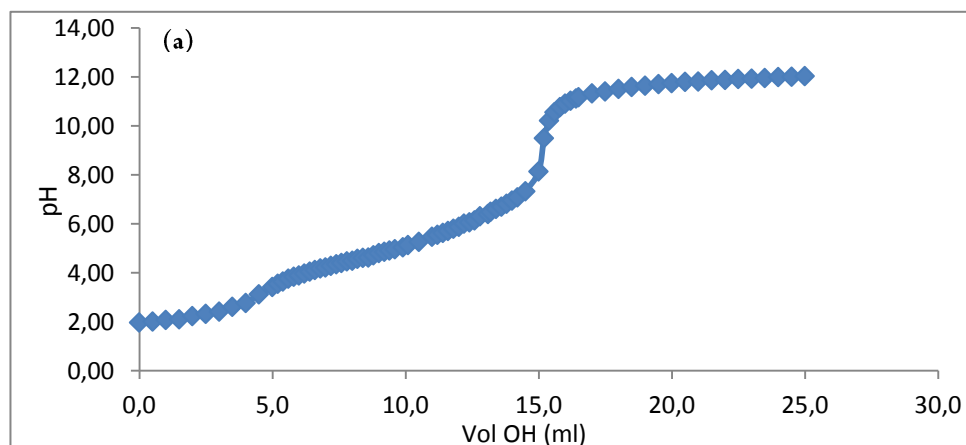
Para el cálculo del Mv del CHIT se preparó una solución patrón de 100 mL de CH_3COOH 0,1 M, NaCl 0,2 M y 0,02 g/mL de CHIT. A partir de esta se prepararon 5 soluciones de 25 mL con las concentraciones que se muestran en la figura 3 y se les midió la densidad con un picnómetro de 1 mL y el tiempo de caída con un viscosímetro de viscosímetro ubbelohde con constante β de $3,31 \times 10^{-5}$ que se calcula con el tiempo de caída del agua.

Tablas de soporte

Tabla S1. Concentraciones y tiempos de caída de soluciones tomadas en un viscosímetro de ubbelohde

Concentración (ml/g)	Tiempo (s)	ρ (g/ml)
solvente	277	1,0320
0,0008	279	1,0324
0,0010	282	1,0327
0,0013	283	1,0332
0,0015	284	1,0348
0,0018	285	1,0360
0,0020	286	1,0368

Figuras de soporte



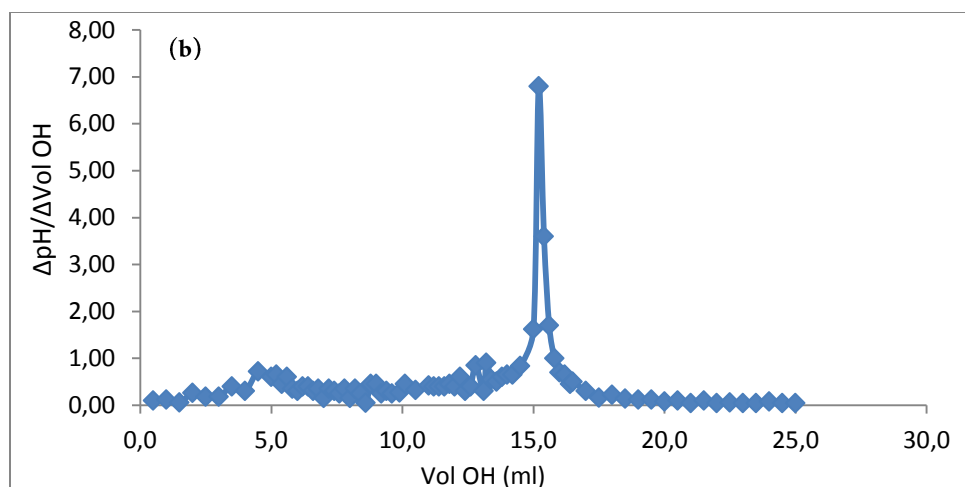


Figura S1. (a) Titulación potenciométrica de CHIT (b) Segunda derivada de la titulación.

