

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN Y UTILIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO  
OBTENIDOS A PARTIR DE CAMARÓN LANGOSTINO (*Pleuroncodes planipes*)  
PARA EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

**Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional de Costa Rica**

**Laboratorio de Citogenética del Centro Nacional de Tamizaje del Hospital  
Nacional de Niños**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
Para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Andrés Sánchez Brenes**

**CARTAGO, 2006**

**CARACTERIZACIÓN Y UTILIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO  
OBTENIDOS A PARTIR DE CAMARON LANGOSTINO (*Pleuroncodes planipes*)  
PARA EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
Para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**Dr. Miguel Rojas Chávez  
Profesor Asesor-ITCR**

---

**Lic. Sergio Madrigal Carballo,  
Asesor- Empresa**

---

**M.Sc. Maritza Guerrero,  
Lectora**

## Hoja de información

### Información del estudiante:

Nombre: Andrés Sánchez Brenes

Cédula: 3-397-447

Carné ITCR: 200219134

Dirección de su residencia: El Carmen, Cartago. Diagonal al Mini Super el Delfín, casa color lila

Teléfono: 552-67-46

Email: [sandres18@gmail.com](mailto:sandres18@gmail.com)

### Información del Proyecto:

Nombre del Proyecto: Caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camaron langostino (*Pleuoncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos humanos

Profesor Asesor: Dr. Miguel Rojas

### Datos de la institución:

Nombre: Laboratorio de Polímeros, Universidad Nacional de Costa Rica

Actividad: Investigación

Dirección exacta: Heredia, Costa Rica. Campus Omar Dengo.

Apartado postal: 86-3000.

Teléfonos: 277-35-57

Sitio web: [www.una.ac.cr](http://www.una.ac.cr)

Correo electrónico: [poliuna@una.ac.cr](mailto:poliuna@una.ac.cr)

Nombre: Laboratorio de Citogenética, Centro Nacional de Tamizaje, Hospital Nacional de Niños

Actividad: Investigación

Dirección exacta: San José, Avenida 2º. Contiguo Hospital San Juan de Dios

Teléfonos: 222-24-09

Sitio web: [www.hnn.sa.cr](http://www.hnn.sa.cr)

Correo electrónico: [www.tamizajeneonatal.com](http://www.tamizajeneonatal.com)

# CARACTERIZACIÓN Y UTILIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DEL CAMARÓN LANGOSTINO (*Pleuoncodes planipes*) PARA EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Andrés Sánchez Brenes<sup>1</sup>

## RESUMEN

En la actualidad el tratamiento de heridas es un área sumamente activa de mucho interés para los investigadores y personal médico, a tal punto que la ingeniería de tejidos se ha dirigido a buscar soluciones por medio de la utilización de productos biomédicos de bajo costo obtenidos a partir de biomateriales con aplicaciones en cirugía y reparación de tejidos dañados.

Dentro de los objetivos establecidos por esta investigación está la utilización de un producto de desecho marino obtenido a partir del camarón langostino *Pleuoncodes planipes* el cual corresponde a quitosano; con el fin de obtener un biomaterial que permita el crecimiento de fibroblastos humanos para agilizar la producción *in vitro* de piel humana; estableciendo un protocolo de obtención de hidrogeles por medio de entrecruzamiento con agentes químicos. Con el fin de brindar información en la mejora del crecimiento de células epidérmicas para la producción de sustituyentes, además de expandir la investigación en ingeniería de tejidos en Costa Rica.

Con la obtención de los hidrogeles se determinó que el que presenta las mejores características para su aplicación en ingeniería de tejidos corresponde al hidrogel de quitosano entrecruzado con glioxal al 20%, y con el cual se obtuvo un efecto negativo para los fibroblastos humanos, debido a la disminución en la cantidad inicial colocada para cada prueba.

Palabras claves: Análisis termogravimétrico; Grado de acetilación; Hidrogeles; Ingeniería de tejidos; Masa molecular viscosimétrica; Matriz extracelular

---

<sup>1</sup> Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

# CHARACTERIZATION AND USE OF CHITOSAN HYDROGELS OBTAINED FROM SHRIMP (*Pleuroncodes planipes*) FOR THE GROWTH OF HUMAN FIBROBLASTS

## ABSTRACT

Nowadays the wound treatment is a very active area with a lot of interest for scientists and medical personal, at this point the tissue engineering has searching solutions using biomedical products with low cost obtain from biomaterials with applications in surgery and repair damage tissue.

This research has the objective to use a waste marine product obtain from shrimp *Pleuroncodes planipes*, which corresponds to chitosan; with the purpose to obtain a scaffold that allow the growth of human fibroblasts to accelerate the production of in vitro human skin; by means of a protocol to obtain hydrogels using cross-linking agents. The goal of this research is to give information of the improvement of epidermal cell growth for the production of skin substitutes, besides to expand the research in tissue engineering in Costa Rica.

The hidrogel with the best characteristics for application in tissue engineering is the chitosan hidrogel cross linked with 20% v/v of glyoxal, which have a negative effect in the human fibroblasts, because it causes a decrease in the number of cells inoculated initially.

Key words: Degree of acetylation; Extracellular matrix; Hydrogels; Tissue engineering; Thermal analysis; Viscosimetric molecular weight

## **DEDICATORIA**

**A Dios por darme la sabiduría para poder desarrollar  
esta investigación**

**A mis padres por su esfuerzo diario para  
salir adelante y por sus consejos en los momentos difíciles**

**Especialmente aquellos niños que se  
encuentran en un hospital, que esta investigación  
sirva para aliviar su dolor**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Miguel Rojas y al Lic. Sergio Madrigal por su paciencia, conocimiento y gran apoyo en la realización de esta investigación

A la M.Sc. Rosario Sibaja por compartir sus conocimientos de forma desinteresada y brindar grandes consejos para el desarrollo experimental de esta investigación

A la M.Sc. Maritza Guerrero por su preocupación constante y gran ayuda brindada

Al Dr. Rivera y la Dra. Venegas por sus consejos y preocupación para el correcto desarrollo de esta investigación

A todo el personal docente del Laboratorio de Polímeros y del Centro Nacional de Tamizaje por brindar su ayuda en todo momento y abrirme las puertas

A la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad de Costa Rica por facilitar la preparación de las muestras

A la Unidad de Microscopía Electrónica del Laboratorio de la Escuela de Ingeniería de Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica

A todas las personas del Laboratorio de Polímeros que me recibieron como uno más de su gran familia, en especial a Ahilyn, Ana Nancy, Beatriz, Carolina, Geannina, Gregorio, Karla, Marlen, Natalia, Nelly, Rixi, Ronald y Vanesa; gracias por brindarme su apoyo y amistad

A Monserrat y al personal del Centro de Investigación en Biotecnología, gracias por mantener sus puertas abiertas en todo momento

A todo el personal de la Escuela de Biología por brindarme una formación profesional de gran calidad

A mis compañeros y amigos incondicionales de carrera; de los cuales tengo muy buenos recuerdos que guardaré siempre, gracias por preocuparse y aconsejarme en los momentos más difíciles

Principalmente a Dios por darme esa fuerza y dedicación para afrontar los momentos difíciles

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>IV</b>
<b>INDICE GENERAL.....</b>	<b>V</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>INDICE DE FORMULAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>INDICE DE ANEXOS .....</b>	<b>XII</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. PIEL: ÓRGANO PROTECTOR.....</b>	<b>17</b>
2.1.1. Funciones de la piel.....	17
2.1.2. Estructura de la piel.....	18
<b>2.2. INGENIERÍA DE TEJIDOS .....</b>	<b>25</b>
2.2.1. Definición .....	25



2.2.2. Objetivos de la ingeniería de tejidos .....	26
2.2.3. Tipos de células utilizadas en ingeniería de tejidos.....	27
2.2.4. Soportes celulares.....	29
<b>2.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL QUITOSANO .....</b>	<b>32</b>
2.3.1. Caracterización físico química de quitosano .....	36
<b>2.4. HIDROGELES EN APLICACIONES BIOMÉDICAS .....</b>	<b>40</b>
2.4.1. Definición .....	40
2.4.2. Hidrogeles como soportes para ingeniería de tejidos.....	41
2.4.3. Clasificación de los hidrogeles.....	43
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. CONSECUENCIA DE MATERIAS PRIMAS .....</b>	<b>47</b>
3.1.1. Quitosano grado técnico.....	47
3.1.2. Quitosano purificado.....	47
<b>3.2. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO .....</b>	<b>48</b>
3.2.1. Determinación del porcentaje de material soluble en ácido acético .....	48
3.2.2. Determinación del grado de acetilación .....	49
3.2.3. Determinación de la masa molecular viscosimétrica ( $M_v$ ) de las muestras de quitosano ..	49
<b>3.3. OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO .....</b>	<b>50</b>
<b>3.4. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO .....</b>	<b>51</b>
3.4.1. Análisis de hidrogeles de quitosano .....	51
3.4.2. Prueba de absorción de agua .....	52
3.4.3. Determinación del porcentaje de material soluble en ácido acético .....	53
3.4.4. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	54
3.4.5. Microscopia electrónica .....	54

<b>3.5. CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS.....</b>	<b>55</b>
3.5.1. Mantenimiento de fibroblastos humanos.....	55
3.5.2. Soportes de quitosano .....	55
3.5.3. Crecimiento en hidrogeles de quitosano .....	55
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO .....</b>	<b>57</b>
4.1.1. Prueba de solubilidad.....	57
4.1.2. Grado de acetilación.....	57
4.1.3. Masa molecular viscosimétrica .....	59
<b>4.2. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO .....</b>	<b>59</b>
4.2.1. Características físicas de los hidrogeles .....	60
4.2.2. Prueba de absorción de agua .....	60
4.2.3. Porcentaje de material soluble.....	64
4.2.4. Análisis termogravimétrico (TGA).....	65
4.2.5. Microscopia electrónica .....	72
<b>4.3. CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS.....</b>	<b>73</b>
4.3.1. Mantenimiento de fibroblastos humanos.....	73
4.3.2. Crecimiento en hidrogeles de quitosano .....	74
<b>CAPITULO V: DISCUSIÓN.....</b>	<b>78</b>
<b>5.1. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO .....</b>	<b>80</b>
5.1.1. Absorción de agua y porcentaje de material soluble .....	80
5.1.2. Análisis termogravimétrico.....	83
<b>5.2. HIDROGEL DE QUITOSANO.....</b>	<b>84</b>
<b>5.3. CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS.....</b>	<b>86</b>

<b>5.3.1. Mantenimiento de fibroblastos humanos.....</b>	<b>86</b>
<b>5.3.2. Crecimiento en hidrogeles de quitosano .....</b>	<b>87</b>
<b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....</b>	<b>92</b>
<b>CAPITULO VII: RECOMENDACIONES .....</b>	<b>93</b>
<b>CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>94</b>
<b>CAPITULO IX: ANEXOS .....</b>	<b>102</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> COMPARACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ESTRATOS EPIDÉRMICOS. ....	21
<b>TABLA 2.</b> COMPARACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ESTRATOS DÉRMICOS. ....	23
<b>TABLA 3.</b> COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS UTILIZADAS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS. ....	28
<b>TABLA 4.</b> CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ALGUNOS MATERIALES POLIMÉRICOS NATURALES. ....	31
<b>TABLA 5.</b> HUMEDADES RELATIVAS OBTENIDAS A PARTIR DE SOLUCIONES DE GLICERINA... ..	52
<b>TABLA 6.</b> COMPARACIÓN DE LA TEMPERATURA DE MÁXIMA VELOCIDAD DE DESCOMPOSICIÓN, MASA RESIDUAL A 550 °C, ÁREA BAJO LA CURVA Y GRADO DE ACETILACIÓN EN MUESTRAS DE QUITOSANO DE LANGOSTINO .....	59
<b>TABLA 7.</b> CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS HIDROGELES DE QUITOSANO DE LANGOSTINO CON CONCENTRACIONES AL 1 Y 3%. .....	60
<b>TABLA 8.</b> COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE MATERIAL SOLUBLE DE LOS HIDROGELES ENTRECruzADOS CON GLUTARALDEHIDO Y GLIOXAL.....	65
<b>TABLA 9.</b> COMPARACIÓN DE LA TEMPERATURA INICIAL DE DESCOMPOSICIÓN, TEMPERATURA DE MÁXIMA VELOCIDAD DE DESCOMPOSICIÓN Y MASA RESIDUAL A 550 °C DE HIDROGELES DE QUITOSANO SIN ENTRECruZAR.....	66
<b>TABLA 10.</b> COMPARACIÓN DE LA TEMPERATURA INICIAL DE DESCOMPOSICIÓN, TEMPERATURA DE MÁXIMA VELOCIDAD DE DESCOMPOSICIÓN Y MASA RESIDUAL A 550 °C DE HIDROGELES DE QUITOSANO ENTRECruZADOS CON GLUTARALDEHIDO AL 50%. .....	68
<b>TABLA 11.</b> COMPARACIÓN DE LA TEMPERATURA INICIAL DE DESCOMPOSICIÓN, TEMPERATURA DE MÁXIMA VELOCIDAD DE DESCOMPOSICIÓN Y MASA RESIDUAL A 550 °C DE HIDROGELES DE QUITOSANO ENTRECruZADOS CON GLIOXAL AL 40% .....	69
<b>TABLA 12.</b> COMPARACIÓN DE LA TEMPERATURA INICIAL DE DESCOMPOSICIÓN, TEMPERATURA DE MÁXIMA VELOCIDAD DE DESCOMPOSICIÓN Y MASA RESIDUAL A 550 °C DE HIDROGELES DE QUITOSANO AL 1% ENTRECruZADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIOXAL.....	70
<b>TABLA 13.</b> COMPARACIÓN DE LA TEMPERATURA INICIAL DE DESCOMPOSICIÓN, TEMPERATURA DE MÁXIMA VELOCIDAD DE DESCOMPOSICIÓN Y MASA RESIDUAL A 550 °C DE HIDROGELES DE QUITOSANO AL 3% ENTRECruZADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIOXAL.....	71
<b>TABLA 14.</b> CONFLUENCIA CELULAR DE LOS POZOS UTILIZADOS COMO CONTROL POSITIVO .....	75

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> COMPOSICIÓN CELULAR DE LA PIEL .....	19
<b>FIGURA 2.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA QUITINA. ....	33
<b>FIGURA 3.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL QUITOSANO. ....	33
<b>FIGURA 4.</b> COMPORTAMIENTO DE UN POLÍMERO SOMETIDO A UN ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO.....	38
<b>FIGURA 5.</b> ESTRUCTURA DE UN HIDROGEL ENTRECruzADO .....	41
<b>FIGURA 6.</b> HIDROGEL DE QUITOSANO ENTRECruzADO COVALENTEMENTE.....	44
<b>FIGURA 7.</b> REACCIÓN DE FORMACIÓN DE IMINAS.....	44
<b>FIGURA 8.</b> ENTRECruzAMIENTO DE LAS CADENAS DE QUITOSANO CON UN AGENTE QUÍMICO (DIALDEHÍDO).....	45
<b>FIGURA 9.</b> TERMOGRAMA (TGA) Y DERIVATOGRAMA (DTGA) DE MUESTRAS DE QUITOSANO DE LANGOSTINO GRADO TÉCNICO Y PURIFICADO.....	58
<b>FIGURA 10.</b> ABSORCIÓN DE AGUA DE HIDROGELES DE QUITOSANO AL 1% SIN ENTRECruzAR Y ENTRECruzADOS CON GLUTARALDEHIDO 50% Y GLIOXAL 40% EN ATMÓSFERAS CON HUMEDAD RELATIVA CONTROLADA. ....	61
<b>FIGURA 11.</b> ABSORCIÓN DE AGUA DE HIDROGELES DE QUITOSANO SIN ENTRECruzAR EN HUMEDADES RELATIVAS AL 90 Y 100%.....	62
<b>FIGURA 12.</b> ABSORCIÓN DE AGUA DE HIDROGELES DE QUITOSANO ENTRECruzADOS CON GLUTARALDEHIDO 50% EN HUMEDADES RELATIVAS AL 90 Y 100%. ....	63
<b>FIGURA 13.</b> ABSORCIÓN DE AGUA DE HIDROGELES DE QUITOSANO ENTRECruzADOS CON GLIOXAL 40% EN HUMEDADES RELATIVAS AL 90 Y 100%.....	63
<b>FIGURA 14.</b> ABSORCIÓN DE AGUA DE HIDROGELES DE QUITOSANO ENTRECruzADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIOXAL EN UNA HUMEDAD RELATIVA AL 100%..	64
<b>FIGURA 15.</b> TERMOGRAMA (TGA) Y DERIVATOGRAMA (DTGA) DE MUESTRAS DE HIDROGELES DE QUITOSANO DE LANGOSTINO GRADO TÉCNICO SIN ENTRECruzAR EN ATMÓSFERA DE NITRÓGENO.....	66
<b>FIGURA 16.</b> TERMOGRAMA (TGA) Y DERIVATOGRAMA (DTGA) DE MUESTRAS DE HIDROGELES DE QUITOSANO DE LANGOSTINO GRADO TÉCNICO ENTRECruzADO CON GLUTARALDEHIDO AL 50% EN ATMÓSFERA DE NITRÓGENO .....	67

<b>FIGURA 17.</b> TERMOGRAMA (TGA) Y DERIVATOGRAMA (DTGA) DE MUESTRAS DE HIDROGELES DE QUITOSANO DE LANGOSTINO GRADO TÉCNICO ENTRECruzADO CON GLIOXAL AL 40% EN ATMÓSFERA DE NITRÓGENO .....	68
<b>FIGURA 18.</b> TERMOGRAMA (TGA) DE MUESTRAS DE HIDROGELES DE QUITOSANO DE LANGOSTINO GRADO TÉCNICO AL 1% ENTRECruzADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIOXAL.....	70
<b>FIGURA 19.</b> TERMOGRAMA (TGA) DE MUESTRAS DE HIDROGELES DE QUITOSANO DE LANGOSTINO GRADO TÉCNICO AL 3% ENTRECruzADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIOXAL.....	71
<b>FIGURA 20.</b> TEMPERATURA DE MÁXIMA VELOCIDAD DE DESCOMPOSICIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO ENTRECruzADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIOXAL ...	72
<b>FIGURA 21.</b> FOTOS AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE HIDROGELES DE QUITOSANO AL 1% SIN ENTRECruzAR TOMADAS A 2500X: A) VISTA LATERAL, B) VISTA SUPERFICIAL.....	72
<b>FIGURA 22.</b> FOTOS AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE HIDROGELES DE QUITOSANO AL 1% ENTRECruzADOS TOMADAS A 2500X: A) GLUTARALDEHIDO 50%, B) GLIOXAL 40%, C) GLIOXAL 30% Y D) GLIOXAL 10%.....	73
<b>FIGURA 23.</b> CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS EN MEDIO DE CULTIVO DMEM/HAM'S F12 SUPLEMENTADO CON GLUTAMINA, ANTIBIÓTICO Y 10% DE SUERO FETAL BOVINO: A) FRASCO DE CULTIVO 25 CM <sup>2</sup> , B) CONFLUENCIA CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS (AUMENTO 10X).....	74
<b>FIGURA 24.</b> CRECIMIENTO EN PLACA DE CULTIVO CELULAR DE 24 POZOS: A) INICIO DEL CRECIMIENTO EN PLACA CON HIDROGEL Y SIN HIDROGEL, B) TIEMPO DE INCUBACIÓN DE 3 DÍAS.....	74
<b>FIGURA 25.</b> FIBROBLASTOS EN PLACA DE CULTIVO CELULAR DE 24 POZOS SIN HIDROGEL DE QUITOSANO: A) TIEMPO DE INCUBACIÓN DE UN DÍA, B) TIEMPO DE INCUBACIÓN DE 3 DÍAS (AUMENTO 10X).....	75
<b>FIGURA 26.</b> PROLIFERACIÓN CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS SOBRE HIDROGELES DE QUITOSANO ENTRECruzADOS CON GLIOXAL AL 20% Y SIN HIDROGEL (CONTROL) .....	76
<b>FIGURA 27.</b> PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS A LOS 7 DÍAS DE INCUBACIÓN SOBRE HIDROGELES DE QUITOSANO ENTRECruzADOS CON GLIOXAL AL 20% Y SIN HIDROGEL (CONTROL) .....	77

## INDICE DE FORMULAS

<b>FORMULA 1.</b> VISCOSIDAD RELATIVA	39
<b>FORMULA 2.</b> VISCOSIDAD REDUCIDA	39
<b>FORMULA 3.</b> VISCOSIDAD INHERENTE	39
<b>FORMULA 4.</b> ECUACIÓN DE MARK-HOUWINK	39
<b>FÓRMULA 5.</b> PORCENTAJE DE MATERIAL SOLUBLE	48
<b>FÓRMULA 6.</b> GRADO DE ACETILACIÓN	49
<b>FÓRMULA 7.</b> PORCENTAJE ABSORCIÓN DE AGUA	53
<b>FÓRMULA 8.</b> PORCENTAJE DE MATERIAL SOLUBLE	53

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> MÉTODOS CONVENCIONALES DE OBTENCIÓN DE SOPORTES	102
<b>ANEXO 2.</b> CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS	104
<b>ANEXO 3.</b> DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR VISCOSIMÉTRICO	112

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

El quitosano es un producto parcialmente desacetilado de la quitina, es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de  $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y  $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina) (Sastre et al., 2004); presenta una configuración helicoidal tridimensional estabilizada por medio de enlaces de puente de hidrógeno entre los monómeros que lo conforman (Andradel et al., 2003). El quitosano presenta un valor económico sumamente importante, debido a sus versátiles actividades biológicas y aplicaciones químicas (Gagne y Simpson, 1993; Brine y Austin, 1981), el quitosano es biodegradable, biocompatible, ya que no se produce respuesta del sistema inmune y no tóxico, características que unidas a su naturaleza policationica, han estimulado su empleo en diversas aplicaciones biomédicas (Dhanikula y Panchagnula, 2004). Al igual que la quitina, el quitosano es degradado por la lisozima, una enzima proteolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano.

La capacidad del quitosano de formar películas o soportes ha encontrado muchas aplicaciones, dentro de los campos de ingeniería de tejidos y liberación de drogas, gracias a sus excelentes propiedades mecánicas como a su baja tasa de biodegradación. Los soportes de quitosano pueden servir para mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular; como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular. En muchas aplicaciones que involucran cultivo celular se requiere la incorporación de matrices poliméricas biodegradables, las cuales deben contar con una microestructura porosa y compatibilidad con las células en crecimiento (Roh y Kwon, 2002).

Los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* que utilizan diferentes tipos de células sobre quitosano (o conjugados) han demostrado su excelente citocompatibilidad, las



células se adhieren fuertemente y proliferan adecuadamente, por lo que se ha demostrado su capacidad para ser ósteo y neocondrogénico, además de soportar y modular el crecimiento y proliferación de células vasculares, neuronales, fibroblastos, células epiteliales o queratinocitos, además de osteoblastos y condriocitos ( Wang y Hon, 2003).

Las unidades estructurales del quitosano, la glucosamina y la N-acetilglucosamina, están presentes en diferentes glicosaminoglicanos (GAG), los cuales son heteropolisacáridos lineales y aniónicos presentes en las matrices extracelulares de los tejidos humanos; normalmente los GAG se encuentran unidos covalentemente a proteínas centrales y forman los proteoglicanos, los cuales tienen la función de organizar y dar funcionamiento adecuado a la matriz extracelular (Abram, 2004). Debido a que el quitosano presenta un carácter catiónico puede mantener una carga positiva a pH ácido, confiriéndole la capacidad de interactuar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas, combinando interacciones específicas tipo GAG con otras inespecíficas asociadas a su carga.

Investigaciones llevadas a cabo por Saintigny *et al.* (1993) los cuales utilizaron sustituyentes dérmicos obtenidos a partir de copolímeros de quitosano-colágeno, determinaron que la adición de quitosano aumenta la adhesión celular, favoreciendo la proliferación de fibroblastos y queratinocitos; sin causar respuesta inmune y permitiendo una vascularización y colonización adecuada de fibroblastos, obteniéndose así una matriz organizada con poca formación de granulación y tejido cicatrizado.

Estudios clínicos realizados por Damour *et al.* (1994) utilizando sustratos dérmicos de quitosano-colágeno-glicosaminoglicanos (GAG) mostraron resultados prometedores en tejidos quemados, sin presentar rechazo alguno en ratas y humanos. Este sustrato estimuló la vascularización y la colonización del tejido quemado por parte de los fibroblastos, los resultados *in vitro* como *in vivo* indicaron

la formación de una epidermis continua y diferenciada la cual presentó adherencia con el área de la herida a los 15 días. Estos estudios se encuentran entre las aplicaciones más avanzadas utilizando quitosano como base estructural para la reparación de heridas y tejidos.

Para comprobar la afinidad de los fibroblastos con el quitosano Chuang *et al.* (1999) determinaron la interacción de la línea de fibroblastos L-929 con hidrogeles de quitosano-polivinil alcohol (PVA), los cuales favorecieron la adhesión y crecimiento celular *in vitro*, con una proliferación considerable y estimulación de la respuesta celular. Este estudio en conjunto con los mencionados anteriormente, ilustran que mediante la incorporación de aditivos químicos, las buenas propiedades de los hidrogeles de quitosano en presencia de fibroblastos pueden ser suprimidas o favorecidas dependiendo del aditivo utilizado.