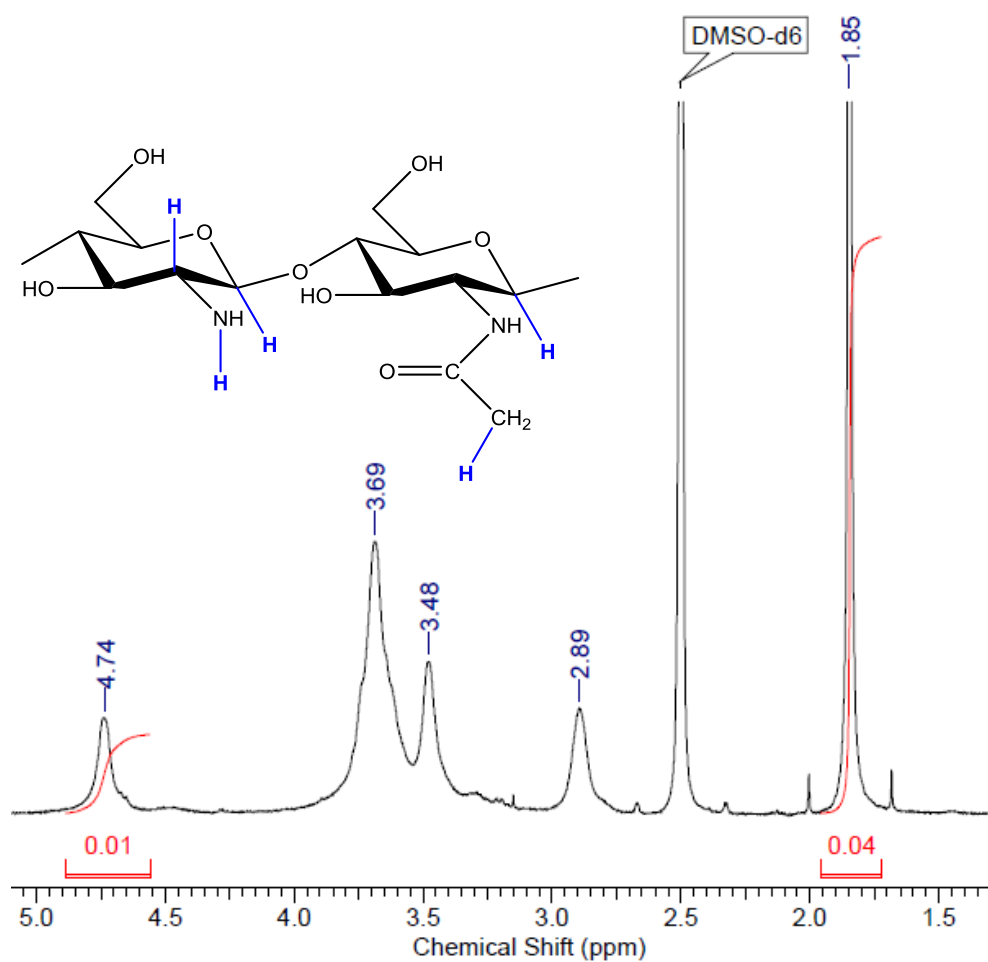


Figura S2. RMN del CHIT.