El trabajo “Caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos humanos” pretende utilizar un material de desecho marino por parte del Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional y el Laboratorio de Citogenética del Hospital Nacional de Niños, con el propósito de crear hidrogeles que permitan el crecimiento de fibroblastos humanos, para su futura aplicación en el tratamiento de quemaduras u otras patologías epidérmicas, mediante una proliferación y crecimiento adecuado. De aquí que la importancia de esta investigación radica en el hecho de proporcionar información en cuanto a la utilización de soportes de quitosano para lograr una mayor eficiencia en la producción de células epidérmicas, y a su vez expandir la investigación en lo que respecta a la ingeniería de tejidos en Costa Rica. Además de brindar información acerca de las características del crecimiento de los fibroblastos en condiciones diferentes de las tradicionalmente mantenidas en el laboratorio, lo cual se puede evidenciar en un futuro en mejores resultados de viabilidad y crecimiento celular.

## **OBJETIVOS GENERALES**

- I. Caracterizar física y químicamente el quitosano del camarón langostino *Pleuoncodes planipes* de grado técnico y purificado
- II. Establecer un protocolo de obtención de hidrogeles de quitosano entrecruzados con agentes químicos (glutaraldehído y glioxal) y caracterizar física y químicamente
- III. Comprobar la efectividad del hidrogel de quitosano con una porosidad determinada en el crecimiento de fibroblastos humanos

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar la masa molecular, grado de acetilación, porcentaje de cenizas y solubilidad presentes en el quitosano de grado técnico y purificado
2. Optimizar el protocolo de obtención de hidrogeles de quitosano por medio de entrecruzamiento por inmersión con glutaraldehído y glioxal, y determinar sus propiedades físico químicas.
3. Comparar el crecimiento de fibroblastos humanos en medio de cultivo con soporte y sin soporte de quitosano

## **CAPITULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. PIEL: ÓRGANO PROTECTOR**

#### **2.1.1. Funciones de la piel**

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, abarca cerca del 16% del peso corporal y presenta un área superficial de casi 2 m<sup>2</sup>; presenta un grosor variable, pero en casi todo el cuerpo corresponde a 1 y 2 mm. Se encuentra constituida por diferentes tejidos, los cuales realizan funciones específicas, según Grabowski y Tortora (2002) y Leeson *et al.* (1998) básicamente la piel presenta cinco funciones:

##### **2.1.1.1. Termorregulación**

Contribuye a regular la temperatura corporal por medio de secreción de sudor en la superficie y ajusta el flujo de sangre en la dermis. Cuando el sudor se evapora debido a la alta temperatura del ambiente o alguna actividad física se reduce la temperatura corporal; por otro lado cuando se realiza ejercicio la dermis contrae los vasos sanguíneos enviando una proporción mayor de sangre hacia el corazón y los músculos, evitando así el aumento de la temperatura.

##### **2.1.1.2. Protección**

A nivel físico, protege los tejidos adyacentes de daño mecánico, además los queratinocitos de la epidermis evitan la penetración microbiana en la superficie, los lípidos evitan la evaporación del agua, el sebo previene la resequead de la piel y de los pelos, y presenta sustancias bactericidas. A nivel biológico se encuentran las células de Langerhans epidérmicas las cuales promueven la respuesta inmunitaria ante cualquier agente extraño.

##### **2.1.1.3. Sensaciones cutáneas**

Se encuentran las táctiles, térmicas y de dolor; las cuales se perciben debido a la amplia variedad de receptores y terminaciones nerviosas distribuidas abundantemente en la piel.

#### **2.1.1.4. Excreción y absorción**

Desempeña una función secundaria en la eliminación de sustancias corporales y en la absorción de materiales del exterior. El sudor es el principal vehículo de transporte, además de eliminar agua y calor, permite excretar pequeñas cantidades de sales, dióxido de carbono, amoníaco y urea.

#### **2.1.1.5. Síntesis de vitamina D**

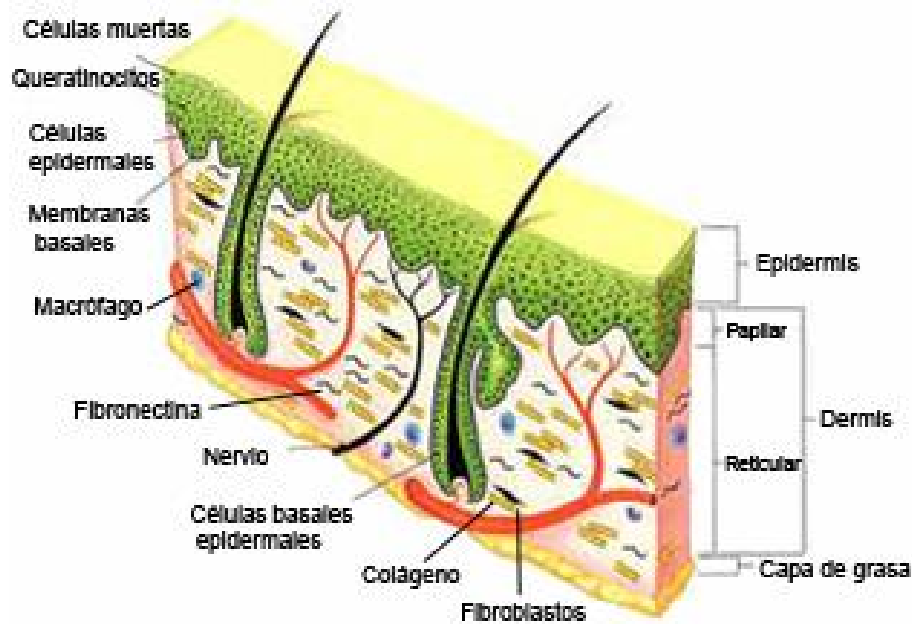
En la piel se da la activación de una molécula precursora por medio de los rayos ultravioleta, por último este precursor se modifica en el hígado y los riñones para producir la vitamina D.

### **2.1.2. Estructura de la piel**

Es necesario comprender la importancia del cultivo de piel humana *in vitro* con fines médicos, de reparación de tejido o sustitución; para ello se debe conocer la composición celular y las características generales que cumple cada una de ellas.

Según Liu *et al.* (2004), la piel consiste básicamente de células y una matriz extracelular insoluble; esta última se encuentra conformada por redes altamente hidratadas de macromoléculas compuesta por diferentes glicoproteínas (colágeno, elastina, fibronectina, laminina y condronectina) y glicosaminoglicanos (GAG, incluyéndose el ácido hialurónico, condroitina-6-sulfato, dermatansulfato y heparansulfato).

En cuanto a la composición celular, se conforma de dos partes principales (figura 1): la epidermis, compuesta por tejido epitelial y es la más superficial y delgada; y la dermis que es la más profunda y gruesa y esta conformada por tejido conectivo (Davis *et al.*, 1994). Existe además un tejido adicional subcutáneo que no forma parte de la piel pero que presenta vasos sanguíneos que irrigan la piel y almacena grasa, se le conoce como hipodermis.



**Figura 1.** Composición celular de la piel  
Modificado de Demling *et al.* (1999)

### 2.1.2.1. Epidermis

Es un epitelio plano estratificado queratinizado que es impermeable a todas las sustancias no gaseosas, presenta un comportamiento de membrana con carga eléctrica negativa (Abram, 2004). Se encuentra conformada por cuatro tipos distintos de células: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.

Cerca de un 90% de las células epidérmicas corresponden a queratinocitos los cuales se diferencian para producir queratina; la cual es una proteína fibrosa y resistente que protege tanto la piel como tejidos subyacentes del calor, microbios y compuestos químicos; además de tener función de sellador impermeable. Esto origina las capas superficiales e inertes de la piel, las células queratinizadas se pierden constantemente y se sustituyen por células que se producen por la actividad mitótica de las células de la capa basal de la epidermis (Davis *et al.*, 1994).

Las células que proliferan en la capa basal son desplazadas a niveles superiores y conforme ascienden producen queratina, la cual se mantendrá en el citoplasma, provocando la muerte de la célula (Demling *et al.*, 1999). Por consiguiente la organización de la epidermis en capas se encuentra influenciada por el ciclo de vida del queratinocito, el cual incluye proliferación, crecimiento, desplazamiento, diferenciación, muerte y descamación.

El 8% de las células epidérmicas se encuentra conformado por melanocitos, los cuales transfieren a los queratinocitos, gránulos de melanina, el cual es un pigmento que varía de marrón a negro, y tiene influencia en el color de piel y absorbe la luz ultravioleta dañina; en la capa más externa dentro de la célula protege al núcleo (Grabowski y Tortora, 2002). En cuanto a las células de Langerhans provienen de la médula ósea y tienen función de controlar las reacciones inmunitarias contra los microorganismos. Las células de Merkel se localizan en la capa más profunda de la epidermis, encontrándose en contacto con las prolongaciones de las neuronas sensoriales, participando así en las sensaciones táctiles.

Los queratinocitos conforme se desplazan hacia la superficie cutánea forman capas bien definidas durante su paso. Por lo general se puede dividir en cuatro capas o estratos bien definidos: basal, espinoso, granuloso y córneo (tabla 1).

**Tabla 1.** Comparación estructural de los estratos epidérmicos.

<b>Estrato</b>	<b>Células presentes</b>	<b>Organelas</b>	<b>Citoesqueleto</b>
Basal	Es el más profundo, consiste en una sola capa de queratinocitos cúbicos o cilíndricos, células madre, melanocitos, células de Langerhans y de Merkel	Núcleos grandes y con muchos ribosomas, un pequeño aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso	Filamentos intermedios de queratina insertos en los desmosomas, que unen las células de este estrato con el estrato espinoso
Espinoso	Encima del basal, consta de 8 a 10 capas de queratinocitos poliédricos muy unidos, cuenta con prolongaciones de melanocitos y células de Langerhans	Presentan un contenido alto de ARN (ácido ribonucleico), con las mismas organelas que el estrato basal	Haces de filamentos intermedios insertos en desmosomas, dando resistencia y flexibilidad a la piel
Granuloso	Tres a cinco filas de queratinocitos planos donde ocurre apoptosis	Organelos en proceso de degeneración	Filamentos intermedios evidentes, con presencia de queratohialina, que organiza los filamentos en haces más gruesos, y gránulos laminares que liberan una secreción rica en lípidos
Córneo	Con 25 a 30 capas de queratinocitos muertos y planos, las células descaman constantemente y se sustituyen por células de capas inferiores	Citoplasma sustituido por queratina	Con presencia de queratohialina y filamentos intermedios en íntima aposición, y gránulos laminares

Fuente: Grabowski y Tortora (2002) y Leeson *et al.* (1998). Microsoft Word

En áreas que sufren de mucha fricción, como la yema de los dedos, palmas de manos y pies, se presenta una zona adicional denominada estrato lúcido, el cual se encuentra entre el estrato granuloso y córneo; consta de 3 a 5 capas de queratinocitos transparentes, planos y muertos.

Según Demling *et al.* (1999) el reemplazo de la capa epidérmica por medio del proceso de regeneración toma cerca de dos a tres semanas; cuando se produce una herida los estímulos biológicos o señales son necesarias para dirigir la



orientación y respuesta mitótica adecuada de las células epidérmicas. Muchas de las señales provienen de los elementos dérmicos, especialmente de las matrices de proteínas y glicosaminoglicanos.

#### **2.1.2.2. Dermis**

La función básica de la dermis es proporcionar una matriz en donde los polisacáridos y las proteínas se puedan unir para producir macromoléculas con una alta capacidad para retener agua (Davis *et al.*, 1994). Dentro y asociadas a la matriz se encuentran dos proteínas fibrosas:

- colágeno: el cual presenta alta resistencia a la tensión y es el mayor constituyente de la dermis y
- la elastina que constituye solamente una parte del complejo, proporciona elasticidad

Contiene vasos sanguíneos, nervios y apéndices de la piel (glándulas sudoríparas ecrinas y apócrinas, folículos pilosos y glándulas sebáceas). Los vasos sanguíneos nutren la piel y ayudan a mantener la temperatura corporal y proporcionan glóbulos blancos para la defensa contra la infección y sustancias nocivas, sin embargo ningún vaso pasa entre la unión dermis-epidermis. La dermis se encuentra conformada por tejido conectivo denso irregular y se subdivide en dos estratos: la capa papilar y la capa reticular; (tabla 2).

**Tabla 2.** Comparación estructural de los estratos dérmicos.

<b>Estratos</b>	<b>Descripción</b>
Papilar	Porción superficial de la dermis, cerca de una quinta parte, compuesto de tejido conectivo areolar formada por fibras colágenas, reticulares y elásticas delgadas dispuestas en una red extensa. Presenta papilas dérmicas con capilares, corpúsculos táctiles y terminaciones nerviosas libres.
Reticular	Porción profunda de la dermis, conformado por tejido conectivo denso e irregular, con haces de colágeno y algunas fibras elásticas gruesas y entrecruzadas Espacios rellenos con algunos adipositos, folículos pilosos, nervios, glándulas sebáceas y sudoríparas.

Fuente: Grabowski y Tortora (2002) y Leeson *et al.* (1998). Microsoft Word

La capa papilar de la dermis es el mayor productor de proteínas dirigiendo así la replicación epidermal y reparación tanto de la epidermis como de la dermis, además de que contiene el mayor flujo de sangre. Otra función importante de la dermis es proporcionar un soporte para la migración celular y el transporte de nutrientes (Demling *et al.*, 1999).

Dentro de los elementos celulares más importantes presentes en la dermis se encuentran los fibroblastos y los macrófagos, además se puede encontrar células de grasa individual o agrupada.

#### **2.1.2.2.1. Fibroblastos**

El tipo principal de célula presente en la dermis es el fibroblasto, el cual es el encargado de producir fibras colágenas, reticulares y elásticas, y de la síntesis de los glicosaminoglicanos, glucoproteínas y ácido hialurónico de la sustancia intercelular amorfa.

Las proteínas de adhesión (presentes en la matriz) son las que cumplen una de las funciones principales de la dermis, de unirse a las células epidermales y servir para la migración y replicación de las mismas. Además de producir colágeno (tipo I) y elastina; tiene a cargo producir fibronectina, la cual sirve como señal para la preparación del tejido en el proceso de recuperación de una herida (Demling *et al.*, 1999).

La matriz que se obtiene debido a la actividad de los fibroblastos es semifluida y permite a las células y al tejido conectivo orientarse, así como la difusión de nutrientes y como soporte para la migración celular.

Los fibroblastos son células grandes, planas y ramificadas; las prolongaciones que presenta son delgadas. El núcleo es oval o alargado y presenta una membrana delgada, con uno o dos nucleolos notables y una pequeña cantidad de cromatina (Leeson *et al.*, 1998). Los fibroblastos jóvenes son sumamente activos en la síntesis de proteína para la producción de la matriz extracelular, el citoplasma es homogéneo, presenta gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi desarrollado cerca del núcleo.

Debido a que los fibroblastos tienen una función crítica en el proceso de reparación de tejido, han sido utilizados como modelos celulares por muchas razones. Contribuyen en la reparación del tejido debido a que producen la mayoría de las proteínas estructurales de las cuales carece el tejido dañado; además de que favorecen la contracción de la herida y la reorganización de la matriz extracelular. Adicionalmente los fibroblastos son las células de mamíferos más fáciles de cultivar (Katalinich, 1997).

Actualmente los fibroblastos son utilizados para la evaluación de biomateriales en ingeniería de tejidos, gracias a la utilización de líneas celulares aisladas de cualquier parte del cuerpo humano, las cuales tienen la capacidad de permanecer cultivadas por largos períodos de tiempo. Otra característica que presentan estas células es que son dependientes de soporte para su crecimiento; estudios indican que este tipo de células tienen preferencia por superficies catiónicas como la del quitosano; y por los iones  $\text{Ca}^{+2}$  presentes en el suero bovino fetal (SBF) y en el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) entre otros, permitiendo la adhesión a estas películas u otras con características químicas diferentes.

Como se mencionó anteriormente, los fibroblastos sintetizan las macromoléculas de la matriz extracelular de la dermis de una manera organizada, controlando así la granulación del tejido y las cicatrices hipertróficas. Además se conocen otras células que dependen de los fibroblastos y sus productos como los miofibroblastos y queratinocitos (Katalinich, 1997).

## **2.2. INGENIERÍA DE TEJIDOS**

### **2.2.1. Definición**

En la actualidad existen diferentes definiciones acerca de la ingeniería de tejidos, según Muschler *et al.* (2004) es “una disciplina que se basa en conocimientos de física, química y biología aplicados a materiales, sistemas y estrategias para alcanzar beneficios prácticos; además de incluir la definición sistemática y valoración de cada variable que puede contribuir al fracaso o éxito de cualquier esfuerzo desarrollado”.

No obstante Sachlos y Czernuszka (2003) la definen como “un campo multidisciplinario la cual envuelve la aplicación de principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia el conocimiento fundamental de las relaciones estructura-función en tejidos animales normales y patológicos; y el desarrollo de sustituyentes biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de cualquier tejido”.

La ingeniería de tejidos aplica este marco conceptual para avanzar en la reparación, cambio o regeneración de órganos y tejidos. En la actualidad la ingeniería de tejidos se ha basado en diferentes estrategias dentro de las cuales se incluye el trasplante de órganos y tejidos por completo, trasplante de pequeñas secciones de tejido (piel) y trasplante de suspensiones celulares (transfusiones de sangre o de médula ósea).

### **2.2.2. Objetivos de la ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejidos se ha desarrollado debido a la falta de terapias médicas disponibles y efectivas para el tratamiento de heridas y enfermedades. La limitación de materiales quirúrgicos y tratamientos disponibles actualmente resultan sumamente costosos; por lo que una meta de la ingeniería de tejidos es tratar de disminuir el costo relacionado a los procedimientos médicos existentes; incluso un objetivo primordial es el desarrollo de productos biomédicos de bajo costo obtenidos a partir de biomateriales con aplicaciones en cirugía y reparación de tejidos dañados (Katalinich, 1997).

Una ventaja con que cuenta este campo es la capacidad de producir suministros de órganos artificiales sin efectos en el sistema inmune y sustituyentes de tejidos que puedan crecer con el paciente; proporcionando soluciones a órganos y tejidos dañados sin la necesidad de terapias suplementarias (Sachlos y Czernuszka, 2003).

Según Johnson (2000) se han identificado cinco objetivos primordiales de la ingeniería de tejidos:

- a. proporcionar una prótesis celular o reemplazar una parte del cuerpo humano
- b. proporcionar productos capaces de inducir la regeneración de tejido, el cuerpo debe ser capaz de remodelar y absorber el producto
- c. proporcionar modelos de sistemas de tejidos u órganos conteniendo células normales o aberrantes, las cuales deben estar disponibles para investigaciones básicas o en aplicaciones como determinación de toxicidad o en estudios de enfermedades
- d. proporcionar vehículos capaces de liberar células a pacientes, las cuales deben permanecer en el sitio específico y mantener su función
- e. proporcionar una superficie biológica para aparatos no biológicos (como biosensores, catéteres o prótesis ortopédicas) para mejorar su funcionalidad y reducir el porcentaje de infecciones

La adhesión, proliferación y crecimiento celular ha sido estimulada en numerosos biomateriales mediante la incorporación de la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), la cual es un factor importante en la unión de numerosos tipos celulares a diferentes superficies. Según Chung *et al.* (2003) la secuencia arginina-glicina-acido aspártico es un dominio comúnmente encontrado en muchas proteínas de adhesión y unidas a numerosos receptores de integrinas; una ventaja de incorporar oligopéptidos a los biomateriales recae en impartir selectividad al material escogiendo por ende un solo tipo de célula.

Este tipo de enfoque es aplicable además en la manipulación del ambiente de recuperación de una herida alrededor de un biomaterial implantable con el fin de controlar la estructura del tejido regenerado. Otra aplicación de la ingeniería de tejidos es la inmovilización de sustancias con actividad biológica, como factores de crecimiento, proteínas en matrices poliméricas para recuperación de heridas o para reparar tejidos (Katalinich, 1997).

### **2.2.3. Tipos de células utilizadas en ingeniería de tejidos**

Los productos obtenidos a través de la ingeniería de tejidos se encuentran compuestos básicamente por dos componentes; uno biológico el cual corresponde a las células o tejidos aislados de humanos o animales y células manipuladas genéticamente; y el biomaterial propiamente dicho.

Según Tezcaner *et al.* (2002) las células pueden obtenerse a partir de tres fuentes diferentes:

- a. Células autólogas: tomadas de la misma persona que recibirá los nuevos tejidos
- b. Células alogénicas: tomadas de otra persona, pero que se utilizarán para transplantarlas a una persona diferente
- c. Células xenogénicas: tomadas a partir de otras especies animales

Cada uno de estos tres tipos de células presenta ventajas y desventajas, las cuales permiten determinar cual es la más favorable para determinada aplicación (tabla 3).

**Tabla 3.** Comparación de características de las células utilizadas en ingeniería de tejidos.

Tipo de célula	Ventaja	Desventaja
Autóloga	No inmunogénicas, evita el rechazo y transmisión de enfermedades	No pueden ser obtenidas con anticipación
Alogénica	Pueden ser cultivadas con anticipación y mantener un reservorio, al igual que las células xenogénicas	Se requiere reducir su inmunogenicidad o el paciente debe tomar drogas inmunosupresivas
Xenogénica	Disponibles en el mercado y en gran cantidad	Requieren tratamiento genético o tratamiento con drogas inmunosupresivas, pueden transmitir enfermedades

Fuente: Tezcaner *et al.* (2002). Microsoft Word

Las células utilizadas normalmente pueden ser adultas o embrionarias. Las células embrionarias son pluripotentes y pueden ser dirigidas a producir cualquier línea celular requerida; pero este procedimiento no es técnicamente sencillo y además existe una limitada disposición de células embrionarias alogénicas (Garner, 2004); además exhiben y mantienen el estado diploide constante.

Una célula troncal presenta la capacidad de renovarse y de producir tipos de células especializadas bajo condiciones de cultivo apropiadas; pueden obtenerse a partir del estado embrionario (de tejido fetal) o de tejido adulto. Una célula troncal adulta es una célula indiferenciada, que se puede encontrar en un tejido diferenciado adulto (especializado).

Las células embrionarias se dividen para generar células precursoras, las cuales sufren un proceso de diferenciación y originan los tipos celulares con formas y funciones especializadas; algunas de estas células se encuentran en la médula ósea, sangre, córnea y retina del ojo, cerebro, hígado, piel, páncreas y tejido del tracto intestinal (Tezcaner *et al.*, 2002).

#### **2.2.4. Soportes celulares**

Un método relevante de la ingeniería de tejidos involucra el crecimiento de las células específicas *in vitro* dentro del órgano o tejido que presenta dimensiones tridimensionales; las células cultivadas presentan una carencia en cuanto al crecimiento en orientaciones tridimensionales y tienen la tendencia a migrar aleatoriamente para formar capas de células dimensionales.

Sin embargo con la aplicación de la ingeniería de tejidos las orientaciones tridimensionales se logran alcanzar mediante el crecimiento de las células en matrices porosas, conocidas como soportes, a los cuales las células se adhieren y colonizan (Sachlos y Czernuszka, 2003).

Los soportes pueden ser utilizados simultáneamente como matrices que contienen agentes bioactivos y que proporcionan un medio para que células primarias indiferenciadas se unan a ellos. Los soportes actualmente presentan diversidad de formas dependiendo de la aplicación para la cual se fabrican, pueden ser membranas o incluso estructuras con dimensiones tridimensionales; en los últimos años ha aumentado la utilización de soportes tipo malla no entrelazados debido a su estructura con alta porosidad (Tuzlakoglu *et al.*, 2004).

Durante el crecimiento y diferenciación de las células mantenidas en un soporte existen factores relevantes que influyen sobre la respuesta de las células, relacionadas con la distribución espacial celular y morfología celular; tomando en cuenta los factores de transferencia de masa de sustancias químicas hacia las células, factores mecánicos como tensión y equilibrio hidrodinámico, y por último señales fisicoquímicas (Tezcaner *et al.*, 2002).



Es importante tomar en cuenta que cada tejido y órgano presenta características metabólicas diferentes, así el corazón, riñón, hígado, el cerebro y los pulmones llevan a cabo funciones muy complejas con alto consumo de energía a diferencia de las necesidades de la piel y cartílago.

Un requerimiento muy importante para la ingeniería de tejidos es la formación de una matriz extracelular, la cual proporciona integridad mecánica y una zona a la cual las células se pueden adherir, cada matriz depende del tipo de tejido; por lo que el diseño de soportes y los parámetros de cultivo *in vitro* para la optimización del adecuado intercambio de gases y nutrientes, integridad estructural del tejido, crecimiento y diferenciación de las células específicas son importantes para el desarrollo de órganos bioartificiales (Muschler *et al.*, 2004).

#### **2.2.4.1. Biomateriales**

Para comenzar se debe tener una definición clara acerca de la palabra biomaterial, la cual se utiliza para denominar materiales que constituyen partes de implantes médicos, aparatos extracorporales y dispositivos que han sido utilizados en medicina, cirugía, ortodoncia y medicina veterinaria.

Según Boretos y Eden (1984) se define biomaterial como “cualquier sustancia (diferente a una droga) o combinación de sustancias, de origen sintético o natural, el cual puede ser utilizado en cualquier momento como una parte de un sistema que trata, reemplaza o aumenta cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano”.

La habilidad de un material a ser reabsorbido por el cuerpo a través del tiempo es un factor importante para ciertos biomateriales implantables; en la obtención de matrices, la degradación y absorción de la matriz permite el crecimiento gradual hacia adentro y por último el reemplazo de la matriz de regeneración por tejido normal. Según Buckley y O’Kelly (2004) existen tres tipos principales de materiales

que han sido investigados en la actualidad: cerámicas bioactivas y biodegradables, biopolímeros sintéticos y biopolímeros naturales.

Según Sastre *et al.* (2004) los polímeros naturales ofrecen la ventaja de ser muy similares a las sustancias macromoleculares que el medio biológico es capaz de reconocer y metabolizar, debido a que se obtienen a partir de fuentes naturales (animales o plantas). De esta manera se evitan los problemas derivados de la toxicidad y estimulación de una respuesta inflamatoria crónica, sin embargo las proteínas por un lado poseen un alto grado de inmunogenicidad, de las cuales el colágeno presenta la menor inmunogenicidad; mientras que los polisacáridos son menos o no inmunogénicos (tabla 4).

**Tabla 4.** Características generales de algunos materiales poliméricos naturales.

	<b>Polímero</b>	<b>Presencia</b>	<b>Función fisiológica</b>
<b>Proteínas</b>	Seda	Síntesis por artrópodos	Protección
	Queratina	Cabello	Aislamiento térmico
	Colágeno	Tejidos conectivos	Soporte mecánico
	Gelatina	Colágeno parcialmente amorfo	Producto industrial
	Fibrinógeno	Sangre	Coagulación sanguínea
	Elastina	Ligamentos del cuello	Soporte mecánico
	Actina	Músculo	Contracción, movilidad
	Miosina	Músculo	Contracción, movilidad
<b>Polisacáridos</b>	Celulosa (algodón)	Plantas	Soporte mecánico
	Amilosa	Plantas	Reservorio de energía
	Dextrano	Sintetizado por bacterias	Matriz para crecimiento de organismos
	Quitina, quitosano	Insectos y crustáceos	Proporciona forma
	Glicosaminoglicanos	Tejido conectivos	Contribuye al soporte mecánico

Fuente: Burg y Standard (2001). Microsoft Word

Debido a la similitud de los polímeros con sustancias macromoleculares, estos pueden ser degradados por enzimas presentes en los organismos vivos, característica que favorece la aplicación temporal; la capacidad de degradación se puede controlar por modificaciones químicas o entrecruzamiento. Además tienen un comportamiento bioactivo potencial y la capacidad de interactuar con el tejido

del hospedante, versatilidad química y en algunos casos una fuente de obtención bastante amplia.

A pesar de sus excelentes características de biocompatibilidad presentan grandes variaciones en cuanto a su desempeño mecánico (Sachlos y Czernuszka, 2003). En la actualidad muchos de estos polímeros son los más utilizados como soporte para el crecimiento de diferentes tipos de tejido, pero entre los más investigados se mencionan el colágeno, el ácido hialurónico y el quitosano; cada uno con diferencias importantes en cuanto a degradabilidad y capacidad de mantener células viables.

En la actualidad existen numerosas técnicas para el procesamiento de soportes a base de materiales sintéticos, naturales o compuestos para obtener estructuras porosas y continuas (anexo 1).

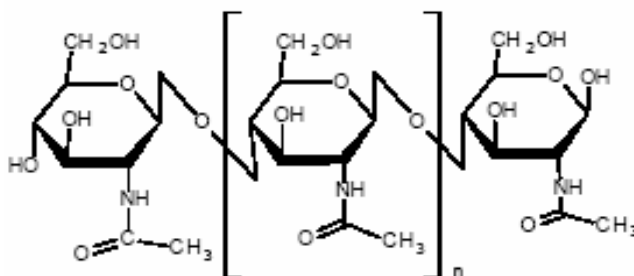
### **2.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL QUITOSANO**

Según varios autores la quitina es el segundo polímero natural más abundante de la tierra, después de la celulosa (Sing y Ray, 2000). Como menciona Abram (2004) se encuentra presente en la estructura esquelética de muchos invertebrados, como por ejemplo los artrópodos, anélidos, moluscos y celenterios. Además se encuentra presente en algunos hongos como ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos y en algas como las diatomeas.

Según un estimado se sintetizan millones de toneladas de quitina al año en la naturaleza, lo que lo hace un recurso de alto valor para diversas aplicaciones en campos como la industria y medicina (Hsu *et al.*, 2004).

Su estructura química presenta una alta similitud con la celulosa. La diferencia entre sus cadenas radica en el carbono dos el cual presenta un grupo acetamida en la quitina y un grupo hidroxilo en la celulosa (Abram, 2004). Es un polímero de

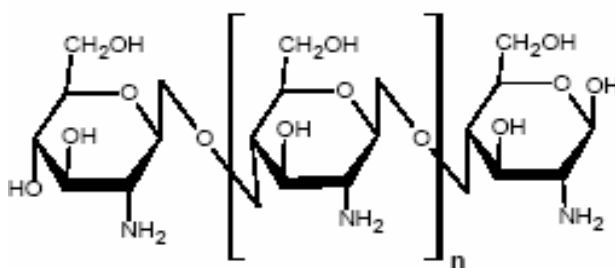
cadena lineal conformado por poli[ $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos], con un peso molecular sumamente alto (Kato *et al.* 2003) (figura 2).



**Figura 2.** Estructura química de la quitina.  
Fuente: Rohindra *et al.* (2005)

Debido a la insolubilidad de la quitina en medios ácidos, alcalinos y en la mayoría de los solventes orgánicos, su utilización es muy reducida; la desacetilación de la quitina produce quitosano, el cual es relativamente reactivo y se puede producir en numerosas formas, como polvo, pasta, películas y fibras entre otras.

La reacción de desacetilación se obtiene al someter a la quitina a un medio alcalino concentrado, y a temperaturas superiores a 60 °C; dándose la pérdida del resto acetilo del grupo amido del carbono dos, quedando así un grupo amino en esta posición. Como resultado de esta reacción se produce quitosano (figura 3), el cual es un polisacárido conformado por poli[ $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos] (Singh y Ray, 2000).



**Figura 3.** Estructura química del quitosano.  
Fuente: Rohindra *et al.* (2005)

El álcali más usado para llevar a cabo la desacetilación es el hidróxido de sodio (NaOH); el grado de desacetilación depende de la concentración del álcali, temperatura, tiempo de reacción, tamaño de partícula y densidad. Cuando se trata la quitina con NaOH 50% a 100 °C por una hora se obtiene quitosano con un grado de desacetilación de un 82%, si se extiende la reacción por 48 horas, se alcanza el 100% de desacetilación. Sin embargo esto conlleva a una pérdida de la viscosidad, indicando que hubo degradación de la cadena polimérica.

El quitosano no se presenta como una molécula única; presenta variabilidad en el tamaño de las cadenas como en el grado de acetilación de cada una. Según Singh y Ray (2000) la reacción de desacetilación raramente es completa y la mayoría de los productos de laboratorio y comerciales tienden a ser copolímeros de unidades repetidas de N-acetilglucosamina y N-glucosamina; la relación de estas unidades depende de la preparación y fuente del quitosano, pero por lo general predominan las unidades de glucosamina.

Además es el único polisacárido catiónico natural; confiriéndole diferentes propiedades reactivas (Gerasimenko *et al.*, 2004 y Abram, 2004). En su estructura el nitrógeno se encuentra como una amina alifática primaria, y origina reacciones típicas como la N-acilación y la formación de bases de Schiff. Normalmente es insoluble en pH neutros y básicos; pero sin embargo por debajo de pH 6, los grupos aminos del quitosano se pueden protonar y por consiguiente disolverse en soluciones acuosas (Roh y Kwon, 2002).

La solubilidad depende de la distribución de los grupos amino libres y N-acetil, el quitosano es un polielectrolito lineal a pH ácido; presenta una alta densidad de carga, una por glucosamina; por consiguiente el pH y las fuerzas iónicas juegan un papel importante en la viscosidad intrínseca del quitosano (Singh y Ray, 2000).

La unidad D-glucosamina presenta un valor de  $pK_a$  de 7,5. Según Säkkinen (2003) la naturaleza básica del quitosano depende en parte al grado de desacetilación y el valor de  $pK_a$  se encuentra alrededor de 6.5. El quitosano se disuelve lentamente en soluciones acuosas ácidas y ligeramente ácidas; además de ser una molécula hidrofílica, retiene agua en su estructura y tiene la capacidad de formar geles; esta capacidad de formar geles ocurre a valores de pH ácidos y ligeramente ácidos, debido a la naturaleza catiónica.

La viscosidad de las soluciones aumenta conforme aumenta el peso molecular o la cantidad de polímero (Kristl *et al.*, 1993). Una disminución en el pH aumenta la viscosidad, debido a que la conformación que toma la cadena de quitosano es más extendida, ya que se presentan fuerzas repulsivas entre los grupos aminos cargados positivamente (Tsaih y Chen, 1999). La viscosidad también aumenta conforme aumenta el grado de desacetilación, debido a que las características del quitosano como polielectrolito aumentan o se hacen más notables.

El quitosano actualmente juega un papel sumamente importante en la utilización de biomateriales, esto se debe en parte a que presenta características como buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad, antitrombogénico, baja toxicidad y bajo costo (Cheng *et al.*, 2003; Gerasimenko *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2004; Roh y Kwon, 2002).

Según Kato *et al.* (2003) la quitina y el quitosano tienen una toxicidad baja; el quitosano presenta una dosis letal (LD 50) en el ratón de laboratorio de 16 g/kg, dato cercano a los valores que presentan la sal y el azúcar, además es seguro en la dieta de la rata en porcentajes mayores al 10%.

Debido a las características y comportamiento del quitosano, este ha encontrado gran cantidad de aplicaciones a nivel industrial y biomédico. Polímeros biocompatibles y biodegradables son convenientes para la obtención de micropartículas, implantes y conjugados macromoleculares.

El quitosano específicamente ha sido utilizado en el procesamiento de alimentos, bioquímica, biomedicina, cosméticos, tratamiento de aguas residuales y en la agricultura; pero en las últimas dos décadas ha tenido una creciente utilización en el campo biomédico (Hsu *et al.*, 2004).

En la actualidad se han investigado numerosas aplicaciones biomédicas del quitosano, el cual presenta capacidad para utilizarse como suturas absorbibles, sistemas de liberación de drogas y como soporte para inmovilización de enzimas (Singh y Ray, 2000). Algunas de las aplicaciones biomédicas del quitosano que han presentado un mayor auge corresponden a la recuperación de heridas y a las investigaciones en ingeniería de tejidos.

### **2.3.1. Caracterización físico química de quitosano**

#### **2.3.1.1. Grado de acetilación**

El quitosano es caracterizado por medio del grado de acetilación (DA), que corresponde a los grupos N-acetilamina; o por medio del grado de desacetilación (DDA) que corresponde a la proporción de grupos D-glucosamina (monómeros desacetilados) en una molécula de quitosano.

Varios autores señalan que el grado de desacetilación del quitosano es un parámetro de caracterización importante, debido a que influencia sus propiedades físico-químicas, como la conformación de la molécula de quitosano a fuerzas iónicas específicas, fuerza a la elongación y fuerzas de tensión; así como su biodegradabilidad, actividad inmunológica, solubilidad, hinchamiento, bioactividad y biocompatibilidad (Hsu *et al.*, 2004).

Actualmente se han desarrollado numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación, entre las que se encuentran: la espectroscopia infrarroja, espectroscopia ultravioleta, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), potenciometría y la conductimetría. Otros métodos utilizados incluyen el análisis elemental y térmico, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y el dicroísmo circular (Abram, 2004).

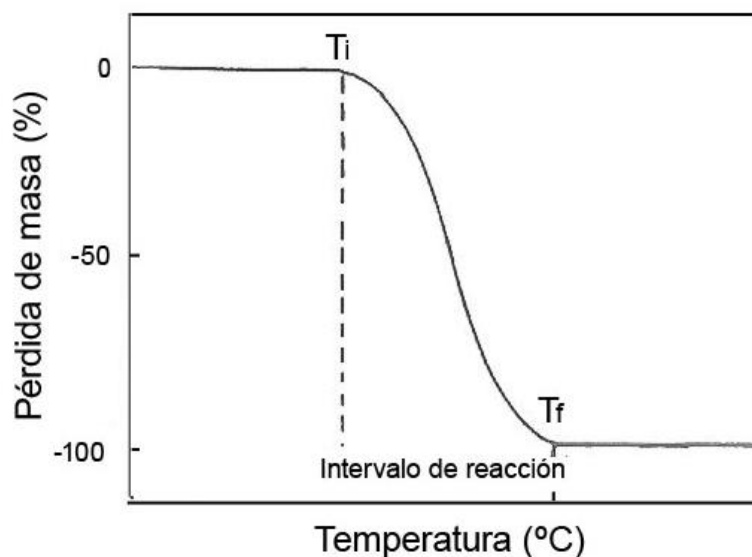
El análisis térmico se refiere a la técnica analítica que determina el comportamiento de una muestra en función de la temperatura. Esta técnica presenta ventajas comparada con otras técnicas analíticas utilizadas:

- la muestra se estudia a lo largo de un ámbito amplio de temperatura
- aplica para cualquier tipo de muestra
- se ocupa poca muestra (0.1 µg-10mg)
- la atmósfera alrededor de la muestra se encuentra controlada

El análisis termogravimétrico se utiliza para caracterizar la descomposición y la estabilidad térmica de materiales bajo condiciones controladas y para determinar la cinética de los procesos físico-químicos que ocurren en la muestra (Hatakeyama y Quinn, 1999).

Las curvas obtenidas a partir de los análisis termogravimétricos se expresan en términos del cambio de masa de la muestra, como porcentaje en el eje vertical y la temperatura o tiempo en el eje horizontal (figura 4).





**Figura 4.** Comportamiento de un polímero sometido a un análisis termogravimétrico  
**Fuente:** Hatakeyama y Quinn (1999)

La figura anterior muestra un ámbito de temperatura en donde se lleva a cabo una reacción, presentando dos temperaturas,  $T_i$  la cual representa la temperatura más baja a la cual la pérdida de masa puede ser detectada por las condiciones experimentales propuestas; mientras que  $T_f$  corresponde a la temperatura más baja en la cual el proceso responsable del cambio de masa se ha completado.

Para llevar a cabo un análisis termogravimétrico es necesario contar con equipo especializado, el cual se conoce como termobalanza; la cual se encuentra conformada básicamente de una balanza microelectrónica, horno que proporcione temperatura para llevar a cabo el análisis el cual se encuentra controlado por un programa y por último un instrumento que permita guardar los datos obtenidos a partir de estos instrumentos (Dood y Tonge, 1987).

### 2.3.1.2. Masa molecular viscosimétrica

Como se mencionó anteriormente el quitosano es una estructura primaria formado por residuos de  $\beta$ -1,4-D-glucosamina acetilados al azar; según Gerasimenko *et al.* (2004) el nombre de quitosano corresponde a un término colectivo para quitinas

desacetiladas que difieren en cristalinidad, características ópticas, grado de acetilación, contenido de impurezas y peso molecular promedio.

Dentro de los métodos utilizados para determinar el peso molecular del quitosano se encuentran la viscosimetría, la dispersión de la luz y la cromatografía de permeación de gel. La viscosimetría, la cual es la técnica más utilizada para este propósito, debido a su sencillez, se basa en la medición de la viscosidad de la solución de quitosano comparando el tiempo de flujo de un volumen específico a través de un tubo capilar, con el tiempo correspondiente del solvente utilizado (Muzzarelli y Peter, 1997).

Según Seymour y Carraher (1995) la relación de las viscosidades del quitosano y la del disolvente se denomina viscosidad relativa ( $\eta_r$ ), la viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ) se obtiene restándole a la viscosidad relativa una unidad y dividida por la concentración de la disolución correspondiente (c) y la viscosidad inherente se obtiene por medio del logaritmo de la viscosidad relativa entre la concentración de la disolución respectiva.

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_0 \quad [1]$$

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / c \quad [2]$$

$$\eta_{inh} = \log \eta_r / c \quad [3]$$

La viscosidad intrínseca se obtiene extrapolando la viscosidad reducida y la inherente a una concentración cero, la cual se encuentra relacionada con el peso molecular, con base en la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad [4]$$

En donde  $M_v$  es la masa molecular promedio viscosimétrica, K es una constante de proporcionalidad que es característica del polímero y del disolvente, y el exponente  $\alpha$  es una función de la forma de la hélice del polímero en la disolución, o sea es una medida de la interacción entre el disolvente y polímero.

La determinación del grado de acetilación y del peso molecular por medio de la técnica viscosimétrica son las más utilizadas e importantes para diferir las características y comportamiento físico-químico que presentará el quitosano en diversas aplicaciones, específicamente en cultivo de células humanas sobre hidrogeles de quitosano.

## **2.4. HIDROGELES EN APLICACIONES BIOMÉDICAS**

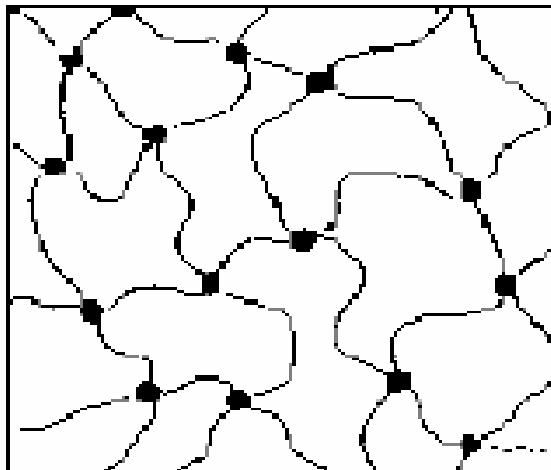
Los hidrogeles presentan numerosas aplicaciones biológicas, médicas y tecnológicas. Dentro de las aplicaciones más importantes se encuentran liberación controlada de drogas y la ingeniería de tejidos, esta última mantiene una tendencia a la utilización de soportes a partir de hidrogeles poliméricos para la reparación y regeneración de una gran variedad de tejidos y órganos.

### **2.4.1. Definición**

En cuanto a la definición de hidrogeles la mayoría concuerdan en que son estructuras tridimensionales hinchadas en presencia de agua o de fluidos biológicos (Berger *et al.* 2004; Swami, 2004). Algunos materiales cuando se colocan en medios líquidos, tienen la capacidad de hincharse y retener cierto volumen del medio acuoso absorbido en su red tridimensional. Actualmente se utilizan materiales tanto de origen natural (de plantas y animales) así como materiales sintéticos.

Los hidrogeles presentan una desventaja por su baja resistencia mecánica, comparada con otra clase de soportes obtenidos mediante técnicas diferentes para ser utilizados en ingeniería de tejidos. Es por eso que se tienden a entrecruzar las cadenas poliméricas de su estructura con agentes tales como formaldehído, compuestos epóxicos, dialdehídos (glutaraldehído y glioxal) y almidón (Rohindra *et al.*, 2005); de los cuales el más utilizado e investigado corresponde al glutaraldehído (Gonçalves *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004)

En los hidrogeles entrecruzados las cadenas poliméricas se encuentran unidas entre sí por medio del agente entrecruzante, lo que conlleva a la formación de una red tridimensional (figura 5).



**Figura 5.** Estructura de un hidrogel entrecruzado

Los agentes entrecruzantes son moléculas de un peso molecular pequeño comparado con las cadenas de polímeros que esta uniendo. Las propiedades de los hidrogeles dependen principalmente de la densidad o grado de entrecruzamiento, denominado como la relación de moles del agente con los moles de las unidades repetitivas del polímero. Entre más pequeño sea el tamaño del entrecruzante, más rápido se da la reacción de entrecruzamiento (Rohindra *et al.*, 2005).

Dependiendo de la naturaleza del entrecruzante las principales interacciones presentes en la red del hidrogel son enlaces covalentes o iónicos, los cuales permiten clasificar a los hidrogeles.

#### **2.4.2. Hidrogeles como soportes para ingeniería de tejidos**

Los soportes actúan como guía para el desarrollo de tejidos *in vitro* e *in vivo*, los polímeros utilizados para la fabricación de los soportes deben asemejar las matrices extracelulares presentes en los tejidos; es por esta razón que los hidrogeles han

sido sumamente investigados para este tipo de aplicación, específicamente para reemplazo de tejido blando ya que los hidrogeles presentan la capacidad de retener agua en su estructura polimérica al igual que retienen proteínas bioactivas.

Los hidrogeles usados en ingeniería de tejidos presentan poros, los cuales tienen la funcionalidad de permitir que las células vivas se acomoden adecuadamente o se diseñan para que se disuelvan o degraden, liberando factores de crecimiento y por ende creando poros en los cuales las células puedan penetrar y proliferar.

Las ventajas que presentan los hidrogeles es su capacidad de brindar un ambiente favorable para las proteínas, la capacidad de moldearse en diferentes formas y su alta biocompatibilidad; sin embargo presentan limitaciones como baja resistencia mecánica y dificultad para esterilizar.

Los hidrogeles al igual que otro tipo de soporte deben de cumplir ciertos criterios para ser utilizados en ingeniería de tejidos, los cuales se mencionan a continuación:

- a. Habilidad para restaurar la regeneración normal de tejido
- b. Facilidad en diseño, modificación y manipulación
- c. No tóxico y que interaccione específicamente con las células
- d. Fácil de esterilizar
- e. Que tenga una mínima respuesta inmune e inflamatoria
- f. Fácil de escalar el proceso de obtención del soporte
- g. Propiedades físico-químicas deseables
- h. Adecuada difusión de nutrientes, metabolitos y factores de crecimiento
- i. Permeabilidad macromolecular
- j. Variación espacial en la morfología porosa
- k. Modo de degradación del hidrogel

### **2.4.3. Clasificación de los hidrogeles**

En la actualidad existe más de una clasificación para los hidrogeles, una de ellas se basa en el método de preparación de los hidrogeles, así se encuentran los hidrogeles homopoliméricos, copoliméricos y por interpenetración polimérica. Además se pueden dividir según su naturaleza física en materiales amorfos o semi-cristalinos (Swami, 2004).

Los hidrogeles obtenidos a partir de quitosano presentan una buena biocompatibilidad, baja degradación y un procesamiento sumamente fácil; la capacidad de estos hidrogeles de hincharse y deshidratarse depende de la composición y medio en el cual se obtuvo el gel (Abram, 2004).

La clasificación se basa en la revisión que hace Berger *et al.* (2004) para hidrogeles de quitosano entrecruzados, el cual los clasifica en hidrogeles iónicos y covalentes.

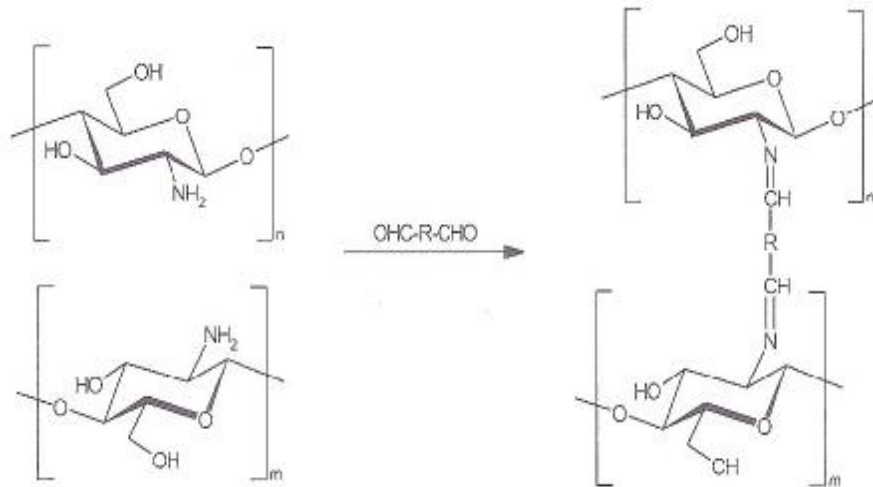
#### **2.4.3.1. Hidrogeles entrecruzados covalentemente**

Los hidrogeles covalentes de quitosano se dividen en tres grupos: quitosano entrecruzado consigo mismo, redes poliméricas híbridas y redes de polímeros interpenetrados. El entrecruzamiento involucra naturalmente dos unidades estructurales, las cuales pueden o no pertenecer a la misma cadena polimérica.

Las principales interacciones que se presentan en este tipo de hidrogel corresponden a enlaces covalentes; pero incluso se pueden presentar otras interacciones como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, las cuales se forman entre unidades acetiladas del quitosano (figura 6). No obstante entre mayor sea el grado de entrecruzamiento tienden a predominar los enlaces covalentes.



Los dialdehídos permiten que la reacción se de directamente en un medio acuoso sin necesidad de moléculas auxiliares (reductores) que puedan disminuir su biocompatibilidad (figura 8); sin embargo una desventaja de la utilización de estos compuestos es que son tóxicos.



**Figura 8.** Entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con un agente químico (dialdehído)  
Fuente: Abram (2004)

Además de los entrecruzantes dialdehídos se han utilizado compuestos como ácido oxálico y genipita, los cuales exhiben mecanismos de entrecruzamiento directos. Por otra parte se utilizan polímeros biocompatibles solubles en agua, que permitan el enlace covalente, tales como polietilenglicol (PEG), diacrilato y dialdehídos derivados de PEG.

Según Gonçalves *et al.* (2005) el grado de entrecruzamiento es el principal parámetro que influencia en las propiedades de resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, además de brindar una estructura porosa. Esta se encuentra influenciada por ciertos parámetros como la concentración del agente entrecruzante, peso molecular y grado de desacetilación del quitosano y temperatura.



El entrecruzamiento covalente permite obtener una red permanente que facilita la difusión de agua y mejora las propiedades mecánicas. Debido a esto se han utilizado en dos grandes campos, para liberación de drogas y como soporte para crecimiento de células.

## **CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. CONSECUCIÓN DE MATERIAS PRIMAS**

El quitosano obtenido a partir del camarón langostino *Pleuroncodes planipes* fue proporcionado por el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA) y es resultado de un proyecto PYMES realizado para la Cámara Puntarenense de Pescadores (CAMAPUN), con financiamiento del Consejo Nacional para las Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), denominado “Diseño de una planta industrial de extracción de quitina a partir de *Pleuroncodes planipes*”.