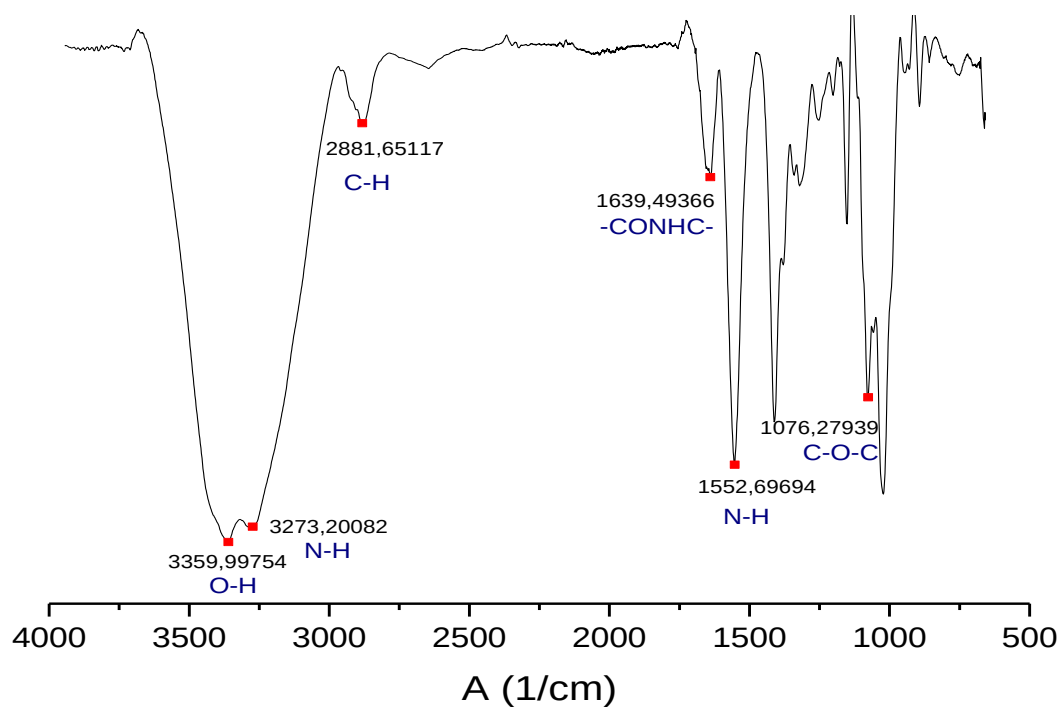


Figura S3. FTIR del CHIT.

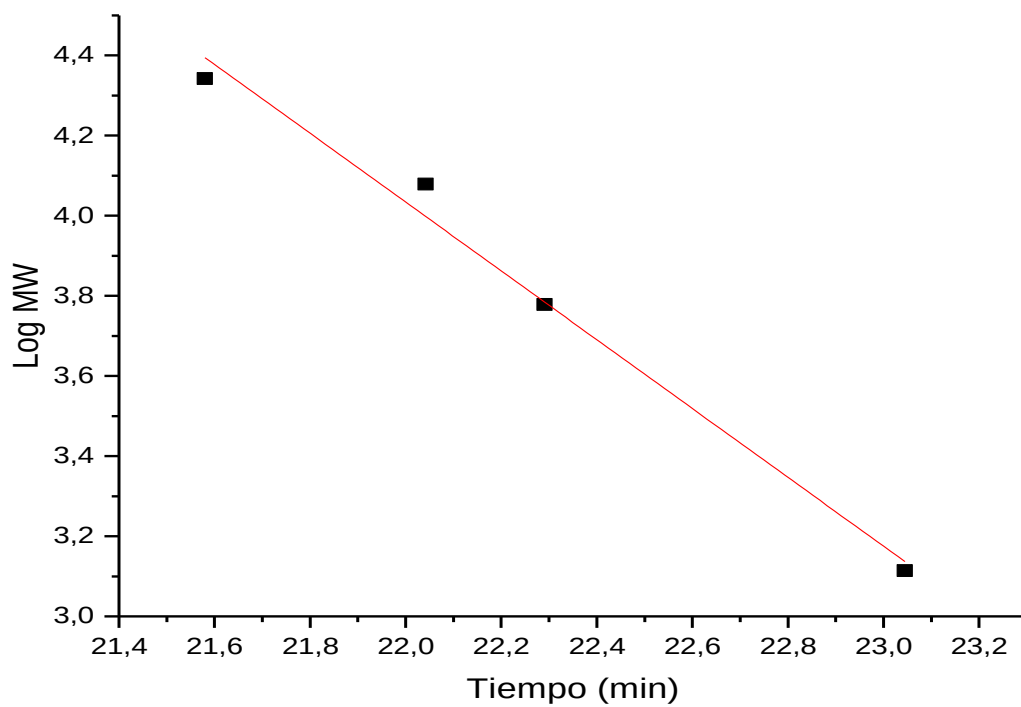


Figura S4. Curva de calibración de GPC con estándares de pululano.