#### **3.1.1. Quitosano grado técnico**

La materia prima inicial es la quitina técnica, para lo cual su extracción se llevó a cabo en el Módulo Productivo de Quitina del Parque Marino del Pacífico a escala semi-industrial, según la metodología descrita por Madrigal (2003).

Se llevó a cabo un proceso de descarnado mecánico del camarón langostino, seguido por una desmineralización con HCl 10% m/v por una hora a temperatura ambiente, el producto se lavó con agua hasta neutralidad y se secó en una estufa de aire circulante a 60-70 °C por 24 horas.

El quitosano se obtuvo colocando en un reactor de vidrio de tres bocas de 2 L, 100 gramos de quitina técnica y 1.000 mL de hidróxido de sodio 50% m/v, esta mezcla se calentó a 120 °C por una hora con agitación constante en un agitador mecánico Fisher Scientific (Blair *et al.*, 1987). Posteriormente el producto se lavó con agua hasta pH neutro y se secó en una estufa de aire circulante VWR 1300 FD a 70-80 °C por 24 horas. Finalmente, se disminuyó el tamaño de partículas del quitosano obtenido en un molino Hammer Mill con una rejilla de 1 mm de diámetro.

#### **3.1.2. Quitosano purificado**

Se siguió la metodología propuesta por Esquivel (2005), para lo cual se pesó 25 g de quitosano grado técnico y se disolvieron en 500 mL de ácido acético al 2% v/v. La

solución se agitó mecánicamente a velocidad constante de 25 rpm utilizando una propela de acero inoxidable pequeña, hasta la completa disolución del quitosano. Debido a la viscosidad de la solución se agregó 250 mL más de ácido acético al 2% y se agitó por 15 minutos, posteriormente se filtró al vacío con una bomba KNF Laboport.

La solución filtrada se colocó en un beaker y se agregó un volumen de 300 mL de hidróxido de sodio al 25% m/m; se agitó mecánicamente por una hora con agitación constante; se recuperó un sólido blanquecino el cual se filtró en malla de nylon y se le hicieron lavados con agua hasta alcanzar un pH neutro, medido con papel tornasol.

El sólido se colocó en un beaker y se agregó 250 mL de etanol al 95%, se agitó manualmente con una varilla de vidrio, se tapó y se dejó en reposo por tres horas. Posteriormente el sólido se filtró al vacío y se colocó en una bandeja de acero inoxidable, para secar a temperatura ambiente por un día.

## **3.2. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO**

### **3.2.1. Determinación del porcentaje de material soluble en ácido acético**

Se siguió el método ASTM D1110-56. Se mezclaron 2,00 g de quitosano (Masa inicial) con 300 mL de ácido acético al 2%, en vez de agua destilada. La mezcla se dejó bajo agitación por 1 hora a temperatura ambiente; se secó un papel filtro Whatman a 105 °C y luego el material insoluble se filtró, se secó a 105 °C y se determinó su masa (Masa final) por diferencia de pesos, esta prueba se llevó a cabo para el quitosano grado técnico y purificado.

Cálculos:

$$\% \text{ MS} = \frac{M_i - M_f}{M_i} * 100 \quad [5]$$

### **3.2.2. Determinación del grado de acetilación**

#### **3.2.2.1. Análisis termogravimétrico (TGA)**

El cálculo del grado de acetilación (GA) se realizó de acuerdo al método propuesto por García *et al.* (1983); el cual permite comparar la pérdida de masa porcentual de la muestra, calculada a partir de la gráfica de la primera derivada de una curva termogravimétrica (DTGA).

Se siguió la metodología según el ASTM E 1131-03, se utilizó un equipo Perkin Elmer modelo Pyres TGA-6. Se midió una masa de 8-12 mg de muestra en cápsulas de porcelana abiertas y el análisis se llevó a cabo bajo atmósfera de aire, una velocidad de calentamiento de 20 °C /min y un ámbito de temperatura de 50 °C hasta 600 °C.

Para eliminar el contenido de humedad de las muestras, éstas se mantuvieron a 50 °C por 15 minutos, previo al inicio del aumento de temperatura en el análisis. El cálculo del grado de acetilación se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$GA_{280^{\circ}\text{C}} [GA>20] = 100 - [(\Delta m - 17,6)/0,31] \quad [6]$$

Donde:

$\Delta m$  = valor porcentual de la primera derivada de la masa perdida de la muestra a la temperatura respectiva

#### **3.2.3. Determinación de la masa molecular viscosimétrica ( $M_v$ ) de las muestras de quitosano**

Se siguió el método viscosimétrico para determinar la masa molecular del quitosano grado técnico y purificado, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el ASTM D 2857, bajo las condiciones y constantes propuestas por Esquivel (2005).

Se utilizó un viscosímetro Cannon Fenske modelo Routine No.150, en un baño a temperatura constante a 25 °C. Se preparó una solución de quitosano grado técnico

y purificado al 1% m/v, disuelto en una solución de ácido acético 2% v/v en acetato de sodio 0,2 mol/L. A partir de cada solución madre se prepararon diluciones de 0,5%, 0,25% y 0,1% m/v de quitosano.

Se utilizó la ecuación de Mark-Houwink (formula 4) para calcular la masa molecular promedio viscosimétrica del quitosano, a partir del tiempo de caída de cada una de las soluciones graficando la viscosidad inherente y reducida contra la concentración de las muestras; se calcula la viscosidad intrínseca la cual se relaciona con la masa molecular viscosimétrica mediante la siguiente ecuación:

$$[\eta] = KMv^\alpha$$

Donde

$[\eta]$  = viscosidad intrínseca

$$K = 13,8 \times 10^{-5}$$

Mv = masa molecular promedio viscosimétrica

$$\alpha = 0,85$$

### 3.3. OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO

Los hidrogeles estudiados corresponden a concentraciones de quitosano grado técnico al 1 y 3% (Silva *et al.*, 2004), para lo cual se disolvió 1 y 3 gramos de quitosano grado técnico respectivamente en 100 mL de ácido acético al 2% v/v y se agitó constantemente, aproximadamente por 60 minutos.

La solución se dejó por 24 horas en reposo hasta eliminar completamente las burbujas; luego se vertió 100 mL de solución en un molde de teflón y se evaporó el disolvente a 65 °C en estufa de aire circulante VWR 1300 FD por 90 minutos para obtener la película de quitosano.

El procedimiento de entrecruzamiento de hidrogeles de quitosano se realizó por inmersión de la película en soluciones comerciales de agentes entrecruzantes según lo propuesto por Chen *et al.* (2005), se utilizó glutaraldehído al 50% (CHO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO) y glioxal al 40% (CHO-CHO), así como diferentes concentraciones de glioxal al

30, 20, 10 y 5%. Se dejó reaccionar por 24 horas en un sistema de vidrios prensados que contenían la solución respectiva.

Después de las 24 horas de entrecruzamiento, se eliminó por vaciado el agente entrecruzante del sistema y se agregó etanol por 10 minutos para eliminar el exceso del reactivo del hidrogel, luego se eliminó el etanol y se sustituyó por glicina 0,1 mol/L por 5 minutos para neutralizar los grupos aldehídos que no reaccionaron y por último se hicieron tres lavados con agua destilada.

Posteriormente se procedió a secar los hidrogeles en una estufa de aire circulante a 55 °C por 24 horas, hasta peso constante.

### **3.4. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO**

#### **3.4.1. Análisis de hidrogeles de quitosano**

Se prepararon mediante la metodología indicada en el apartado 3.3. Se realizaron pruebas de absorción de agua, determinación de material soluble y análisis termogravimétricos, se analizaron hidrogeles de quitosano a concentraciones del 1 y 3%, entrecruzados con glutaraldehído al 50% y glioxal en sus diferentes concentraciones; además de llevar a cabo el análisis de los hidrogeles sin entrecruzar para tener parámetros de comparación.

Para la prueba de absorción de agua, se prepararon hidrogeles con dimensiones de 1 x 1 cm; los hidrogeles de quitosano al 1% y 3% presentaban un grosor de  $0,02 \pm 0,01$  mm y  $0,03 \pm 0,01$  mm respectivamente. No obstante las muestras para la determinación del material soluble se prepararon con dimensiones de 4 x 2 cm, con un grosor de  $0,02 \pm 0,01$  mm para los hidrogeles de quitosano al 1% y de  $0,04 \pm 0,01$  mm para los hidrogeles al 3%.

Para el análisis por microscopia electrónica se prepararon hidrogeles de quitosano al 1% entrecruzados con glutaraldehído al 50% y con las cinco diferentes

concentraciones de glioxal; además de analizar hidrogeles de quitosano sin entrecruzar.

### 3.4.2. Prueba de absorción de agua

Mediante esta prueba se determinó el comportamiento de los hidrogeles en presencia de atmósferas con humedades relativas controladas. Se utilizaron soluciones de glicerina que proporcionaron las distintas humedades relativas, las cuales se obtienen por la dilución de la glicerina al 70% v/v en agua destilada, las concentraciones se expresan como porcentajes peso/peso y cada una de ellas proporciona atmósferas diferentes (DIN 50008) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Humedades relativas obtenidas a partir de soluciones de glicerina

<b>Porcentaje de glicerina (% p/p)</b>	<b>Humedad relativa (%)</b>
94	20
93	25
91	30
89	35
86	40
83	45
80	50
76	55
72	60
68	65
63	70
58	75
52	80
44	85
34	90
20	95
10	98

Microsoft Word

Se prepararon cuatro humedades relativas diferentes siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente, correspondiendo a un 40, 55, 70 y 90% de humedad; además se utilizó una humedad al 100% la cual se obtuvo con agua destilada. Cada una de las soluciones se colocó en un recipiente de vidrio cerrado y se dejaron en reposo por 24 horas para alcanzar la atmósfera correspondiente.

Antes de llevar a cabo la prueba, las películas se secaron a 55°C por 24 horas. Para determinar el porcentaje de agua absorbida por cada uno de los hidrogeles, se determinó la masa seca inicial ( $M_i$ ) de cuatro muestras con un peso semejante y la masa seca final ( $M_f$ ), después de estar en las humedades relativas por 24 horas dentro de los recipientes de vidrio, mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ AA} = \frac{M_f - M_i}{M_i} * 100 \quad [7]$$

Para los hidrogeles de quitosano sin entrecruzar y entrecruzados con glutaraldehído al 50% y glioxal al 40%, se llevaron a cabo dos pruebas de absorción. Los hidrogeles de quitosano al 1% se colocaron en las cinco humedades relativas, mientras que los hidrogeles de quitosano al 3% se colocaron únicamente en las humedades relativas al 90 y 100%. Por otra parte los hidrogeles de quitosano al 1 y 3% entrecruzados con diferentes concentraciones de glioxal se colocaron en la humedad del 100%.

### **3.4.3. Determinación del porcentaje de material soluble en ácido acético**

Para determinar en que grado los hidrogeles de quitosano se entrecruzaron, cada uno se colocó en un sistema de extracción Soxhlet, Los hidrogeles se secaron en la estufa a 55 °C por 24 horas y se pesó la masa inicial ( $M_i$ ), luego se colocaron dentro de una bolsa hecha de malla de nylon, para evitar pérdida de masa por rompimiento de los mismos y se colocaron en el tubo Soxhlet. Se agregó al balón 200 mL de ácido acético al 2% v/v y se calentó a 70 °C por 6 horas.

Posteriormente se sacaron las muestras y se secaron en la estufa a 55 °C por 24 horas, para obtener la masa final seca ( $M_f$ ). El porcentaje de material soluble se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MS} = \frac{M_i - M_{f6}}{M_i} * 100 \quad [8]$$



#### **3.4.4. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Se analizaron las muestras de hidrogeles de quitosano de igual forma que para la caracterización del quitosano pero se realizó bajo atmósfera de gas nitrógeno con un flujo de 20 mL/min, con una velocidad de calentamiento de 20 °C /min y un ámbito de temperatura de 70 °C hasta 600 °C.

Para eliminar el contenido de humedad de las muestras, se mantuvieron a 70 °C por 10 minutos, previo al inicio del aumento de temperatura en el análisis, además de secarse por 1 hora en una estufa de aire circulante a 65 °C.

Se evaluó la temperatura inicial de descomposición, la temperatura de máxima velocidad de descomposición y el porcentaje de masa residual a 550 °C; con el fin de determinar el efecto del agente entrecruzante en la estabilidad térmica del quitosano y de brindar información acerca del grado de entrecruzamiento.

#### **3.4.5. Microscopia electrónica**

Esta técnica se utilizó con el fin de determinar la porosidad y características superficiales de los hidrogeles entrecruzados, la preparación de la muestra se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica y el análisis se efectuó en la Unidad de Microscopía Electrónica del Laboratorio de la Escuela de Ingeniería de Materiales del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Las muestras se secaron y colocaron sobre un portamuestras circular de 1 cm de diámetro impregnado de un material adhesivo. Se recubrieron con oro para conferirles propiedades conductivas y fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido marca Jeol JSM 6400F.

### **3.5. CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

#### **3.5.1. Mantenimiento de fibroblastos humanos**

Los fibroblastos humanos se obtuvieron a partir de un tejido de descarte de biopsia cutánea proporcionado por el Servicio de Dermatología del Hospital Nacional de Niños, y se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Sigma) suplementado con HAM's F12 en relación 3:1, con glutamina (200 mM Invitrogen Corporation) y antibiótico (1000 U/mL penicilina y 10000 µg/mL estreptomina, Invitrogen Corporation) al 1% y suero fetal bovino al 10%, se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en una humedad relativa del 94%.

Se realizaron subcultivos de los fibroblastos obtenidos con el fin de tener suficiente cantidad para llevar a cabo el crecimiento en los hidrogeles de quitosano, para tal fin se agregó 4 mL de tripsina/EDTA (Sigma Cell Culture) a los frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y se agitó suavemente para desprender los fibroblastos. A continuación se agregó 6 mL de medio DMEM/HAM's F12 para neutralizar la tripsina, para posteriormente tomar 5 mL y traspasarlos a otro frasco de cultivo. Cuando el medio de cultivo DMEM/HAM's F12 se tornó de color amarillo por la actividad metabólica de los fibroblastos, se cambió por medio de cultivo nuevo precalentado a 37 °C cada 7 días.

#### **3.5.2. Soportes de quitosano**

Se obtuvieron siguiendo la metodología propuesta en el apartado 3.3, las dimensiones del hidrogel corresponden a 15 mm de diámetro con un grosor de 0,02 mm. Se esterilizaron en platos petri con etanol al 70% por una hora en la cámara de flujo laminar (Hsu *et al.*, 2004) para luego llevar a cabo el crecimiento celular.

#### **3.5.3. Crecimiento en hidrogeles de quitosano**

Se compararon los resultados de la viabilidad celular de fibroblastos crecidos en una placa de 24 pozos con hidrogel de quitosano y sin él (control positivo). Se determinó la confluencia celular visualmente, por medio de un microscopio invertido. Antes de

cultivar los fibroblastos, se incubaron los soportes en suero fetal bovino (SFB) por 24 horas para cubrir el soporte con proteínas celulares esenciales y facilitar la adhesión celular.

### **3.5.3.1. Proliferación celular y prueba de viabilidad celular**

Los fibroblastos se incubaron por 3 y 7 días, se inocularon a una densidad de  $5,5 \times 10^4$  células/pozo, todas las pruebas se llevaron a cabo en seis pozos para cada tiempo de incubación a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%; se controló que el medio de cultivo cubriera por completo al hidrogel de quitosano. Después del tiempo de incubación, a cada uno de los pozos se le realizó el conteo celular siguiendo el procedimiento propuesto por Worthington Biochemical Corporation (2005). Se eliminó el medio de cultivo DMEM/HAM's F12 y se agregó 0,2 mL de tripsina/EDTA para desprender los fibroblastos, se agregó 0,4 mL de medio para neutralizar la tripsina, posteriormente se traspasó el medio a un tubo Eppendorf, se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos y se resuspendieron las células en 200 µL de medio DMEM/HAM's F12.

De los tubos eppendorf se tomó 10 µL de la suspensión celular y se realizó un conteo total de células en un hematocitometro, se contaron las células presentes en cuatro cuadrantes para obtener un promedio, esto se llevó a cabo por duplicado para determinar la proliferación celular a los 3 y 7 días de incubación; para los pozos incubados por 7 días después de realizar el conteo, al tubo Eppendorf se le agregó 10 µL de eosina azul para teñir los fibroblastos y se dejó por 5 minutos en reposo, para proceder a contar las células viables y no viables (Worthington Biochemical Corporation, 2005), con el fin de determinar el efecto del soporte de quitosano en el crecimiento celular.

Se procedió a realizar una prueba de hipótesis para promedios por tratamiento (con y sin hidrogel) y por tiempo de incubación para los conteos de fibroblastos, con un grado de confianza del 95%.

## **CAPITULO IV: RESULTADOS**

### **4.1. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO**

Para la caracterización del quitosano de grado técnico como purificado se llevaron a cabo tres determinaciones: solubilidad, grado de acetilación y peso molecular. Las últimas dos resultan ser de suma importancia para el crecimiento de cualquier tipo de células, debido al efecto que presenta el quitosano en la proliferación celular.

#### **4.1.1. Prueba de solubilidad**

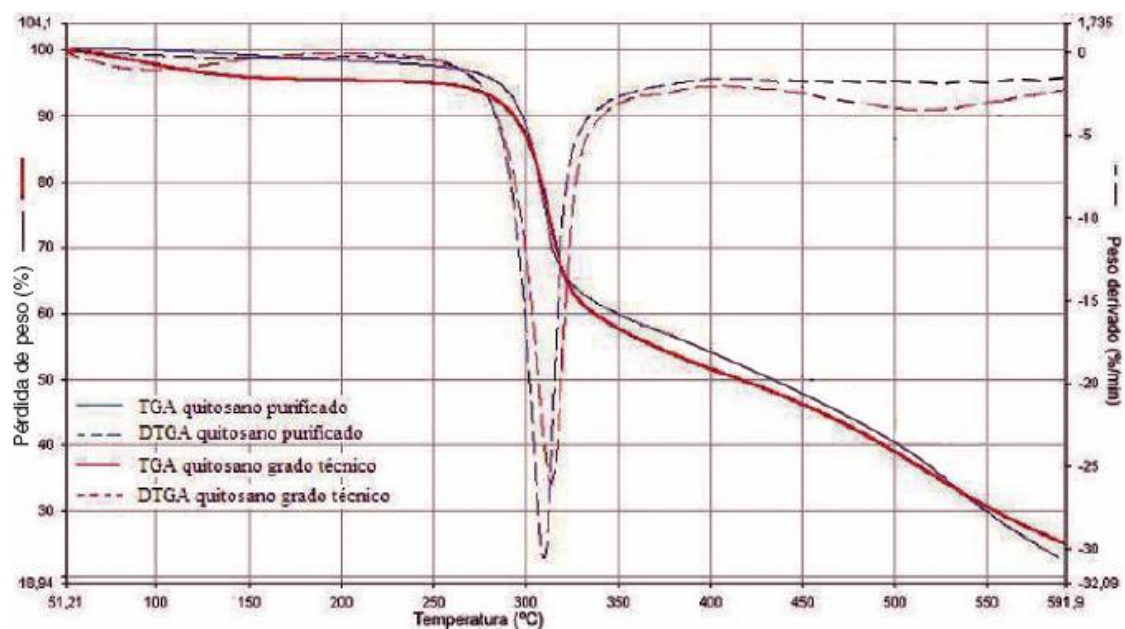
Mediante esta prueba se determinó un aumento en la solubilidad del quitosano de langostino purificado, lo esperado es que este se disolviera en un 100% debido a que se eliminó por medio de filtración al vacío las impurezas presentes en el quitosano grado técnico; sin embargo cuando se llevó a cabo la prueba de solubilidad, durante la filtración se observó en el papel filtro Whatman un residuo de color café, semejante al de la solución.

El quitosano grado técnico presentó un  $98,506 \pm 0,001\%$  de porcentaje de solubilidad, mientras que el quitosano de langostino purificado presentó un  $99,046 \pm 0,001\%$ ; datos obtenidos a partir del análisis de una muestra del quitosano de langostino utilizado como materia prima para esta investigación.

#### **4.1.2. Grado de acetilación**

El grado de acetilación de una muestra de quitosano se obtiene mediante un análisis termogravimétrico, el cual proporciona una curva termogravimétrica y la que permite determinar la variación del peso de una muestra con respecto de la temperatura o el tiempo; mediante esta curva se determina además la temperatura inicial y máxima velocidad de descomposición, así como el porcentaje de masa remanente o cenizas a dada temperatura.

Mediante esta prueba se obtuvo que el comportamiento térmico de los quitosanos de langostino analizados (grado técnico y purificado) es similar en cuanto a la forma de la curva de pérdida de masa, pero varían en temperaturas de descomposición; a pesar de que ambas presentan un único proceso de descomposición (figura 9).



Pyres Software

**Figura 9.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de muestras de quitosano de langostino grado técnico y purificado

El análisis de los termogramas y derivatogramas (figura 9), permite determinar que existe muy poca diferencia entre los distintos parámetros analizados para cada uno de los quitosanos, la mayor diferencia se encuentra en la temperatura de máxima velocidad de descomposición y en el grado de acetilación (tabla 6).

**Tabla 6.** Comparación de la temperatura de máxima velocidad de descomposición, masa residual a 550 °C, área bajo la curva y grado de acetilación en muestras de quitosano de langostino

Parámetro	Muestra	
	Grado técnico	Purificado
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	313,6	309,9
Porcentaje masa residual a 550 °C (%)	30,6	29,7
Área bajo la curva (%)	31,6	32,8
Grado acetilación (%)	54,8	50,8

Microsoft Word

#### 4.1.3. Masa molecular viscosimétrica

La determinación de la masa molecular del quitosano de langostino grado técnico y purificado, se obtuvo mediante la técnica viscosimétrica, estos valores se obtuvieron graficando la viscosidad reducida y la viscosidad inherente (calculadas a partir de las fórmulas 2 y 3), a partir del tiempo de desplazamiento de las soluciones de quitosano correspondientes de diferente concentración en un tubo capilar. Al analizar las gráficas de determinación de la masa molecular viscosimétrica obtenidas para cada uno de los quitosanos (anexo 3), se obtiene una recta de mejor ajuste, que presenta una intersección con el eje y, el cual corresponde a la viscosidad intrínseca; a partir de la cual se obtuvo un valor promedio de 3,7 para el quitosano grado técnico y 3,2 para el purificado. La viscosidad intrínseca se relaciona con la masa molecular mediante la ecuación de Mark-Houwink (fórmula 4, Muzzarelli y Peter, 1997), donde se obtuvo un mayor valor de masa molecular para el quitosano grado técnico de 164 616, no obstante para el quitosano purificado se obtuvo un valor de 138 146.

#### 4.2. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO

Los resultados obtenidos de la caracterización que se llevó a cabo en los hidrogeles de quitosano, muestran el cambio físico y químico que sufre el quitosano al encontrarse entrecruzado con agentes químicos.

#### 4.2.1. Características físicas de los hidrogeles

Cuando se llevó a cabo el entrecruzamiento de los hidrogeles de quitosano, se observó un cambio en las características físicas a nivel de superficie, color y comportamiento en presencia de agua; cada una de estas características varía conforme el grado de entrecruzamiento (tabla 7).

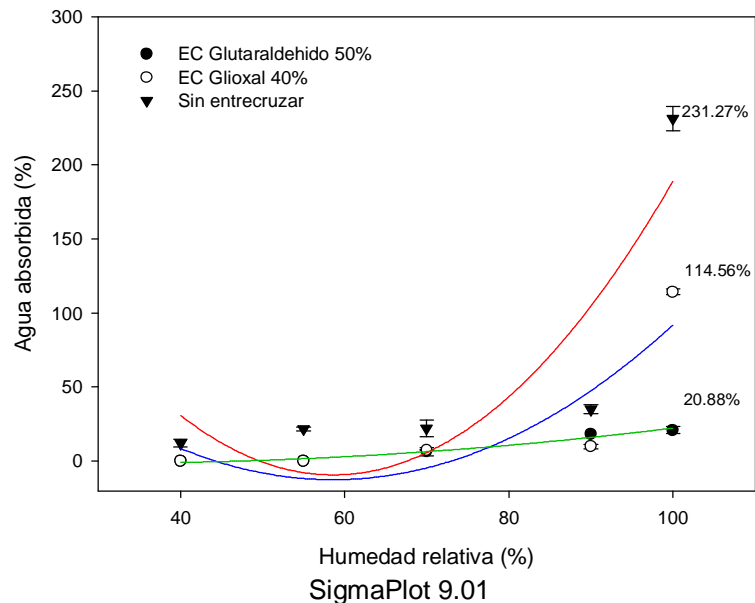
**Tabla 7.** Características físicas de los hidrogeles de quitosano de langostino con concentraciones al 1 y 3%.

Agente entrecruzante	Color	Características superficiales	Comportamiento en humedades relativas
Sin agente		Presenta cierta elasticidad y una superficie muy lisa y regular	Su superficie absorbe mucha agua con lo que se vuelve irregular
Glutaraldehido 50%	Café oscuro opaco	Muy rígido y con una superficie irregular y rugosa cuando se encuentra seco, en algunos casos se enrolló sobre si mismo	Mantiene su superficie lisa y su forma en contacto con el agua, poca o nula presencia de agua en el hidrogel
Glioxal 40, 30, 20, 10 y 5%	Café claro y conforme disminuye la presencia de agente entrecruzante se aclara el color del hidrogel	Conforme disminuye la concentración de agente aumenta la rigidez y la rugosidad del hidrogel cuando se encuentra seco	Se observó presencia de agua sobre el hidrogel (pequeñas gotas), este efecto disminuyó conforme disminuye la concentración de agente

Microsoft Word

#### 4.2.2. Prueba de absorción de agua

Al colocar los hidrogeles en frascos con humedades relativas controladas se espera que absorban determinada cantidad de agua dependiendo de su estructura tridimensional y del grado de entrecruzamiento. Los hidrogeles de quitosano al 1% con agente entrecruzante y sin agente, en diferentes humedades relativas, presentan un porcentaje de agua absorbida relativamente bajo en las humedades del 40, 55, 70 y 90%; mientras que en la humedad del 100% los valores llegan a su máximo (figura 10).