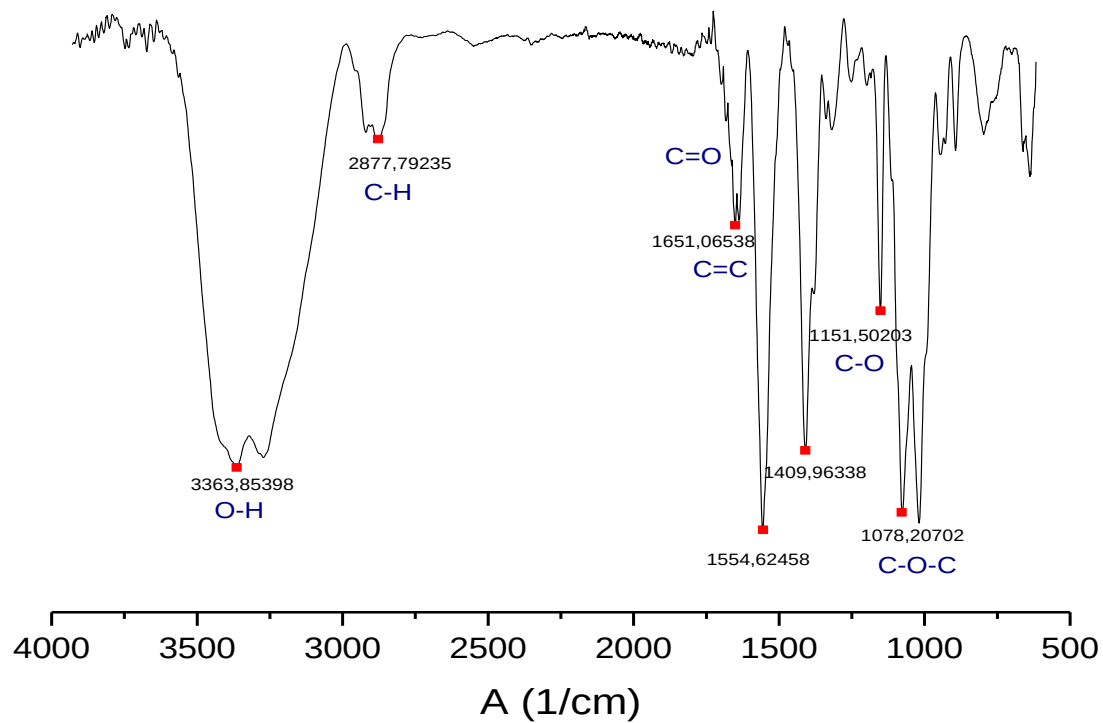


Figura S5. FTIR del GO.