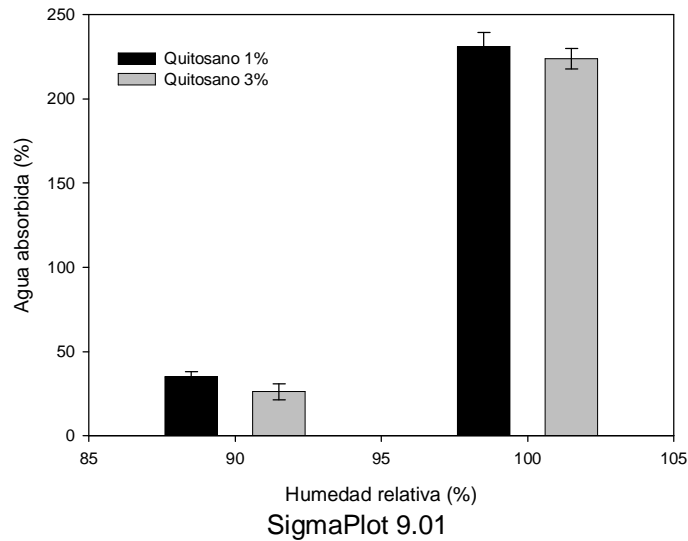


**Figura 10.** Absorción de agua de hidrogeles de quitosano al 1% sin entrecruzar y entrecruzados con glutaraldehido 50% y glioxal 40% en atmósferas con humedad relativa controlada.

En los hidrogeles de quitosano al 3% el porcentaje de agua absorbida debe ser mayor que en los hidrogeles de quitosano al 1%, pero la absorción en diferentes humedades relativas debe presentar curvas semejantes a las obtenidas anteriormente.

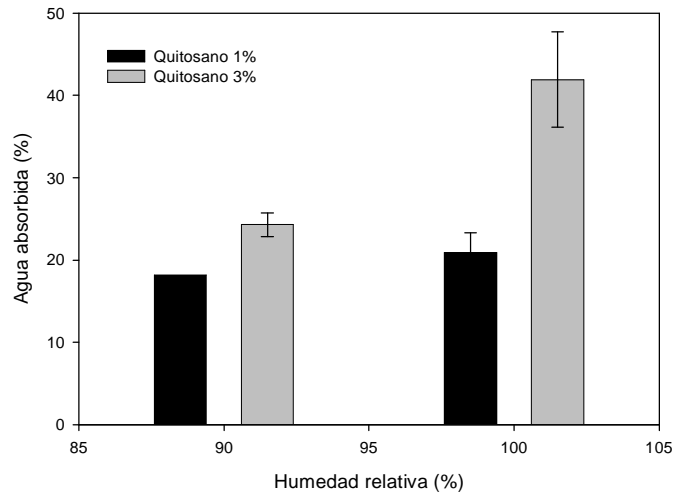
En cuanto a los hidrogeles sin entrecruzar se observa que en ambas concentraciones de quitosano en la humedad relativa del 90% existe diferencia significativa entre los porcentajes de absorción de agua ( $t_c$  2,37 para una  $P < 0,05$  con 4 grados de libertad), no así para la absorción de agua en la humedad del 100%. Sin embargo el hidrogel de quitosano al 1% tiende absorber más agua que el de 3%, a pesar de que ambos aumentan su masa en casi un 200% en la humedad relativa más alta (figura 11).





**Figura 11.** Absorción de agua de hidrogeles de quitosano sin entrecruzar en humedades relativas al 90 y 100%.

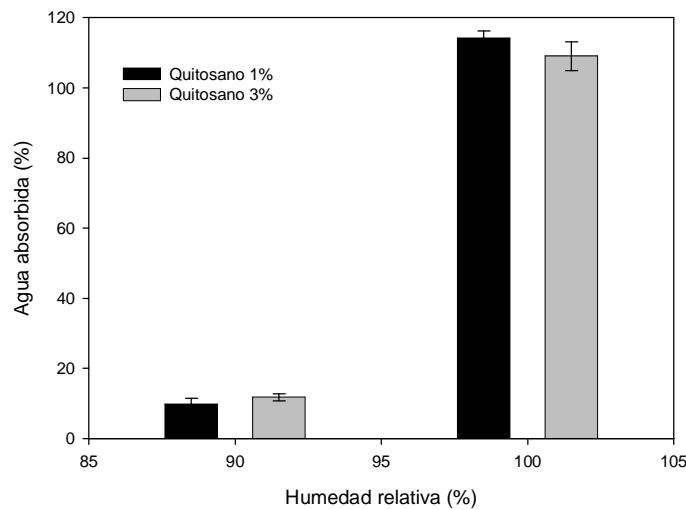
Con respecto de los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído al 50% entre ambas concentraciones de quitosano existe diferencia significativa para las dos humedades relativas analizadas ( $P < 0,05$  con 4 grados de libertad), además se observan diferencias en cuanto a la absorción de agua, siendo mayor la capacidad de absorber con la concentración de quitosano al 3% y la cual presenta el mayor cambio de absorción entre las dos humedades relativas analizadas (figura 12).



SigmaPlot 9.01

**Figura 12.** Absorción de agua de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glutaraldehído 50% en humedades relativas al 90 y 100%.

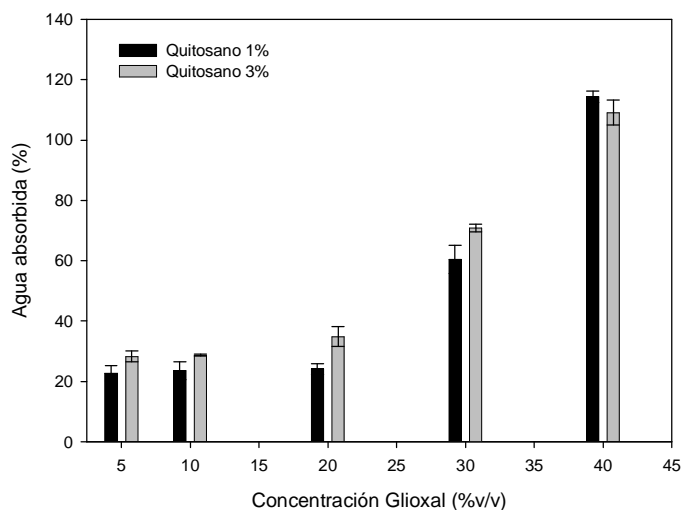
Por otra parte los resultados demuestran que los hidrogeles entrecruzados con glicoxal no evidencian diferencia alguna entre las concentraciones de quitosano analizadas para ambas humedades; sin embargo se observa un aumento en la masa de cerca del 110% para la humedad más alta (figura 13).



SigmaPlot 9.01

**Figura 13.** Absorción de agua de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glicoxal 40% en humedades relativas al 90 y 100%.

Además de los resultados mostrados anteriormente, se determinó el grado en que afecta el porcentaje o concentración del agente entrecruzante a las diferentes propiedades de los hidrogeles en estudio. Se observó que conforme disminuye la concentración de glioxal disminuye la capacidad de los hidrogeles de absorber agua; sin embargo en los hidrogeles entrecruzados con glioxal al 5 y 10% no existe diferencia significativa entre los porcentajes de absorción de agua para ambas concentraciones de quitosano, contrario a lo que ocurre con las concentraciones al 20 y 30% de glioxal (tc de 4,45 y 2,24 respectivamente con un valor de  $P < 0,05$  con 4 grados de libertad) (figura 14).



SigmaPlot 9.01

**Figura 14.** Absorción de agua de hidrogeles de quitosano entrecruzados con diferentes concentraciones de glioxal en una humedad relativa al 100%.

#### 4.2.3. Porcentaje de material soluble

En la determinación de la cantidad de quitosano al 1 y 3% que logró formar el enlace imina con el glutaraldehído o glioxal se obtuvo que el porcentaje de material soluble (fórmula 8) varía con respecto de la concentración del agente entrecruzante, así como de la concentración de quitosano. Se observa que al disminuir la concentración de glioxal, disminuye el porcentaje de material soluble de los hidrogeles entrecruzados, obteniéndose los valores más bajos con glioxal al 5 y 10% con un

3% de quitosano. Los hidrogeles de quitosano al 1 y 3% entrecruzados presentan un porcentaje de material soluble similar (tabla 8).

**Tabla 8.** Comparación del porcentaje de material soluble de los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído y glioxal

Concentración de quitosano	Agente entrecruzante	Porcentaje material soluble (% ± ES)
1%	Glutaraldehído 50%	7,9 ± 0,5
	Glioxal 40%	32,7 ± 0,4
	Glioxal 30%	28,6 ± 0,5
	Glioxal 20%	28,0 ± 0,5
	Glioxal 10%	2,9 ± 0,8
	Glioxal 5%	1,1 ± 0,5
3%	Glutaraldehído 50%	4,3 ± 0,3
	Glioxal 40%	34,7 ± 0,2
	Glioxal 30%	27,7 ± 0,2
	Glioxal 20%	26,9 ± 0,2
	Glioxal 10%	0,0 ± 0,0
	Glioxal 5%	0,0 ± 0,0

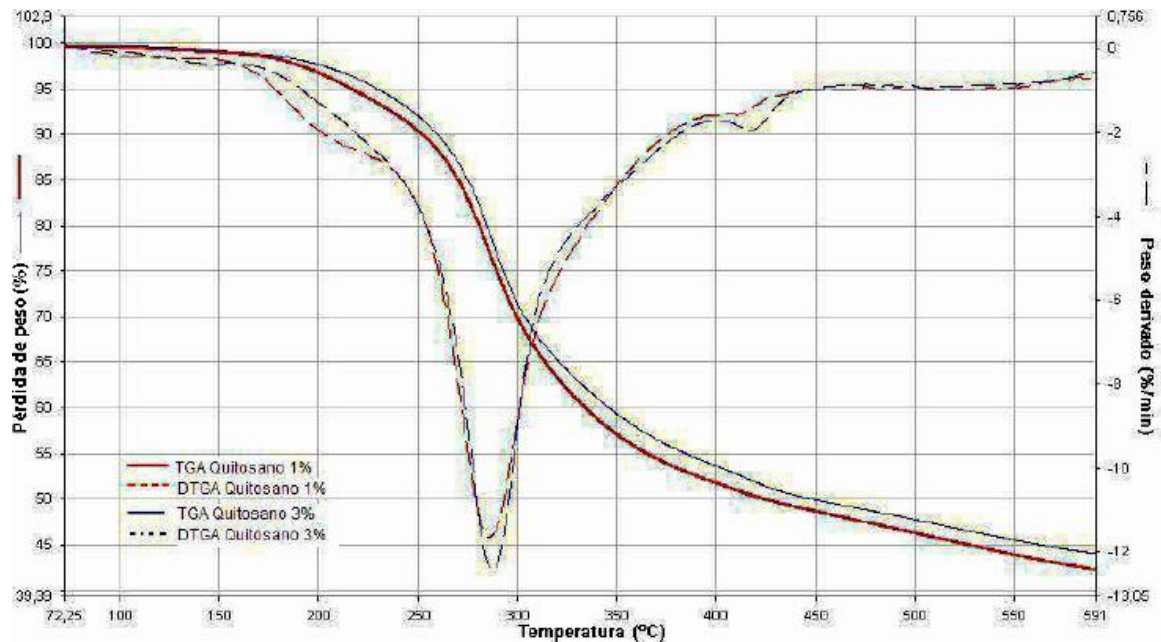
Microsoft Word

#### 4.2.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas obtenidos muestran las curvas de degradación térmica de los hidrogeles de quitosano de langostino al 1 y 3%, sin entrecruzar y entrecruzados con glutaraldehído y glioxal (anexo 2).

##### 4.2.3.1. Hidrogeles sin entrecruzar

En los hidrogeles de quitosano al 1 y 3% sin entrecruzar se presenta únicamente un proceso de degradación, además las curvas de pérdida de masa son idénticas entre sí, variando en cuanto a la temperatura inicial y de máxima velocidad de descomposición (figura 15).



Pyres Software

**Figura 15.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico sin entrecruzar en atmósfera de nitrógeno

Mediante el análisis de los termogramas y derivatogramas, se obtiene información útil acerca del comportamiento del quitosano al disolverse y secarse para obtener los hidrogeles; se observa una disminución en la temperatura de descomposición con respecto al quitosano de langostino grado técnico (en polvo) (tabla 9).

**Tabla 9.** Comparación de la temperatura inicial de descomposición, temperatura de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550 °C de hidrogeles de quitosano sin entrecruzar

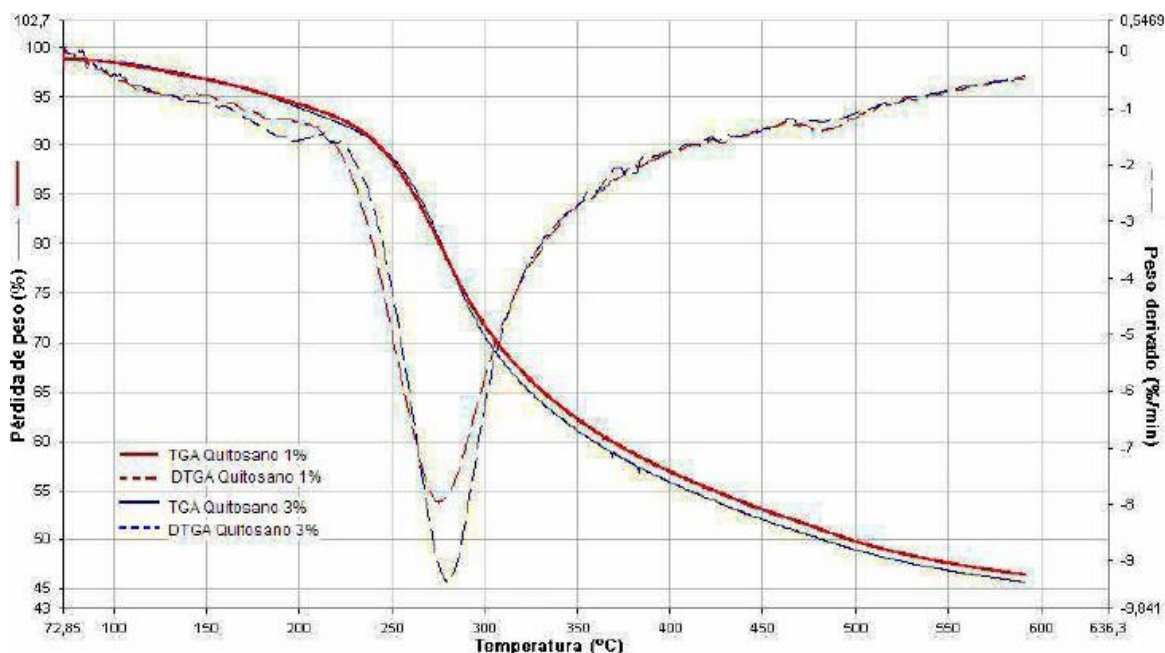
Parámetro	Muestra Qitosano		
	Polvo	1%	3%
Temperatura inicial de descomposición (°C)		236,6	241,8
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	313,6	285,7	287,5
Porcentaje masa residual a 550 °C (%)	30,6	56,1	54,4

Microsoft Word

### 4.2.3.2. Hidrogeles entrecruzados

#### Glutaraldehido

Las pruebas de caracterización de los hidrogeles de quitosano obtenidos por entrecruzamiento con glutaraldehido presentan un solo proceso de descomposición, en el cual se observa una similitud en las curvas de descomposición térmica (figura 16).



Pyres Software

**Figura 16.** Termogrrama (TGA) y derivatograma (DTGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico entrecruzado con glutaraldehido al 50% en atmósfera de nitrógeno

Los resultados obtenidos de los análisis llevados a cabo a cada uno de los termogramas, comparados con los datos de los hidrogeles sin entrecruzar muestra la disminución en la temperatura de máxima velocidad de descomposición (tabla 10); indican que la molécula de glutaraldehido afecta la estabilidad térmica del quitosano.

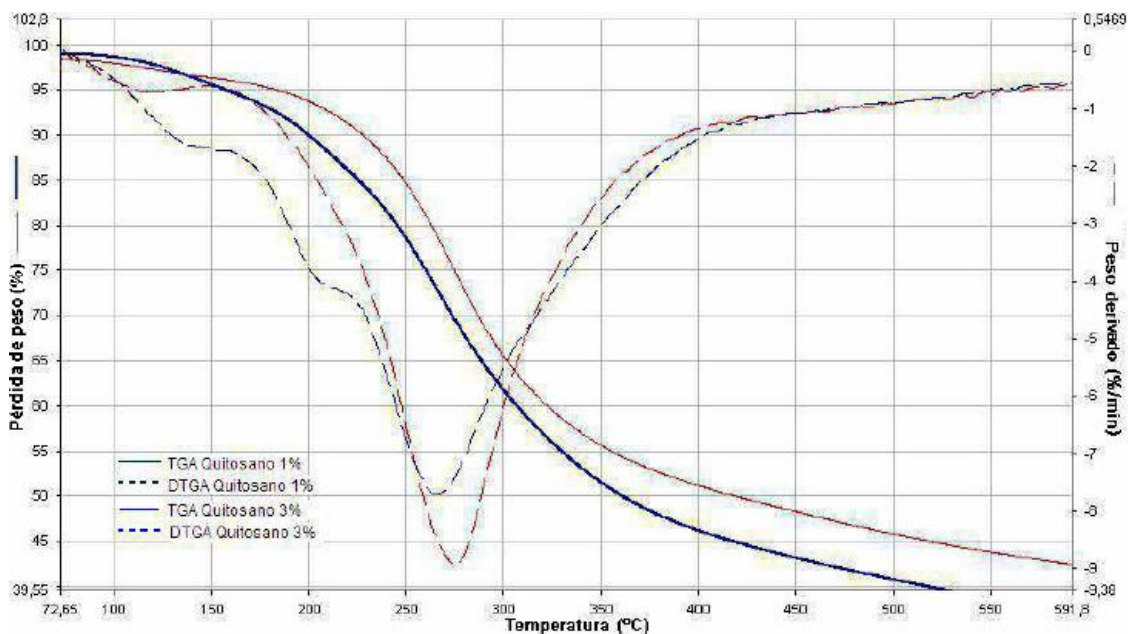
**Tabla 10.** Comparación de la temperatura inicial de descomposición, temperatura de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550 °C de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glutaraldehido al 50%

Parámetro	Quitosano 1%	Quitosano 3%
	Sin entrecruzar	
Temperatura inicial de descomposición (°C)	236,6	241,8
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	285,7	287,5
Porcentaje masa residual a 550 °C (%)	56,1	54,4
	Glutaraldehido 50%	
Temperatura inicial de descomposición (°C)	244,2	245,8
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	274,9	280,3
Porcentaje masa residual a 550 °C (%)	52,3	53,0

Microsoft Word

## Glioxal

Con respecto de los termogramas de los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 40%, en las concentraciones de quitosano al 1 y 3%; ambas presentan un solo proceso de descomposición y la forma de la curva presenta una tendencia de pérdida de masa similar, al igual que en los otros tipos de hidrogeles analizados hasta el momento (figura 17).



Pyres Software

**Figura 17.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico entrecruzado con glioxal al 40% en atmósfera de nitrógeno

Mediante el análisis de los termogramas se observa que disminuye en gran medida la temperatura de máxima velocidad de descomposición en ambos hidrogeles si se comparan con los que no se entrecruzaron (tabla 11), al igual que como ocurre con los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído.

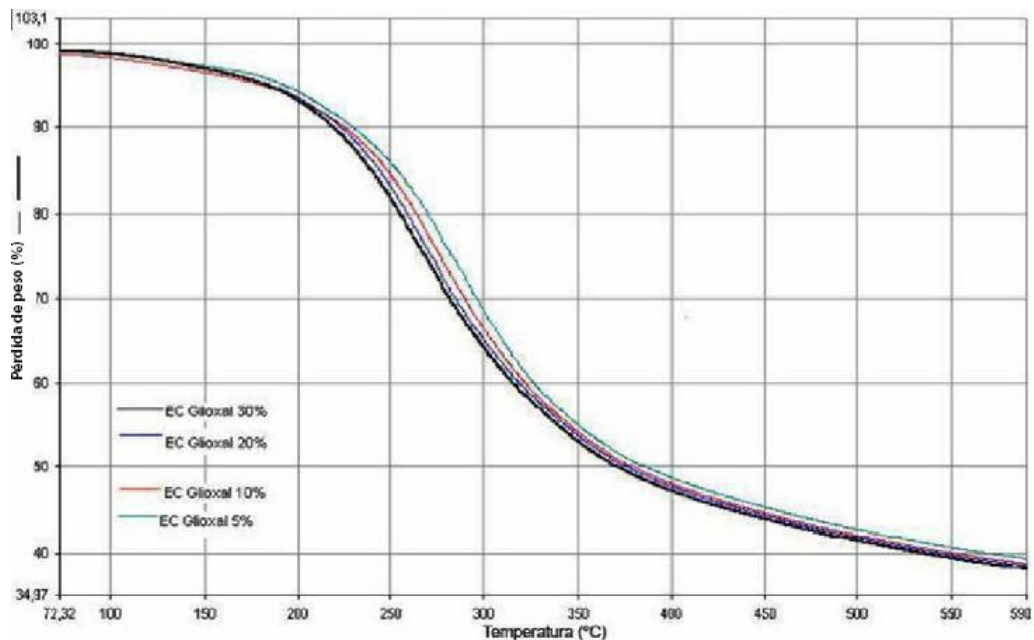
**Tabla 11.** Comparación de la temperatura inicial de descomposición, temperatura de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550 °C de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 40%

Parámetro	Quitosano 1%	Quitosano 3%
	Sin entrecruzar	
Temperatura inicial de descomposición (°C)	236,6	241,8
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	285,7	287,5
Porcentaje masa residual a 550 °C (%)	56,1	54,4
Glioxal 40%		
Temperatura inicial de descomposición (°C)	217,2	190,0
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	274,5	265,8
Porcentaje masa residual a 550 °C (%)	56,1	60,7

Microsoft Word

A continuación se muestran los termogramas de los hidrogeles de quitosano al 1% (figura 18) entrecruzados con diferentes concentraciones de glioxal, los cuales presentan un único proceso de descomposición.





Pyres Software

**Figura 18.** Termograma (TGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico al 1% entrecruzado con diferentes concentraciones de glioxal

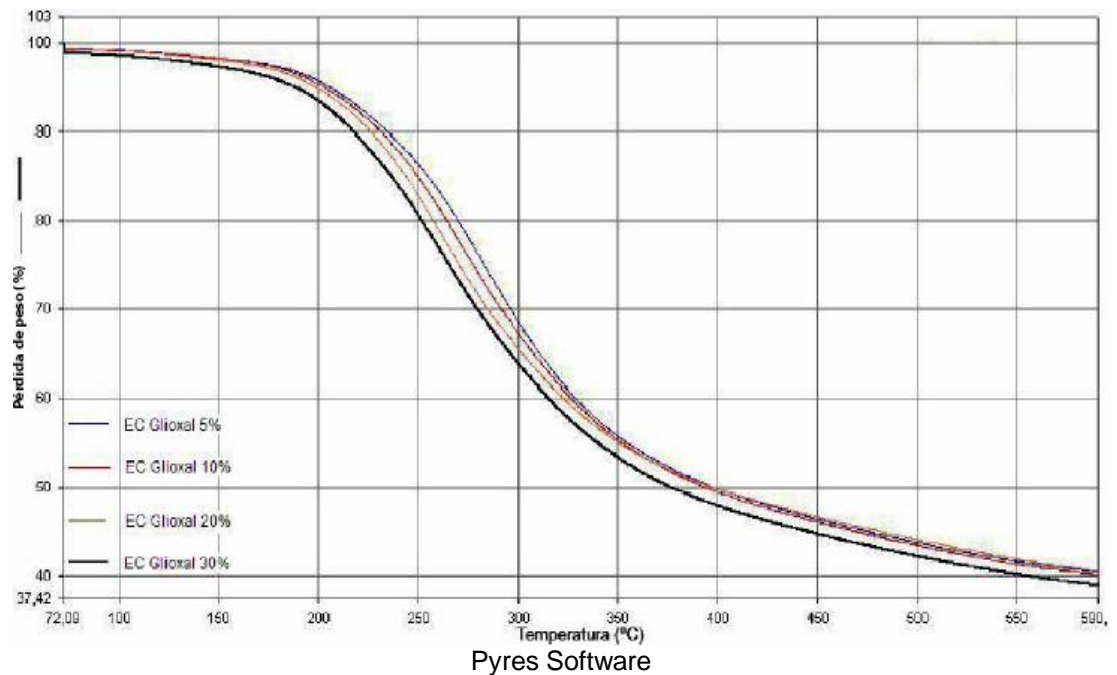
A partir del análisis de los termogramas se observa que conforme aumenta la concentración del glioxal disminuye la temperatura de máxima velocidad de descomposición y aumenta el porcentaje de masa remanente a 550 °C (tabla 12).

**Tabla 12.** Comparación de la temperatura inicial de descomposición, temperatura de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550 °C de hidrogeles de quitosano al 1% entrecruzados con diferentes concentraciones de glioxal

Parámetro	Concentración Glioxal (%v/v)				
	0%	5%	10%	20%	30%
TID (°C)	236,6	207,2	213,5	214,9	211,0
TMD (°C)	285,7	284,8	272,9	268,4	264,9
%MR (%)	56,1	59,3	59,9	60,2	60,4

Nota: TID (temperatura inicial de descomposición), TMD (temperatura de máxima velocidad de descomposición) y % MR (porcentaje de masa residual). Microsoft Word

Para los hidrogeles de quitosano al 3% entrecruzado con diferentes concentraciones de glioxal se observa un solo proceso de descomposición (figura 19).



**Figura 19.** Termograma (TGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico al 3% entrecruzado con diferentes concentraciones de glioxal

Los termogramas mostrados muestran la disminución de la temperatura de máxima velocidad conforme aumenta la concentración de agente entrecruzante, además se observa una caída en la temperatura inicial de descomposición con respecto del hidrogel de quitosano sin entrecruzar (tabla 13).

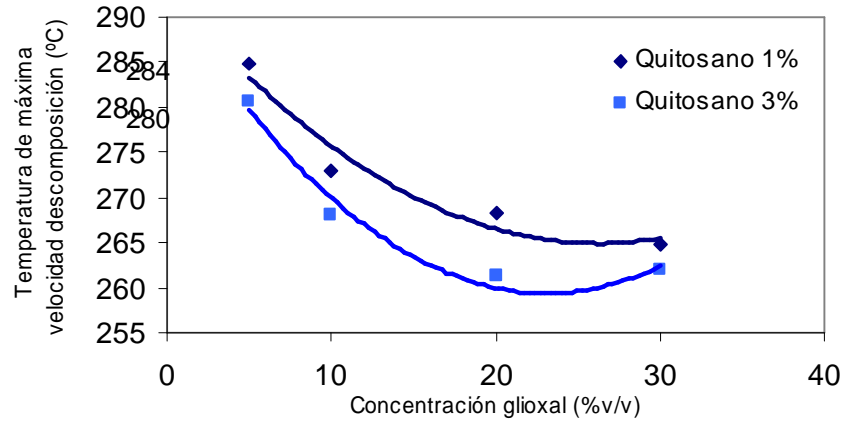
**Tabla 13.** Comparación de la temperatura inicial de descomposición, temperatura de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550 °C de hidrogeles de quitosano al 3% entrecruzado con diferentes concentraciones de glioxal

Parámetro	Concentración Glioxal (%v/v)				
	0%	5%	10%	20%	30%
TID (°C)	241,8	203,7	208,5	208,4	209,8
TMD (°C)	287,5	280,6	268,1	261,2	262,0
%MR	54,4	58,3	58,6	58,0	59,8

Nota: TID (temperatura inicial de descomposición), TMD (temperatura de máxima velocidad de descomposición) y % MR (porcentaje de masa residual). Microsoft Word

El efecto de la variación de la concentración de glioxal en la obtención de los hidrogeles, se determina mediante el comportamiento de la temperatura de máxima velocidad de descomposición para cada uno de los hidrogeles analizados. Se puede observar que conforme aumenta la concentración del agente entrecruzante

disminuye la temperatura de máxima velocidad de descomposición en los hidrogeles de quitosano al 1 y 3%; sin embargo el efecto es mayor en este último (figura 20).

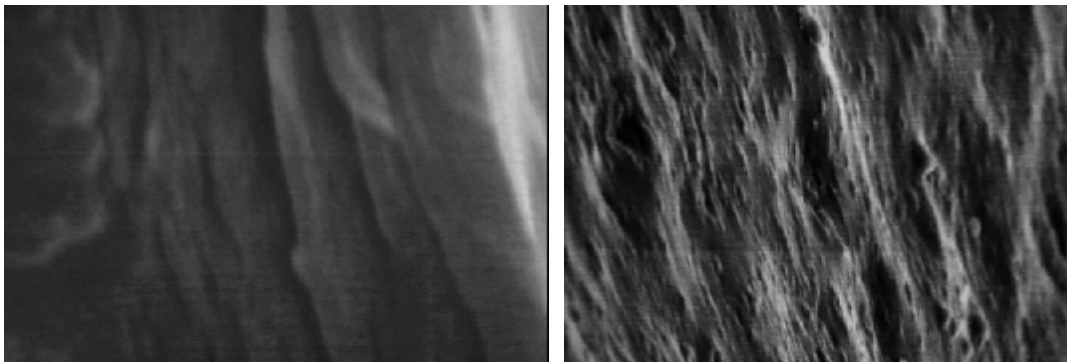


Microsoft Excel

**Figura 20.** Temperatura de máxima velocidad de descomposición de hidrogeles de quitosano entrecruzados con diferentes concentraciones de glicolal

#### 4.2.5. Microscopia electrónica

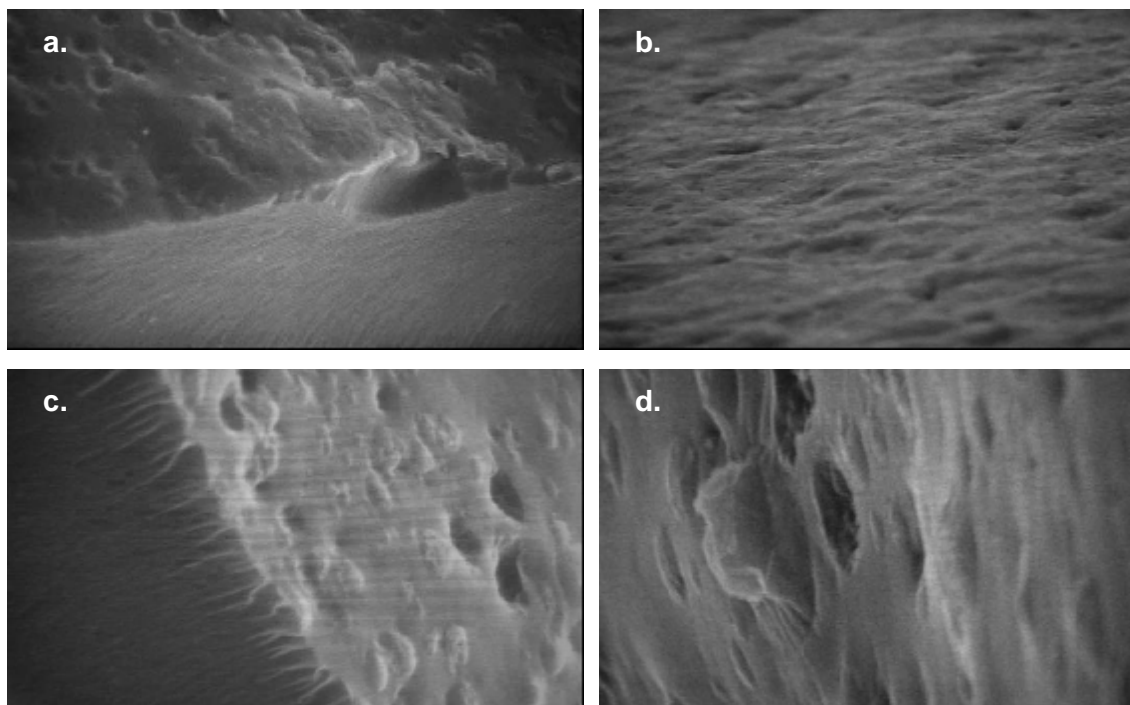
Mediante esta prueba se observó la porosidad y características microscópicas superficiales, en los hidrogeles de quitosano sin entrecruzar se observan capas superpuestas de quitosano en los bordes (figura 21.a), y la superficie no presenta una porosidad definida y es irregular (figura 21.b).



**Figura 21.** Fotos al microscopio electrónico de hidrogeles de quitosano al 1% sin entrecruzar tomadas a 2500X: a) vista lateral, b) vista superficial.

Sin embargo en los hidrogeles de quitosano se observa que las características superficiales cambian cuando se entrecruzan con agentes químicos, se observa un

borde liso y regular, producto del entrecruzamiento de las cadenas de quitosano (figura 22.a y 22.c); además se define una porosidad irregular que se encuentra en un ámbito de 1 a 10  $\mu\text{m}$  y una superficie más ordenada y lisa, con respecto de los hidrogeles de quitosano sin entrecruzar (figura 22).

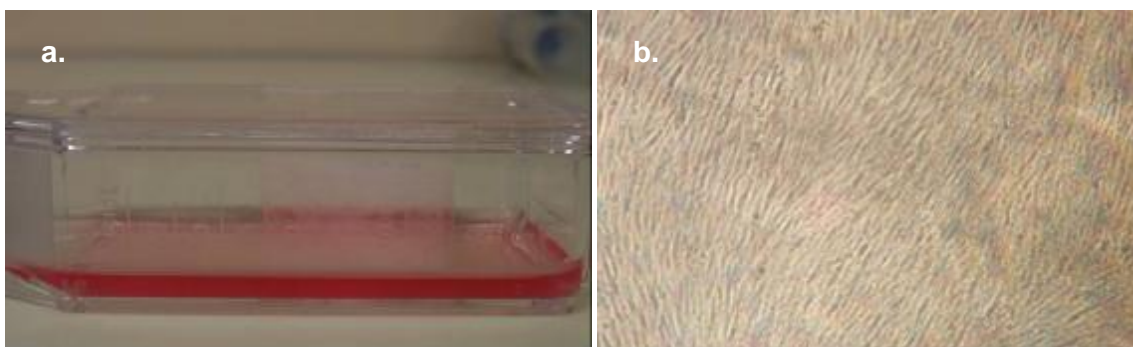


**Figura 22.** Fotos al microscopio electrónico de hidrogeles de quitosano al 1% entrecruzados tomadas a 2500X: a) glutaraldehído 50%, b) glioxal 40%, c) glioxal 30% y d) glioxal 10%.

### **4.3. CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

#### **4.3.1. Mantenimiento de fibroblastos humanos**

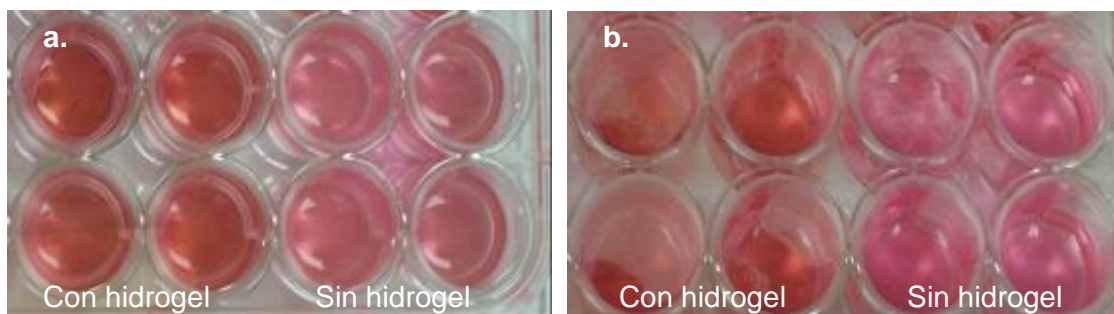
Para el mantenimiento de los fibroblastos humanos obtenidos a partir del tejido de biopsia cutánea, se subcultivaron con el fin de aumentar la cantidad para llevar a cabo las pruebas de crecimiento, de los 6 frascos de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  todos presentaron una confluencia celular del 100% en todo momento y los fibroblastos se encontraban alargados, entrelazados y muy aglutinados cubriendo toda la superficie del frasco (figura 23).



**Figura 23.** Crecimiento de fibroblastos humanos en medio de cultivo DMEM/HAM's F12 suplementado con glutamina, antibiótico y 10% de suero fetal bovino: a) frasco de cultivo 25 cm<sup>2</sup>, b) confluencia celular de fibroblastos humanos (aumento 10x).

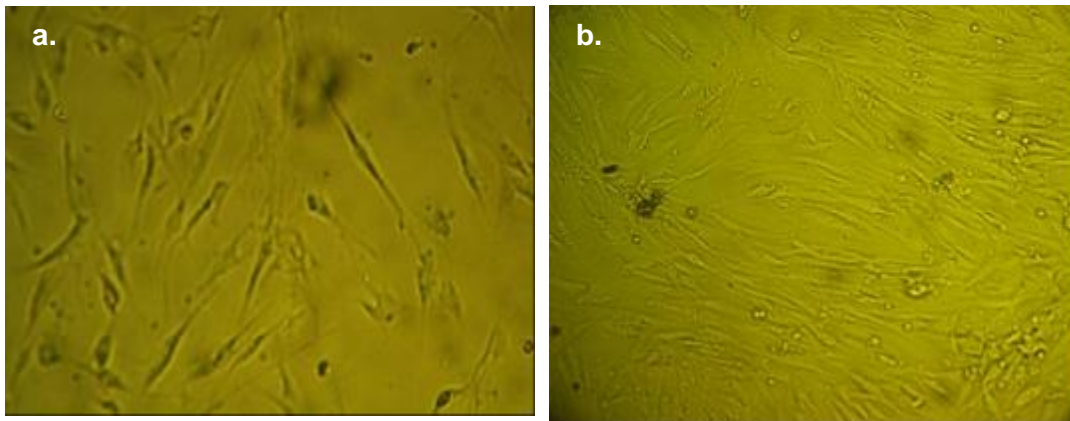
#### 4.3.2. Crecimiento en hidrogel de quitosano

Debido a que la placa de cultivo celular cuenta con 24 pozos, a 12 de los pozos se les colocó el hidrogel de quitosano entrecruzado con glioxal al 20%, y los otros 12 pozos restantes se utilizaron como controles positivos (sin hidrogel). Cuando se agregó el medio de cultivo conteniendo los fibroblastos a cada uno de los pozos, el color del medio se mantuvo rojo (figura 24.a), después de tres días de incubación el color pasó a ser rosado para ambos tratamientos analizados (figura 24.b).



**Figura 24.** Crecimiento en placa de cultivo celular de 24 pozos: a) inicio del crecimiento en placa con hidrogel y sin hidrogel, b) tiempo de incubación de 3 días.

Mediante la observación de los pozos de la placa de cultivo celular con el microscopio invertido, se determinó que los fibroblastos se adherieron al fondo después de un día de incubación a 37 °C (figura 25).



**Figura 25.** Fibroblastos en placa de cultivo celular de 24 pozos sin hidrogel de quitosano: a) tiempo de incubación de un día, b) tiempo de incubación de 3 días (aumento 10x).

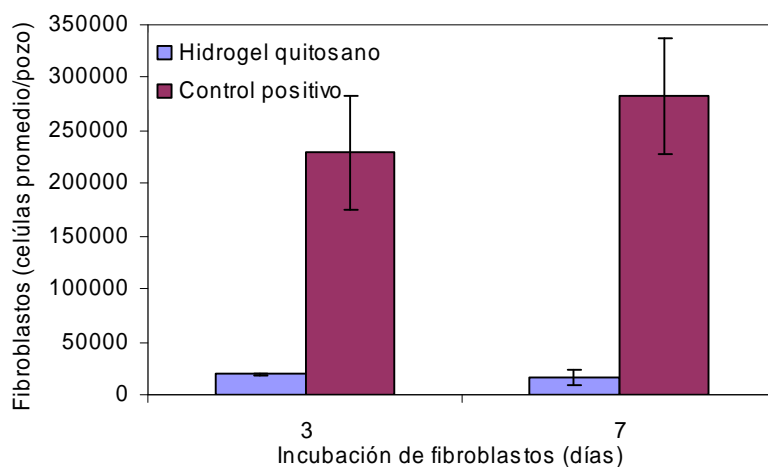
La confluencia celular se determinó únicamente para los pozos utilizados como controles, puesto que para los pozos que presentaban el soporte no fue posible observar los fibroblastos, debido a que el color del hidrogel resultó ser café claro lo que impidió el paso del rayo de luz en el microscopio invertido (tabla 14).

**Tabla 14.** Confluencia celular de los pozos utilizados como control positivo

Pozo	Tiempo de incubación (días)	
	3	7
1, 2, 3 y 4	60% de confluencia, los fibroblastos presentaron forma normal y alargada con una sola dirección	Todos los pozos presentaban un 100% de confluencia, con fibroblastos que abarcaron toda la superficie del pozo, se presentó aglutinación y entrelazamiento o superposición de fibroblastos
5 y 6	75% de confluencia, se observó fibroblastos largos	
7 y 8	80% de confluencia, con superposición de fibroblastos los cuales se tienden a aglutinar	
9, 10 y 11	85% de confluencia, con crecimiento desordenado y presencia de agregados celulares de la suspensión celular	
12	90% de confluencia, se observa una conformación de red y aglutinación de fibroblastos, con posible presencia de agregados celulares	

Microsoft Word

En la prueba proliferación celular de fibroblastos sobre hidrogel de quitosano entrecruzados con glioxal al 20% y sin hidrogel (controles positivos), se obtuvo una reducción en el número de células colocadas inicialmente para los pozos que presentaban hidrogel, con valores de  $1,9 \times 10^4$  y  $1,6 \times 10^4$  células/pozo para los tiempos de incubación a los 3 y 7 días respectivamente. Mientras que en los controles se observó un incremento en el número de células colocadas, con valores de  $2,3 \times 10^5$  y  $2,8 \times 10^5$  células/pozo respectivamente, en comparación con los hidrogel de quitosano (figura 26). En los pozos con hidrogel de quitosano y sin hidrogel existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos, con un valor de  $t_c$  de 3,85 y 4,58 para los tiempos de incubación a los 3 y 7 días respectivamente (con un probabilidad del 0,05 y con 10 grados de libertad).

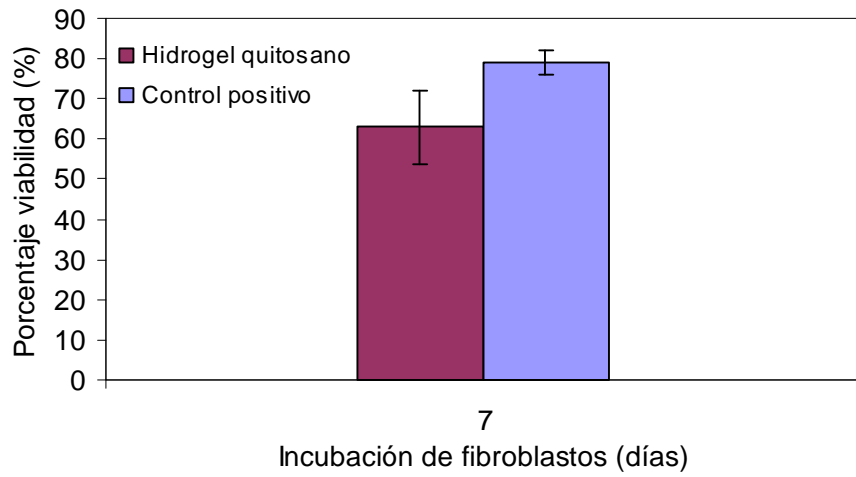


Microsoft Excel

**Figura 26.** Proliferación celular de fibroblastos humanos sobre hidrogel de quitosano entrecruzados con glioxal al 20% y sin hidrogel (control)

Con respecto de la prueba de viabilidad celular, se obtuvo un mayor porcentaje para las células crecidas sin hidrogel con un valor del 78,9% en comparación con las células crecidas sobre el quitosano con un 63,05% de viabilidad (figura 27), sin embargo no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos.





Microsoft Excel

**Figura 27.** Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos humanos a los 7 días de incubación sobre hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 20% y sin hidrogel (control)



## CAPITULO V: DISCUSIÓN

El quitosano obtenido a partir del camarón langostino *Pleuroncodes planipes*, permitió obtener hidrogeles de quitosano entrecruzados con agentes difuncionales que presentan características físicas y químicas acorde a lo expuesto por diferentes investigadores, sin embargo ciertos criterios requeridos para el crecimiento de células en soportes de quitosano no se cumplieron, con lo que se obtuvo una disminución en la cantidad de células colocadas inicialmente.

Debido a que el quitosano presenta propiedades sumamente importantes para la adherencia y proliferación celular se llevó a cabo una caracterización del quitosano utilizado como materia prima. Mediante las pruebas de solubilidad, grado de acetilación y masa molecular viscosimétrica, llevadas a cabo para el quitosano de langostino grado técnico y purificado, se puede observar que la diferencia entre los resultados obtenidos para cada una de estas pruebas depende del grado de purificación que presentan ambos materiales.

En el caso de la prueba de solubilidad, existe una pequeña diferencia en cuanto al porcentaje obtenido, siendo mayor el valor para el quitosano de langostino purificado; debido a la eliminación de impurezas, que permita obtener soluciones de quitosano de concentración exacta. Sin embargo según Singh y Ray (2000) la solubilidad del quitosano se encuentra relacionada a la cantidad de grupos amino protonados de la cadena polimérica; en cuanto mayor sea la cantidad de estos grupos mayor la solubilidad del polímero, aspecto que se encuentra relacionado al grado de desacetilación del quitosano, el cual es mayor para el quitosano purificado lo que evidencia el aumento en la solubilidad.

A pesar de que el quitosano resulta ser un polisacárido de cadena lineal, presenta variabilidad en el tamaño de las cadenas como en el grado de acetilación de cada una (Gerasimenko *et al.*, 2004), aspecto que influencia la solubilidad en medio ácido. Si se da el efecto de enredo de cadenas de quitosano, la protonación de los grupos

aminos no se da por completo debido a la poca interacción que pueden presentar los grupos amino interiores con el ácido presente en el medio.

La termodegradación del quitosano permite determinar el grado de acetilación, para ambos quitosanos se observa una pérdida de humedad cerca de los 80 °C, para luego presentar una pérdida de masa, la cual corresponde a procesos de depolimerización y descomposición de los diferentes grupos acetilo y amino del quitosano; esto concuerda con lo expuesto por Peniche *et al.* (1993). Con base en el área de la derivada (DTGA) de la curva de pérdida de masa de cada quitosano se determinó una disminución del grado de acetilación del quitosano purificado, debido al procesamiento llevado a cabo para eliminar las impurezas del quitosano de langostino grado técnico, las cuales tienden a retrasar el proceso de descomposición térmica del quitosano.

Según Santos *et al.* (1983) el grado de acetilación afecta la estabilidad térmica del quitosano, lo cual se observó en los termogramas analizados para los quitosanos grado técnico y purificado, debido a que disminuyó la temperatura de máxima velocidad de descomposición para el quitosano purificado; a pesar de que la diferencia entre ambas temperaturas de descomposición no sea significativa se evidencia que existe relación entre el grado de acetilación y la estabilidad térmica. Lo expuesto anteriormente concuerda con lo propuesto por García *et al.* (1983) en donde la degradación térmica del quitosano se vuelve menos estable conforme aumenta el grado de desacetilación, debido a que existe mayor presencia de grupos amino, indicando que la descomposición es más rápida para los grupos amino que los acetilo.

Con respecto de la masa molecular viscosimétrica se obtuvo una disminución para el quitosano de langostino purificado, debido a que la presencia de impurezas presentes en el quitosano grado técnico afectan la velocidad de caída de la solución a través del capilar, aumentando el tiempo y por ende la viscosidad intrínseca de la

solución, además de que el procesamiento al que se somete el quitosano para purificarlo pudo degradar las cadenas poliméricas del quitosano disminuyendo su viscosidad y por ende su masa molecular.

## **5.1. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO**

### **5.1.1. Absorción de agua y porcentaje de material soluble**

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales que tienden hincharse en presencia de agua o fluidos biológicos, por lo que se llevó a cabo un entrecruzamiento de las cadenas poliméricas del quitosano con dos agentes químicos difuncionales, el glutaraldehído y el glioxal. Los porcentajes de absorción de agua de los hidrogeles sin entrecruzar en diferentes humedades relativas resultaron ser mayores que en los hidrogeles entrecruzados con ambos agentes, esto se debe a que un hidrogel sin entrecruzar presenta la capacidad de formar enlaces con el agua mediante los grupos hidrofílicos, para posteriormente exponer los grupos hidrofóbicos; brindándole la capacidad de interactuar debido a una fuerza osmótica producida por las cadenas de quitosano que conforman la red tridimensional, lo cual concuerda con lo expuesto por Kashyap *et al.* (2005) y Berger *et al.* (2004); sin embargo cuando los hidrogeles se entrecruzan, se impide la absorción de agua, debido a la presencia de una fuerza elástica de retracción de las cadenas poliméricas, lo que evidencia la disminución en la capacidad de absorción de agua.

Debido a las diferencias que presentan los hidrogeles sin entrecruzar con los hidrogeles entrecruzados en cuanto a los porcentajes de absorción de agua, se pudo comprobar que los agentes entrecruzantes afectan las propiedades físicas y químicas de los hidrogeles. Sin embargo las propiedades dependen del grado de entrecruzamiento, del cual se pudo tener una idea mediante el porcentaje de material soluble; debido a que indica cuanta cantidad del hidrogel no se encuentra entrecruzado o no logró formar enlaces covalentes (enlace imina) con las cadenas de quitosano. Gonçalves *et al.* (2005) menciona que el grado de entrecruzamiento influencia las propiedades de resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, y se

encuentra influenciada por la concentración del agente entrecruzante, peso molecular, grado de desacetilación del quitosano y temperatura.

Según Swami (2004) si se aumenta el grado de entrecruzamiento disminuye la capacidad de hinchamiento y la difusión, debido a que se favorece la estabilidad de la red tridimensional. Esto se logró determinar en los hidrogeles de quitosano entrecruzados con diferentes concentraciones de glioxal, los cuales conforme disminuye la concentración de glioxal presentan menor porcentaje de material soluble, lo que indica que se encuentra más entrecruzado y por ende debe absorber menos agua.