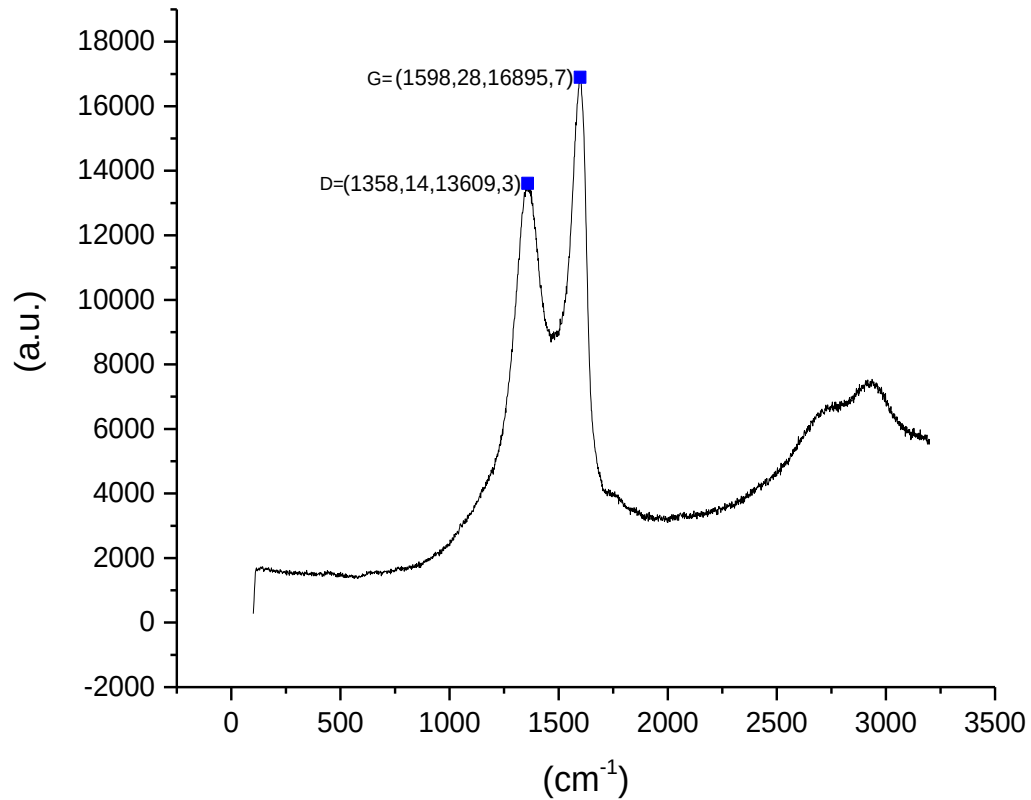


Figura S6. Raman del GO.

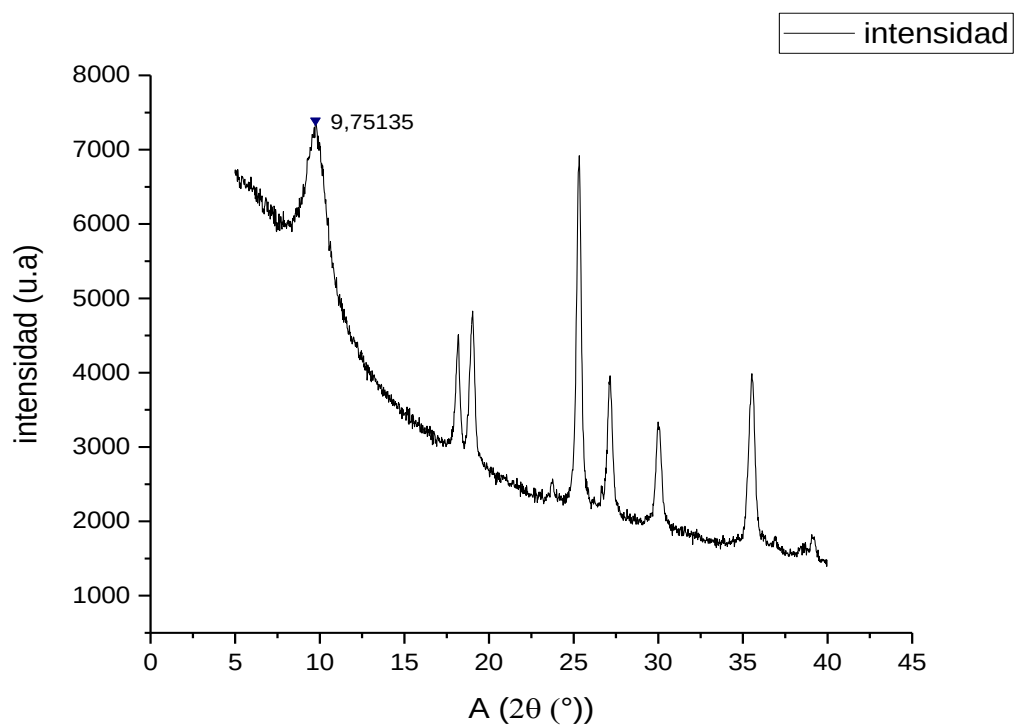


Figura S7. DRX del GO.

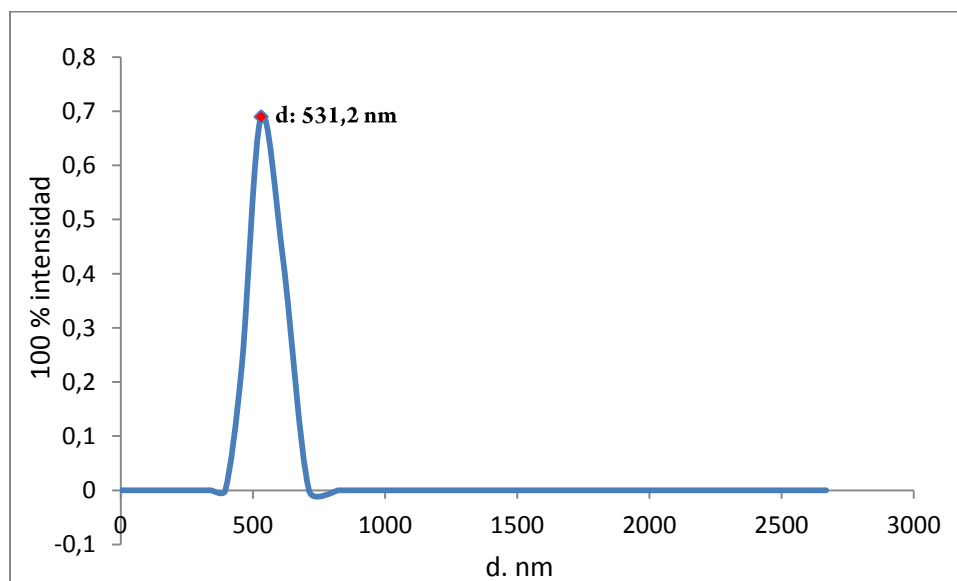


Figura S8. DLS del GO

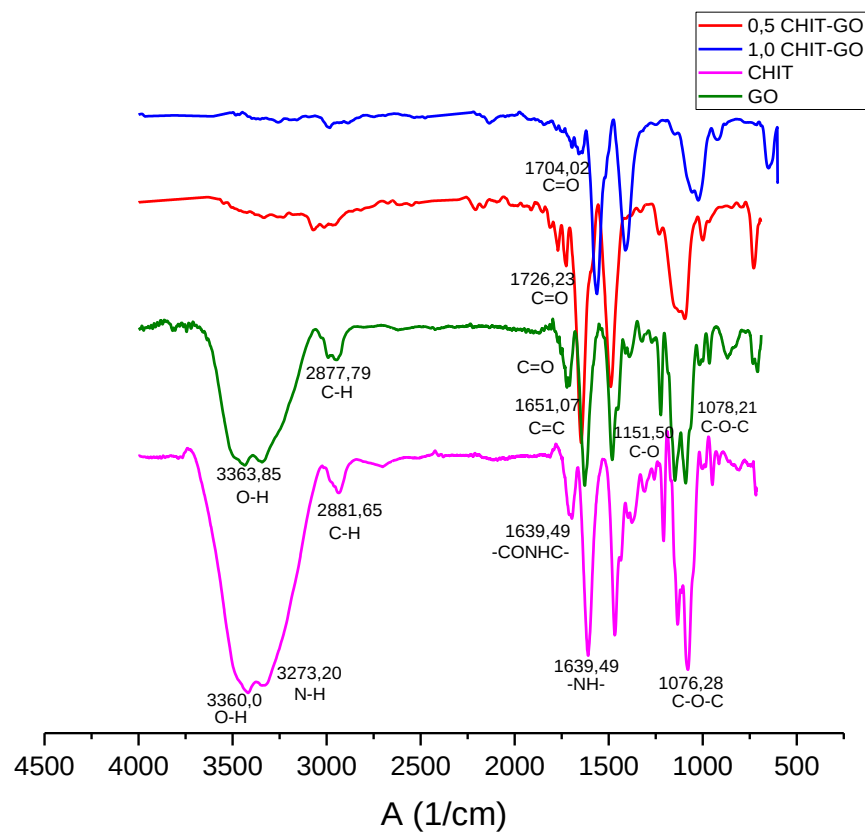
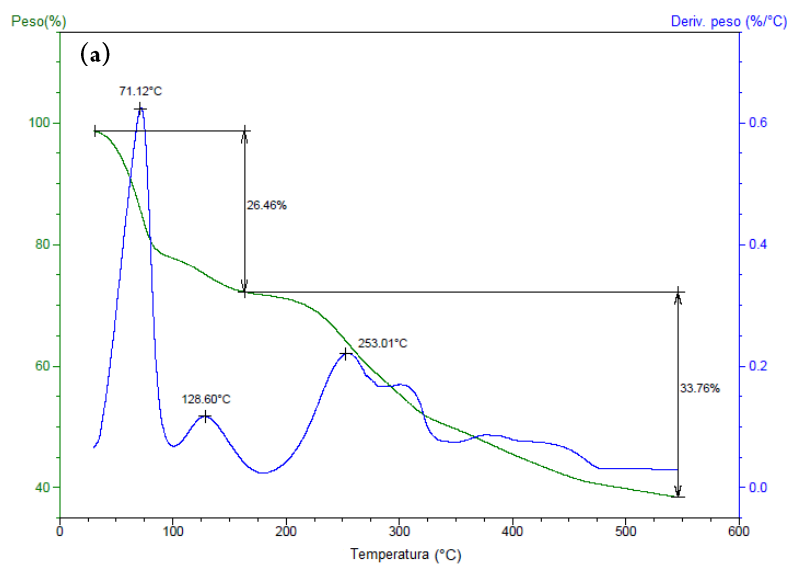