Sin embargo en los hidrogeles de quitosano al 3% entrecruzado con glutaraldehído y glioxal, los porcentajes de material soluble resultaron ser más bajos que para los hidrogeles de quitosano al 1% indicando que se encuentran más entrecruzados, pero en la mayoría de los casos los porcentajes de absorción de agua resultaron ser mayores, debido a la presencia de una mayor cantidad de poros en el hidrogel de quitosano al 3%; ya que según Kashyap *et al.* (2005) la capacidad de absorber agua por parte del hidrogel corresponde al tamaño, distribución e interconectividad de los poros; con lo que existen más intersticios por donde el agua presente en el medio pueda interaccionar o acumularse.

Otro factor que puede influir en la absorción de agua de los hidrogeles de quitosano al 3%, corresponde a que el glutaraldehído presenta tres posibles vías de comportamiento cuando se está llevando a cabo el entrecruzamiento y el glioxal presenta dos vías, según lo expuesto por Silva *et al.* (2004). Es posible que ocurra la formación de una base de Schiff por reacción de un grupo aldehído con la amina primaria de una cadena de quitosano, y que el otro grupo aldehído del glutaraldehído o glioxal no reaccione, obteniendo un quitosano sustituido pero no entrecruzado. Otra posibilidad es que se lleve a cabo entrecruzamiento de dos cadenas de quitosano con una cadena de glutaraldehído o glioxal formando dos bases de Schiff;

y la otra posible vía corresponde a que ocurra polimerización del glutaraldehído (unión de dos moléculas) y por ende entrecruzamiento con un alargamiento del nudo de unión entre dos cadenas de quitosano.

Se debe de tomar en cuenta que el método por medio del cual se entrecruza la solución de quitosano afecta sus propiedades. Resultados obtenidos por Esquivel (2005) llevando a cabo entrecruzamiento con glutaraldehído por medio de reacción homogénea en medio ácido para quitosano de langostino, obtuvo valores de absorción de agua en hidrogeles entrecruzados con relaciones molares de 1 y 2 mayores que en los hidrogeles sin entrecruzar; contrario a los resultados obtenidos en esta investigación y a lo expuesto por Kashyap *et al.* (2005) y Berger *et al.* (2004). Por el contrario los porcentajes de absorción de agua de los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal presentan valores bajos comparados con los obtenidos en esta investigación y si cumplen con lo expuesto por los investigadores mencionados anteriormente.

Esto evidencia la influencia del método de entrecruzamiento de obtención de hidrogeles en las características del mismo, para este caso al darse entrecruzamiento por inmersión del hidrogel sin entrecruzar en la solución de glutaraldehído [CHO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO] y glioxal [CHO-CHO], se permite la difusión de la molécula a través de las capas de quitosano y por ende poder reaccionar y formar las bases de Schiff, obteniendo los hidrogeles entrecruzados. Sin embargo se podría inferir que el entrecruzamiento obtenido en la presente investigación resulta ser más superficial que si se lleva a cabo por reacción en medio homogéneo ácido; puesto que se está permitiendo que el agente entrecruzante penetre por la matriz del quitosano y entrecruce las cadenas (Rohindra *et al.*, 2005).

### **5.1.2. Análisis termogravimétrico**

Debido a que el análisis termogravimétrico determina el efecto en la estabilidad térmica del quitosano al encontrarse entrecruzado, se procedió analizar todas las muestras de hidrogeles, tanto entrecruzados como sin entrecruzar. Para todos los hidrogeles analizados se presentó un solo proceso de descomposición y una disminución en la temperatura de máxima velocidad de descomposición, para el caso de los hidrogeles sin entrecruzar la disminución en la temperatura de descomposición indica que la protonación de los grupos amino para disolver el quitosano y su posterior secado, afecta la estabilidad térmica del polisacárido.

En cuanto a los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído y glioxal, la introducción de un agente entrecruzante de peso molecular pequeño afectó la estabilidad térmica del hidrogel, debido que los valores de temperatura de máxima velocidad de descomposición disminuyeron más con respecto de los hidrogeles sin entrecruzar. Si estos resultados se comparan con el porcentaje de material soluble de los hidrogeles entrecruzados, se observa que la temperatura de máxima velocidad de descomposición concuerda con el grado de entrecruzamiento, ya que entre menor sea el porcentaje de material soluble mayor será la estabilidad térmica del hidrogel puesto que pierden menos material conforme aumenta la temperatura.

En la literatura se ha planteado que en polímeros entrecruzados, conforme se aumenta la temperatura tiende a incrementarse el movimiento molecular, hasta cierta temperatura en la cual las moléculas del polímero se degraden (Vega, 1996). Por lo que entre más entrecruzado se encuentre un hidrogel de quitosano se necesita de una temperatura alta como para producir el movimiento molecular, que conlleve a que las cadenas de quitosano se degraden o descompongan. Esto se determinó con los hidrogeles de quitosano entrecruzados con diferentes concentraciones de glioxal, puesto que entre más baja es la concentración de glioxal más alto es el valor de la temperatura de máxima velocidad de descomposición, debido a que conforme

disminuye la cantidad de agente entrecruzante aumenta el grado de entrecruzamiento.

Es importante mencionar que el método por el cual se obtienen los hidrogeles afecta el comportamiento térmico; resultados obtenidos por Esquivel (2005) muestran que los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído por medio de reacción en medio homogéneo, presentan dos procesos de descomposición bien definidos; mientras que los hidrogeles obtenidos a mayor relación de glioxal presentan una temperatura de máxima velocidad de descomposición mayor, a diferencia de los resultados obtenidos en la presente investigación.

Es importante aclarar que en ambas concentraciones de quitosano los hidrogeles sin entrecruzar son más estables térmicamente que todas las muestras de hidrogeles entrecruzados; pero se determinó que dependiendo del grado de entrecruzamiento de los hidrogeles así será la estabilidad térmica.

## **5.2. HIDROGEL DE QUITOSANO**

Con base en los resultados obtenidos y analizados en el apartado 5.1, el hidrogel que se utilizó para llevar a cabo el crecimiento de fibroblastos humanos corresponde al hidrogel de quitosano de langostino purificado al 3% entrecruzado con glioxal al 20%. Un parámetro que influyó en la escogencia del hidrogel corresponde al color, lo ideal es que el soporte permita determinar la confluencia celular, para tal efecto este debería ser transparente para observar el comportamiento de las células sobre el mismo; este parámetro influyó en que se escogiera el hidrogel entrecruzado con glioxal en vez del glutaraldehído, debido a que este último presenta un color café oscuro el cual impediría el paso de la luz para observar las células al microscopio invertido.

El grado de entrecruzamiento al influir en las características o comportamiento del hidrogel en presencia de medio de cultivo, favoreció la escogencia del hidrogel de quitosano entrecruzado con glioxal al 20%; debido a que este presenta un porcentaje de material soluble alto en comparación con el hidrogel entrecruzado con glutaraldehído en el cual la pérdida de masa es muy baja o sea se encuentra muy entrecruzado, al encontrarse más entrecruzado sus características se alteraran menos en presencia de medio de cultivo debido a que se favorece la estabilidad de la red tridimensional (Swami, 2004). A pesar de que los hidrogeles entrecruzados tanto con glutaraldehído como con glioxal presentan una porosidad entre 1 a 10  $\mu\text{m}$ ; la capacidad de hinchamiento y de formar una red tridimensional más amplia en presencia de medios líquidos será mayor para los hidrogeles entrecruzados con glioxal, esto permite que exista una mayor interacción del hidrogel con los fibroblastos, a pesar de que no se cuenta con la cantidad y la interconectividad que presentan los poros en el interior del hidrogel.

Con respecto de los hidrogeles obtenidos con concentraciones de glioxal del 5% y 10%, se observó que cuando ocurre el entrecruzamiento al haber mayor cantidad de agua en la solución, el hidrogel se hidrata primero y luego entrecruza, con lo que se obtiene hidrogeles con superficies muy irregulares, contrario a lo que ocurre con los hidrogeles obtenidos con concentraciones de glioxal al 20%, 30% y 40% v/v. Además el porcentaje de material soluble o grado de entrecruzamiento de los hidrogeles es variable, para el caso de las concentraciones al 5 y 10%, se obtuvo porcentajes de pérdida de masa bajos lo que indica que se encuentran más entrecruzados; esto se debe a que al haber menor cantidad de agente entrecruzante se favorece el entrecruzamiento debido a que el glioxal puede penetrar más fácilmente por la red tridimensional de quitosano y por ende entrecruzar las cadenas. Debido al grado de entrecruzamiento de los hidrogeles obtenidos con concentraciones de glioxal del 20% v/v de glioxal estos presentan mayor capacidad de interaccionar con el medio de cultivo y de variar sus características hasta el punto que la red tridimensional lo permita (Berger *et al.* 2004).



Otro factor que influyó en la escogencia del hidrogel de quitosano entrecruzado con glioxal al 20%, es que actualmente en la investigación en ingeniería de tejidos únicamente se han utilizado hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído, por lo que se determinó la efectividad del glioxal tanto como agente entrecruzante de hidrogeles de quitosano por medio de una técnica diferente (inmersión) así como la influencia en el crecimiento de fibroblastos humanos.

### **5.3. CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

#### **5.3.1. Mantenimiento de fibroblastos humanos**

Se utilizó un medio de cultivo que cumpliera con las exigencias nutritivas de los fibroblastos, el medio DMEM/HAM's F12 ha sido utilizado para crecimiento de células embriogénicas, adipositos y queratinocitos entre otros (Davis, 2002), indicando que es un medio de cultivo que satisface las demandas nutritivas de diferentes tipos celulares. El medio cumple un papel de suma importancia en el cultivo de células, debido a que provee un pH y un ambiente esencial para la supervivencia celular y multiplicación, además de proveer sustancias químicas complejas requeridas por las células las cuales no pueden ser sintetizadas (Davis, 2002). Aparte de la composición nutritiva del medio basal (DMEM/HAM's F12) por lo general se le agregan suplementos que satisfacen requerimientos celulares más complejos y permiten el crecimiento en el medio.

Uno de estos suplementos corresponde al suero fetal bovino, el cual es una combinación de factores de crecimiento requeridos por las células para su óptimo mantenimiento, además de actuar como un sistema buffer evitando perturbaciones por efectos tóxicos, cambios de pH y actividad proteolítica entre otros (Pollard y Walker, 2000). Otro suplemento adicionado al medio de cultivo corresponde a la glutamina, la cual cumple con dos funciones sumamente importantes; como fuente de energía y como donador de grupos amino para la síntesis de ácidos nucleicos y otros componentes. El medio basal con los suplementos permitió que los

fibroblastos mantenidos en los frascos de cultivo presentaran un crecimiento normal y óptimo para las pruebas sobre los hidrogeles de quitosano; en la mayoría de los casos a la hora de subcultivar un frasco, este presentaba a los 7 días de incubación un 100% de confluencia, lo que indica que el medio de cultivo cumplió con los requerimientos específicos para este tipo de células, además de que las células cultivadas presentaban una tasa de crecimiento sumamente alto, y en ciertos casos se observó formación de agregados celulares en forma de montículos.

### **5.3.2. Crecimiento en hidrogeles de quitosano**

En los pozos utilizados como controles se observó que los fibroblastos al día de incubados se encontraban adheridos, esto se debe a que los fibroblastos producen y liberan colágeno tipo I, el cual es característico del tejido conectivo; esto les permite empezar con el proceso de división celular para incrementar el número de células colocadas inicialmente en cada pozo, hasta lograr un crecimiento máximo que se refleja en un 100% de confluencia. Una vez que las células han establecido su matriz extracelular, la proliferación celular toma lugar para empezar el crecimiento exponencial en los sustratos utilizados, estos resultados concuerdan con estudios previos llevados a cabo por Gutshe *et al.* (1994) que indican que después de 24 horas de cultivo, los fibroblastos han producido suficientes proteínas de la matriz extracelular para continuar el crecimiento.

Los datos obtenidos de proliferación celular del crecimiento de fibroblastos humanos sobre hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 20%, resultaron ser bajos comparados con los obtenidos por Katalinich (1997), en el cual se fabricó un soporte de quitosano en dos dimensiones por medio de la técnica de evaporación de solvente, utilizando tres concentraciones de quitosano diferentes y las cuales favorecieron el crecimiento de la línea de fibroblastos NIH-3T3, a pesar de que los valores obtenidos resultaron menores que el crecimiento en los controles (sin soporte). Si se comparan los resultados de proliferación obtenidos por Katalinich, se observa que para las concentraciones de quitosano de 0.5, 1.5 y 3%, a los cuatro

días de incubación el número de células aumentó con respecto del inoculado inicialmente, evidenciando que el soporte de quitosano no resultó tóxico, contrario a lo obtenido en esta investigación en la que a los 7 días de incubación la cantidad de células disminuyó notablemente con respecto de la cantidad de células inoculadas inicialmente.

La disminución obtenida en la cantidad de fibroblastos colocados inicialmente, se puede deber en parte a la posible toxicidad del hidrogel; sin embargo no se puede hacer mucha referencia a esta toxicidad puesto que no se tiene certeza del efecto del hidrogel sobre los fibroblastos, con lo que se mencionaran ciertos criterios que pudieron afectar el aumento en el número de células colocadas inicialmente.

En el caso del hidrogel de quitosano este cumple con ciertos criterios para la utilización en ingeniería de tejidos, pero hay ciertos aspectos que no satisface con base en los resultados obtenidos. Un criterio que debe cumplir el hidrogel es que la superficie sea heterogénea y porosa (Roh y Kwon, 2002), aspecto necesario para la adecuada proliferación de células debido a que los poros permiten que las células vivas se acomoden o adhieran adecuadamente para la consiguiente proliferación. Sin embargo como menciona Tan *et al.* (2001) los soportes utilizados en ingeniería de tejidos deben presentar poros con dimensiones mayores a las 10  $\mu\text{m}$  para permitir la adecuada migración e interacción celular; sin que exista interferencia con la difusión de nutrientes, hormonas o metabolitos dentro de la matriz para proveer nutrimento y así iniciar la respuesta celular.

La porosidad determinada por medio de microscopía electrónica para el hidrogel de quitosano entrecruzado corresponde a un ámbito entre 1 a 10  $\mu\text{m}$ , esto no cumple lo propuesto por Tan *et al.* (2001), aspecto que puede influir grandemente en los resultados de proliferación celular, puesto que se puede ver afectado la permeabilidad macromolecular así como la adecuada difusión de nutrientes, metabolitos y factores de crecimiento; debido a que el espacio entre cadenas de

quitosano resulta ser sumamente pequeño con lo que fácilmente se pueden ocluir los poros, impidiendo un adecuado intercambio entre el medio de cultivo y las células adheridas.

Los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* que utilizan cultivos celulares sobre quitosano (o conjugados) han demostrado su excelente citocompatibilidad, las células se adhieren fuertemente y proliferan adecuadamente (Abram, 2004; Wang y Hon, 2003). Numerosos estudios han demostrado que la adhesión y proliferación celular en membranas de quitosano se ve afectada por la estructura química, la superficie hidrofílica e hidrofóbica, carga eléctrica, superficie áspera, microheterogeneidad y flexibilidad. Los resultados de proliferación celular se deben al cambio en la estructura química del quitosano, debido a que se están entrecruzando cadenas por medio de sus grupos amino libres lo que afecta el carácter catiónico. El carácter catiónico le permite mantener una carga positiva a pH ácido, por ello puede interactuar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas, combinando interacciones específicas tipo GAG con otras inespecíficas asociadas a su carga, favoreciendo la adhesión celular y por ende la proliferación. Sin embargo al llevar a cabo el entrecruzamiento el carácter catiónico se pierde con lo que se disminuye la capacidad de interactuar con las superficies celulares, por ende disminuye la propiedad del quitosano de presentar una mayor compatibilidad con los fibroblastos humanos.

Según Cheng *et al.* (2003) y Dhanikula y Panchagnula (2004) muchas de las aplicaciones que involucran cultivo celular se requiere la incorporación de matrices poliméricas biodegradables, esto corresponde a una característica del quitosano el cual es degradado por lisozimas, las cuales se encuentran presentes en el cuerpo humano. En esta investigación no se determinó la biodegradabilidad del quitosano pero se puede suponer el hecho de que si se degradó, los derivados que se formaron influenciaron en la capacidad de las células de proliferar, obviamente presentando un efecto negativo, debido a la presencia de un agente químico (entrecruzante) el

producto de la degradación sería diferente a lo que normalmente se espera, o sea la glucosamina y la N-acetilglucosamina.

Debido a que el grado de desacetilación resulta ser un parámetro importante que influye en las diferentes propiedades del quitosano como físico químicas, fuerza a elongación y tensión, así como biodegradabilidad y actividad inmunológica; es de suma importancia analizar el efecto que presenta en el crecimiento de diferentes tipos de células. Según investigaciones llevadas a cabo por Hsu *et al.* (2004) en la cual se quiso determinar el efecto de diferentes grados de desacetilación y pesos moleculares, se obtuvo que para las películas de quitosano con altos grados de desacetilación se facilita la adhesión y proliferación celular, sin embargo el peso molecular no juega un papel fundamental en el crecimiento celular. Cuando se refiere a altos grados de desacetilación los porcentajes se encuentran entre un 91 a 95%.

Para el caso del quitosano de langostino purificado el grado de desacetilación es bajo, aspecto que pudo influenciar el crecimiento celular de fibroblastos humanos sobre los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glicoxal al 20%. La proliferación celular resultó ser baja debido a la baja adhesión celular presentada por los fibroblastos, esto se debe a la ausencia de cargas positivas presentes en el quitosano, puesto que los grupos amino se encuentran entrecruzados con lo que se impide la interacción con las células, además de presentar muy pocos grupos amino si se compara con los quitosanos utilizados de alto grado de desacetilación (91 a 95%). Hsu *et al.* (2004) proponen que el ambiente óptimo para el crecimiento celular ocurre cuando las células cargadas negativamente se encuentran con superficies con carga positiva. Sin embargo se ha propuesto que los materiales sintéticos al interaccionar fuertemente con las células, da como resultado una alta adhesión y baja proliferación; debido a que la alta interacción interfiere con el cambio de forma de alargado a globular, necesario para la división celular. Por lo que no se puede descartar esta posibilidad a pesar de que no se logró determinar experimentalmente.

Debido a los resultados negativos obtenidos del crecimiento de los fibroblastos en los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal, se logró determinar una reducción en la viabilidad celular comparado con los controles utilizados; es evidente que después de 7 días de incubación aún existen células viables, o sea que no absorbieron la eosina azul debido a que presentan su membrana intacta, sin embargo la cantidad es baja si se compara con los controles utilizados. Estas células viables pueden ser aquellas que lograron adherirse al hidrogel y por consiguiente proliferar, o incluso aquellas en las que el hidrogel no presentó un efecto adverso. Se debe tomar en cuenta que la técnica de conteo celular puede influir en los resultados presentados anteriormente, puesto que para el crecimiento en hidrogeles de quitosano se obtuvo una baja proliferación y una baja viabilidad, lo que supone una mala disociación de las células del soporte así como daño celular por la utilización de la tripsina en exceso o muy concentrada.

La mayoría de los criterios analizados se relacionan con la capacidad de los fibroblastos de adherirse al hidrogel de quitosano, ya que según varias teorías entre más rápido se adhieran las células en cultivo, es más probable que estas permanezcan viables y puedan proliferar (Katalinich,1997). Debido a que la adhesión no se pudo determinar mediante la observación al microscopio invertido esto podría explicar el hecho del porque se obtuvo tan baja proliferación celular. Por ende es necesario optimizar los soportes para que las células se puedan adherir con el fin de obtener comportamientos de proliferación adecuados, conforme las células se preparan para esta fase.

## **CAPITULO VI: CONCLUSIONES**

Las características físico químicas del quitosano de langostino dependen del proceso de purificación al cual sea sometido.

Los hidrogeles de quitosano entrecruzados absorben menos agua que los hidrogeles sin entrecruzar, evidenciando así cambios en la funcionalidad de la molécula de quitosano

El análisis de absorción de agua y termogravimétrico dependen del grado de entrecruzamiento de los hidrogeles de quitosano

El método de entrecruzamiento por inmersión de los hidrogeles sin entrecruzar resultó efectivo en la obtención de hidrogeles entrecruzados con agentes difuncionales cumpliendo con lo esperado teóricamente

Los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 20% resultaron ser tóxicos para el crecimiento de fibroblastos humanos, disminuyendo la viabilidad celular comparado con las pruebas sin hidrogel.

La proliferación celular en diferentes sustratos depende de la capacidad de adhesión de las células para lograr mantenerse viables

## **CAPITULO VII: RECOMENDACIONES**

Determinar la degradabilidad del hidrogel de quitosano y la influencia en el crecimiento celular

Realizar un estudio acerca de la influencia del grado de desacetilación del quitosano de langostino en la proliferación y adhesión celular

Optimizar el método de determinación de viabilidad celular por medio de la prueba con MTT, así como pruebas de adhesión y proliferación celular

Utilizar agentes entrecruzantes que no sean químicos y tóxicos o aplicar otra técnica convencional en la obtención de soportes para ingeniería de tejidos

Utilizar otros biomateriales y técnicas de ingeniería de tejidos para lograr el máximo crecimiento celular de fibroblastos sobre soportes poliméricos



## CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

ABRAM, A.P. 2004. Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Perú. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 312 p.

ANDRADEL, V.S.; BARROS, B.; FUKUSHIMA, K.; Y TAKAKI, G.M. 2003. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) -A factorial study. Departamento de Patología, Universidad Federal de Alagoas, UFAL. Rev Iberoam Micol; 20: 149-153.

ASTM. Designación D 2857: Viscosidad de disoluciones diluidas de polímeros.

ASTM. Designación E 1131-03: Standard Test Method for Compositional Analysis by Thermogravimetry.

ASTM. Designación D 1110-56: Standard Methods of Test for Water Solubility of Wood.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 57: 29-34.

BLAIR, H.; GUTHRIE, J.; LAW, T.K.; TURKINGTON, P. 1987. Chitosan and modified chitosan membranes. Preparation and characterization. Journal of Applied Polymer Science. 33: 641-656.

BORETOS, J.W.; EDEN, M. 1984. Contemporary Biomaterials. Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects. Noyes Publications, Park Ridge, NJ. Pp. 232–233.

BRINE, C.J.; AUSTIN, P.R. 1981. Chitin variability with species and method of preparation. *Comp Biochem Physiol.* 69: 283-286.

BUCKLEY, C.T.; O'KELLY, K.U. 2004. Chapter V. Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering. P.J. Prendergast and P.E. McHugh (Eds.), *Topics in Bio-Mechanical Engineering*. Pp. 147-166.

BURG, T.; STANDARD, O. 2001. *Materials for Biomedical Engineering*. Biomedical Materials, Student. *Materials Science and Engineering*. 15 p.

CHENG, M.; CAO, W.; GAO, Y.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. 2003. Studies on nerve cell affinity of biodegradable modified chitosan films. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 14(10): 1155– 1167.

CHEN, K.; KU, Y.; LEE, C.L.; LIN, H.R.; LIN, F.H.; CHEN, T.M. 2005. Immobilization of chitosan gel with cross-linking reagent on PNIPAAm gel/PP nonwoven composites surface. *Materials Science and Engineering*. 25(4): 472-478.

CHUANG, W.; YOUNG, T.H.; YAO, C.H.; CHIU, W.Y. 1999. Properties of the Poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan Blend and Its Effect on the Culture of Fibroblast In Vitro. *Biomaterials* 20: 1479-1487.

CHUNG, T.W.; LU, Y.F.; WANG, H.Y.; CHEN, W.P.; WANG, S.S.; LIN, Y.S.; CHU, S.H. 2003. Growth of Human Endothelial Cells on Different Concentrations of Gly-Arg-Gly-Asp Grafted Chitosan Surface. *Artificial Organs*. 27(2):155–161.

DANIEL, W. 1983. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. México, D.F. Editorial Limusa. 485 p.

DAVIS, J.M. 2002. Basic Cell Culture. Practical Approach. Estados Unidos. Oxford University Press. 2ª Edición. 381 p.

DAVIS, M.H.; DUNKLEY, P.; HARDEN, R.M.; HARDING, K.; LAIDLAW, J.; MORRIS, A.; WOOD, R. 1994. The Wound Program. Trad. por Neus Falguera Aleu y Jardo Junca Piera. Centre for Medical Education. University of Dundee. Scotland. 188 p.

DEMLING, R.H.; DESANTI, L.; ORGILL, D.P. 1999. The use of skin substitutes. <<http://www.burnsurgery.org/Betaweb/Modules/skinsubstitutes/sec13.htm>>. 2/9/05.

DAMOUR, O.; GUEUGNIAUD, P.Y.; BERTHIN-MAGHIT, P.; ROUSSELLE, P.; BERTHOD, F.; SAHUC, F.; COLLUMBEL, C. 1994. A Dermal Substrate Made of Collagen-GAG-Chitosan for Deep Burn Coverage: First Clinical Uses. Clinical Materials. 15: 273-276.

DIN 50008: Konstantklimate über waasserigen Loseungen. Deutsches Institut für Normung.

DOOD, J.W.; TONGE, K.H. 1987. Thermal Methods. Analytical Chemistry by Open Learning. P.

DHANIKULA, A.B.; PANCHAGNULA, R. 2004. Development and Characterization of Biodegradable Chitosan Films for Local Delivery of Paclitaxel. The AAPS Journal. 6 (3) Article 27.

ESQUIVEL, M. 2005. Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del camarón *Pleuroncodes planipes*. Tesis Lic. Química Industrial. Universidad Nacional de Costa Rica. 127 p.