Figura S9. FTIR de los andamios de CHIT/GO



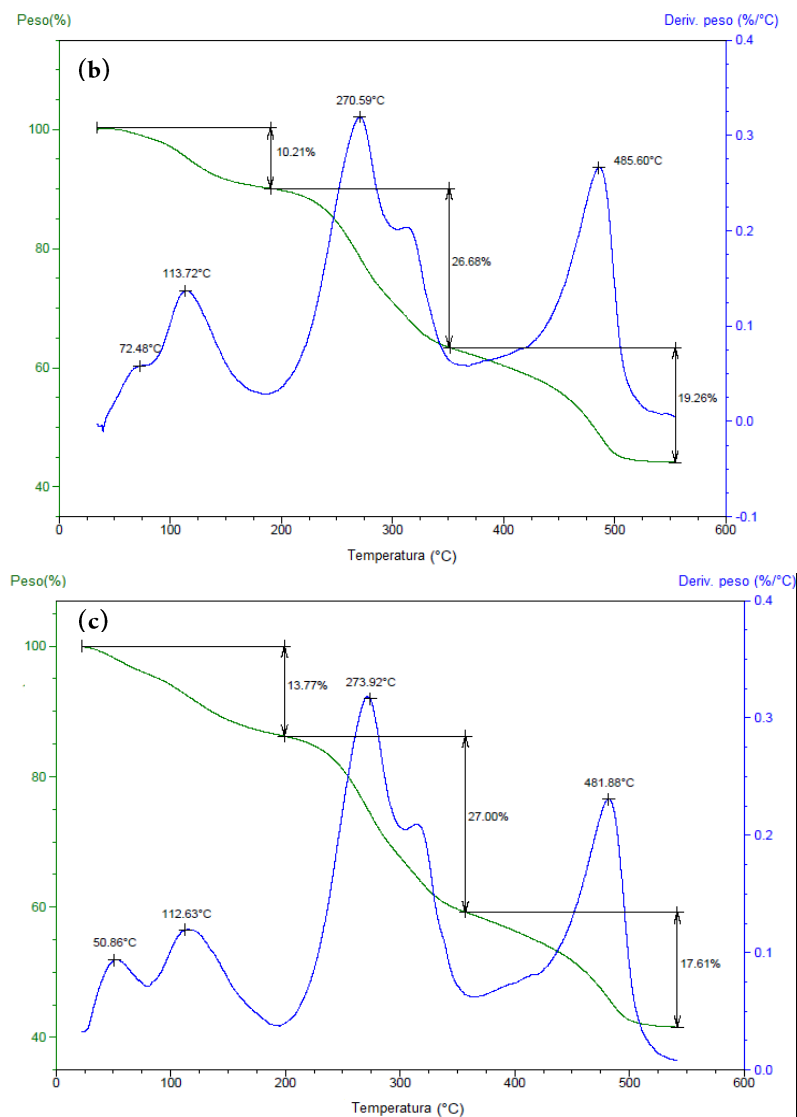


Figura S10. Curva termogravimétrica de los andamios CHIT (a) sin GO, (b) con 0,5% de GO y (c) con 1,0% de GO.