GAGNE, N.; SIMPSON, B.K. 1993. Use of proteolytic enzymes to facilitate recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnol.* 7: 253-263.

GARCIA, A.; PENICHE, C.; NIETO, J.M. 1983. Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan by thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis.* 28: 189-193.

GARNER, J.P. 2004. Tissue engineering in surgery. *Surg JR Coll Surg Edinb Irel.* Pp: 70-78.

GERASIMENKO, D. V.; AVDIENKO, I. D.; BANNIKOVA, G. E.; YU. ZUEVA, O.; VARLAMOV, V.P. 2004. Antibacterial Effects of Water-Soluble Low-Molecular-Weight Chitosans on Different Microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 40(3): 253–257.

GONÇALVES, V.L.; LARANJEIRA, M.C.; FÁVERE, V.T. 2005. Effect of crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 15(1): 6-12.

GRABOWSKI, S.R.; TORTORA, G.J. 2002. *Principios de anatomía y fisiología.* Trad. por Rubén Israel Sánchez. México. Oxford University Press. 1175 p.

GUTIÉRREZ, E. 1995. *Métodos estadísticos para ciencias biológicas.* Heredia, Costa Rica. EUNA. 175 p.

GUTSHE, A.T.; PARSONS-WINGERTER, P.; CHAND, D.; SALTZMAN, W.M.; LEONG, K.W. 1994. N-Acetylglucosamine and Adenosine Derivated Surfaces for Cell Culture: 3T3 Fibroblast and Chicken Hepatocyte Response. *Biotechnology and Bioengineering.* 43: 801-809.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F.X. 1999. Thermal Analysis. Fundamentals and Applications to Polymer Science. 2<sup>o</sup> ed. England. John Wiley & Sons, Ltda. 180 p.

HSU, S.; WHU, S.W.; TSAI, C.L.; WU, Y.H.; CHEN, H.C.; HSIEH, K.H. 2004. Chitosan as Scaffold Materials: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Journal of Polymer Research*. 11: 141–147.

JOHNSON, P.C. 2000. The role of tissue engineering. *Advances in Skin & Wound Care*. 13(2):12-4

KASHYAP, A.; KUMAVY, N.; RAVI KUMAR, M.N.K. 2005. Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 22(2): 107-149.

KATALINICH, M. 1997. Characterization of chitosan films for cell culture applications. Thesis M.Sc in Chemical Engineering. University of Colorado. 196 p.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. 2003. Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 4: 303-309.

KRISTL, J.; SMID-KORBAR, J.; STRUC, E.; SCHARA, M.; RUPPRECHT, H. 1993. Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers. *Int. J. Pharm.* 99: 13-19.

LEESON, T.; LEESON, R.; PAPARO, A. 1998. *Texto Atlas de Histología*. México. 1<sup>o</sup> ed. McGraw Hill. 741 p.

LIU, H.; MAO, J.; YAO, K.; YANG, G.; CUI, L.; CAO, Y. J. 2004. A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. *Biomater. Sci. Polymer*. 15(1): 25–40.

MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. 2003. Thermal dehydration treatment and glutaraldehyde cross-linking to increase the biostability of collagen-chitosan porous scaffolds used as dermal equivalent. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, (14)8: 861–874.

MADRIGAL, S. 2003. Obtención de quitosano a partir del camarón langostino *Pleuroncodes planipes* y valoración de sus propiedades farmacéuticas. Tesis Lic. Química Industrial. Universidad Nacional de Costa Rica.

MUSCHLER, G.F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L. 2004. Current Concepts. Review Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *The journal of bone and joint surgery, Incorporated.* 86-A(7): 1541-1558.

MUZZARELLI, R.A.; PETER, M.G. 1997. *Chitin Handbook.* European Chitin Society. Atec Edizioni, Via San Martino. 528 p.

POLLARD, J.W.; WALKER, J.M. 2000. *Methods in Molecular Biology. Basic Cell Culture Protocols.* Totowa, New Jersey. Humana Press Inc, Vol 75.

PENICHE, C.; ARGÜELLES, W.; SAN ROMAN, J. 1993. A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and mercaptan derivative of chitosan. *Polymer degradations and Stability.* 39: 21-28.

REYES, P. 1980. *Bioestadística aplicada: Agronomía, Biología, Química.* México, D.F. Editorial Trillas, S.A. 217 p.

ROH, I.R.; KWON, I.C. 2002. Fabrication of a pure porous chitosan bead matrix: influences of phase separation on the microstructure. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 13(7): 769–782.

ROHINDRA, D.; NAND, A.V.; KHURMA, J.R. 2005. Swelling properties of chitosan hydrogels.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J.T. 2003. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*. Vol 5. pp: 29-40.

SAINTIGNY, G.; BOMARD, M.; DARNOUR, O.; COLLOMBELL, C. 1993. Reconstruction of Epidermis on a Chitosan Cross Linked Collagen-GAG Lattice: Effect of Fibroblast. *Acta Derm Venereol*. 73: 175-180.

SÄKKINEN, M. 2003. Biopharmaceutical Evaluation of Microcrystalline Chitosan as Release-Rate-controlling Hydrophilic Polymer in Granules for Gastro-Retentive Drug Delivery. Academic Dissertation. Faculty of Science of the University of Helsinki. 56 p.

SANTOS, J.; SOARES, J.; DOCKAL, E.; CAMPANA, S.; CAVALHEIRO, E. 2003. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 13(4): 242-249.

SASTRE, R.; DE AZA, S.; SAN ROMÁN, J. 2004. Biomateriales. Faenza, Italia. Litográfica Faenza. 522 p.

SEYMOUR, R.B.; CARRAHER, C.E. 1995. Introducción a la Química de los Polímeros. Barcelona. España. Editorial Reverté, S.A. 706 p.

SILVA, R.M.; SILVA, G.A.; COUTINHO, O.P.; MANO, J.F.; REIS, R.L. 2004. Preparation and characterization in simulated body conditions glutaraldehyde

crosslinked chitosan membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 15: 1105-1112.

SINGH, D.K.; RAY, A.R. 2000. Biomedical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *J.M.S.Rev. Macromol. Chem. Phys.* 40(1): 69–83.

SWAMI, S.N. 2004. Radiation Synthesis of polymeric hydrogels for swelling controlled drug release studies. Thesis Ph.D. University of Western Sydney. P 364.

TEZCANER, A.; KÖSE, G.; HASÝRCÝ, V. 2002. Fundamentals of tissue engineering: Tissues and applications. *Technology and Health Care*. Vol 10: 203–216.

TSAIH, M.; CHEN, R. 1999. Effects of ionic strength and pH on the diffusion coefficients and conformation of chitosans in molecule solution. *J. Appl. Polym. Sci.* 73: 2041-2050.

TUZLAKOGLU, K.; ALVES, C.M.; MANO, J.F.; REIS, R.L. 2004. Production and Characterization of Chitosan Fibers and 3-D Fiber Mesh Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Macromol. Biosci.* 4: 811–819.

VEGA, J. 1996. Síntesis y caracterización de redes poliméricas de uretano. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. México.

WANG, J.W.; HON, M.H. 2003. Effects of sugar cross-linking agents and thermal treatment on the culture of fibroblasts in vitro on a (PEG/ chitosan) membrane. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 14(2):119–137.

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. 2005. Cell Isolation Techniques. <http://www.tissuedissociation.com/techniques.html>. Lakewood. NJ.



## CAPITULO IX: ANEXOS

### ANEXO 1. MÉTODOS CONVENCIONALES DE OBTENCIÓN DE SOPORTES

Técnica	Método	Ventajas	Desventajas
<b>Evaporación de disolventes y disolución de partículas</b>	Se dispersan partículas inorgánicas solubles en agua (cloruro de sodio, tartarato de sodio, citrato de sodio o sacarosa) en una disolución de un polímero. Se congela y liofiliza el disolvente y por último se disuelven las partículas dispersas	Rango alto de tamaño de poro Control independiente de la porosidad Estructuras sumamente porosas	Grosor limitado (3mm) Limitada interconectividad Residuos de partículas pueden ser tóxicas Poco control de estructura interna
<b>Inversión de fase y disolución de partículas</b>	Semejante a la anterior, pero la solución del polímero se coloca en agua con lo que el polímero precipita	Se obtienen soportes con grosores mayores a 3 mm	Igual a las anteriores
<b>Laminado de membranas</b>	Utiliza el sistema de evaporación de disolvente y disolución de partículas. Consta de superponer membranas impregnadas de disolvente	Control de la macroforma Control independiente de la porosidad y tamaño de poro	Falta de fuerza mecánica Interconectividad limitada
<b>Procesado de fibras</b>	Las mallas de fibras se obtienen por procesamiento de fibras individuales entrelazadas al llegar al punto de fusión, las cuales se encuentran en una matriz de algún otro polímero el cual se disuelve selectivamente y deja intacto a las fibras unidas entre sí	Alta porosidad Elevada superficie para adhesión celular Excelente permeabilidad	Limitado rango de polímeros Falta de fuerza mecánica Residuos de solventes
<b>Moldeado fundido en</b>	El polímero se mezcla con partículas porógenas y se cargan en un molde. El molde se	Control independiente de la porosidad y del tamaño de poro Control de la macro	Requiere alta temperatura para polímeros nanomorfos Residuos de las

	calienta por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero, y por último se sumergen en una solución selectiva para eliminar el porógeno	forma	sustancias porógenas
<b>Separación de fase</b>	Se disuelve un polímero sintético en fenol o naftaleno, la temperatura se baja para producir una fase de separación líquido-líquida y enfriada para tener dos sólidos. El solvente se remueve por sublimación	Estructura sumamente porosa Permite la incorporación de agentes bioactivos	Pobre control de la arquitectura interna Rango limitado del tamaño de poro
<b>Liofilización</b>	Utiliza soluciones homogéneas de un sistema polimérico en un disolvente de punto de congelación relativamente elevado. Solución se enfría hasta temperaturas inferiores a la de solidificación del sistema y el disolvente se elimina por sublimación a vacío	Estructuras altamente porosas Alta interconectividad de los poros	Tamaño de poros pequeño Baja estabilidad mecánica
<b>Procesado a alta presión</b>	Se basa en saturar un sistema polimérico en forma de disco con CO <sub>2</sub> en altas presiones. Se produce una inestabilidad termodinámica reduciendo la presión del CO <sub>2</sub> a nivel ambiental, resultando en la nucleación y expansión del CO <sub>2</sub> disuelto	No utiliza solventes orgánicos	Superficie externa sin poros Estructura porosa cerrada Bajas propiedades mecánicas

## ANEXO 2. CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS

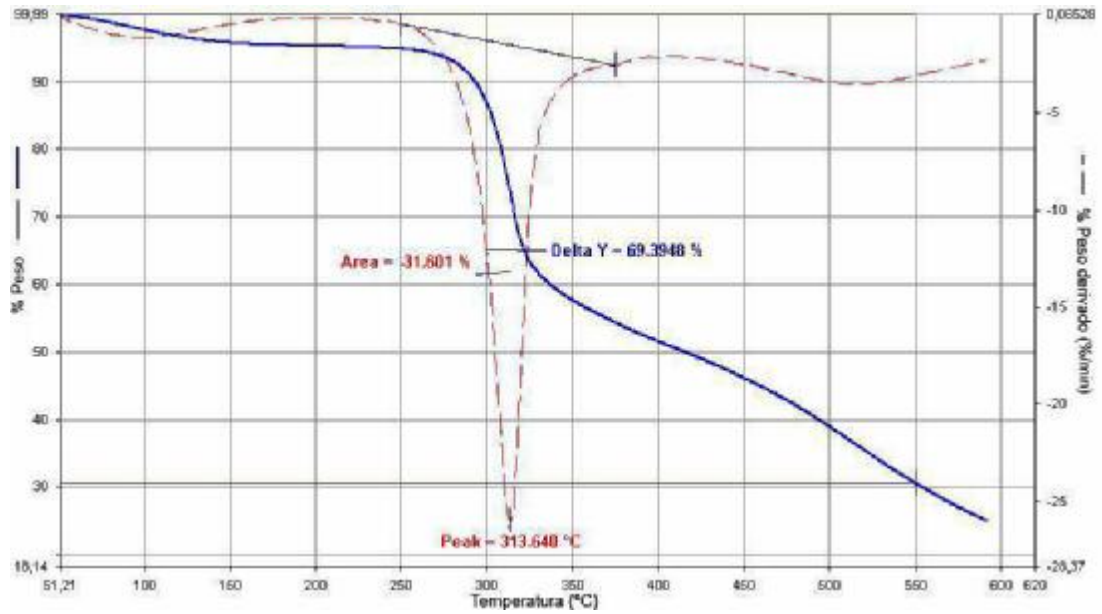


Figura A 2.1. Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de quitosano de langostino grado técnico

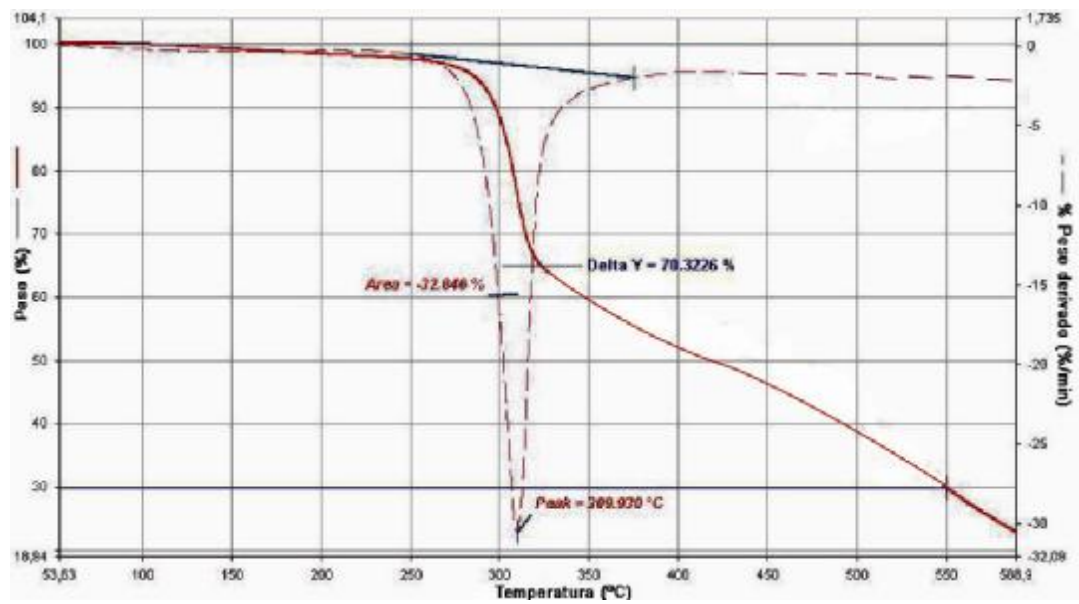
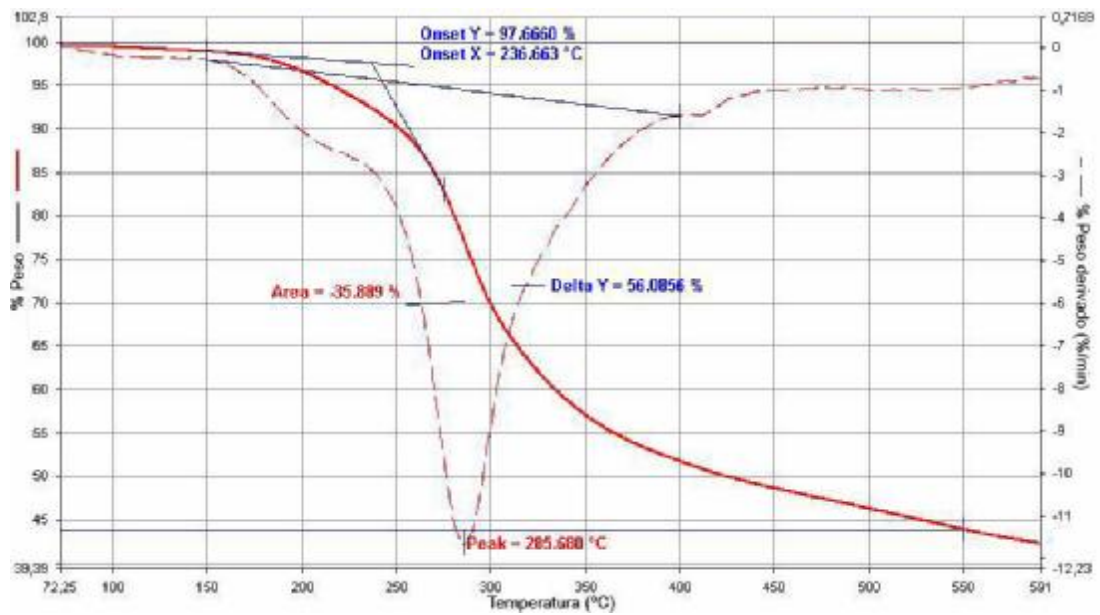
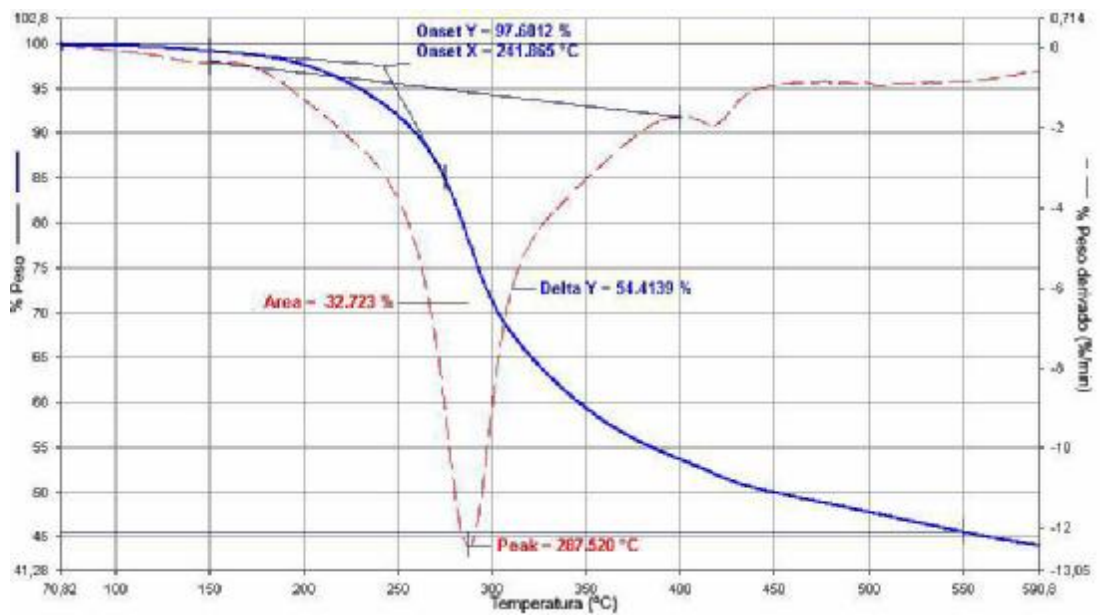


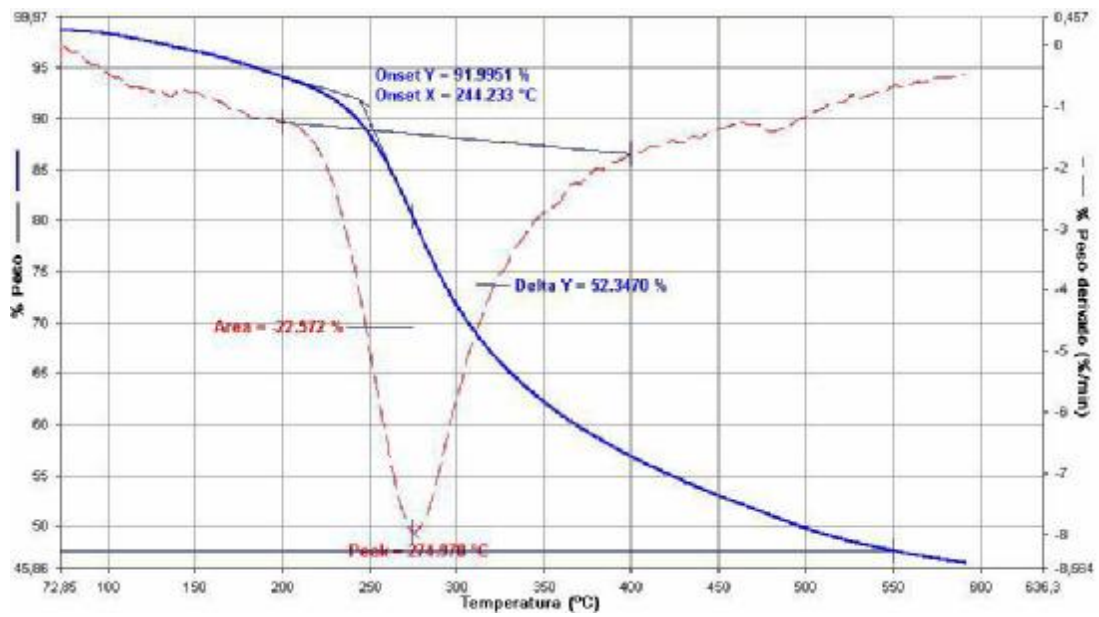
Figura A 2.2. Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de quitosano de langostino purificado



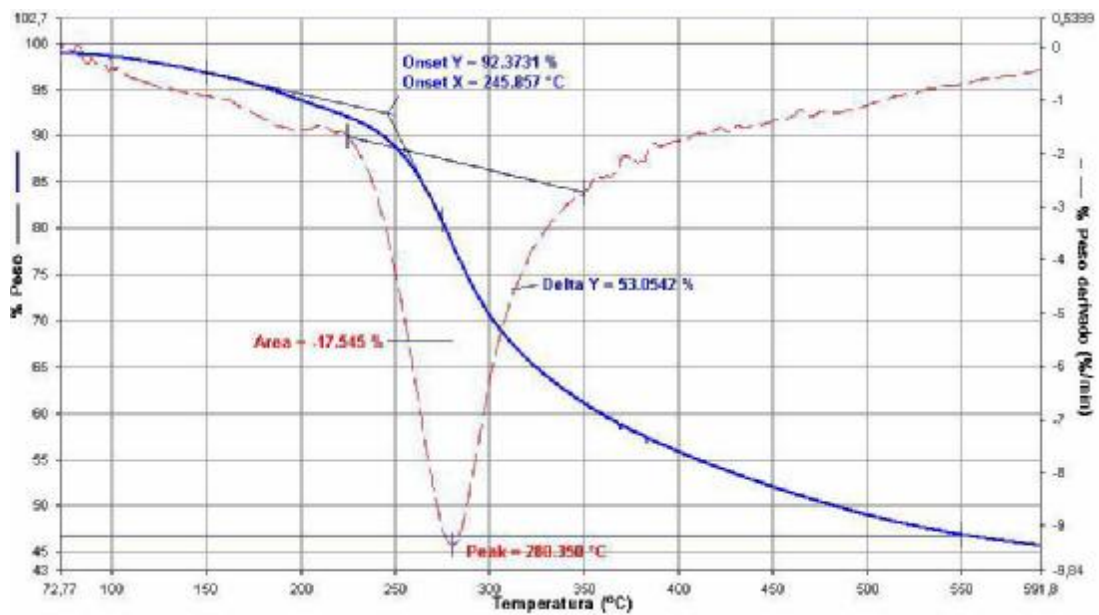
**Figura A 2.3.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano sin entrecruzar al 1%



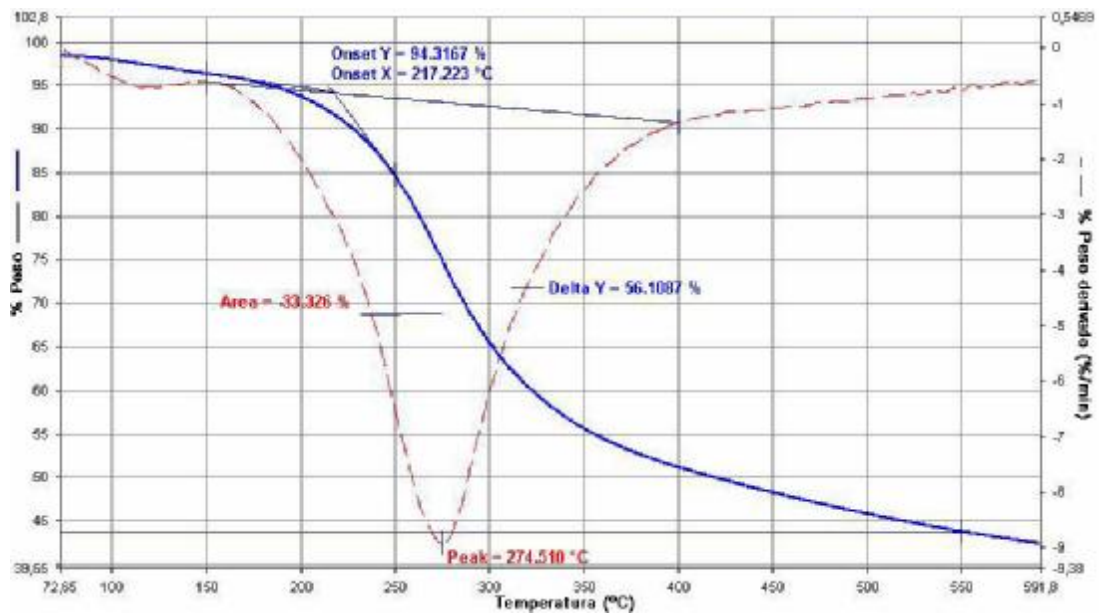
**Figura A 2.4.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano sin entrecruzar al 3%



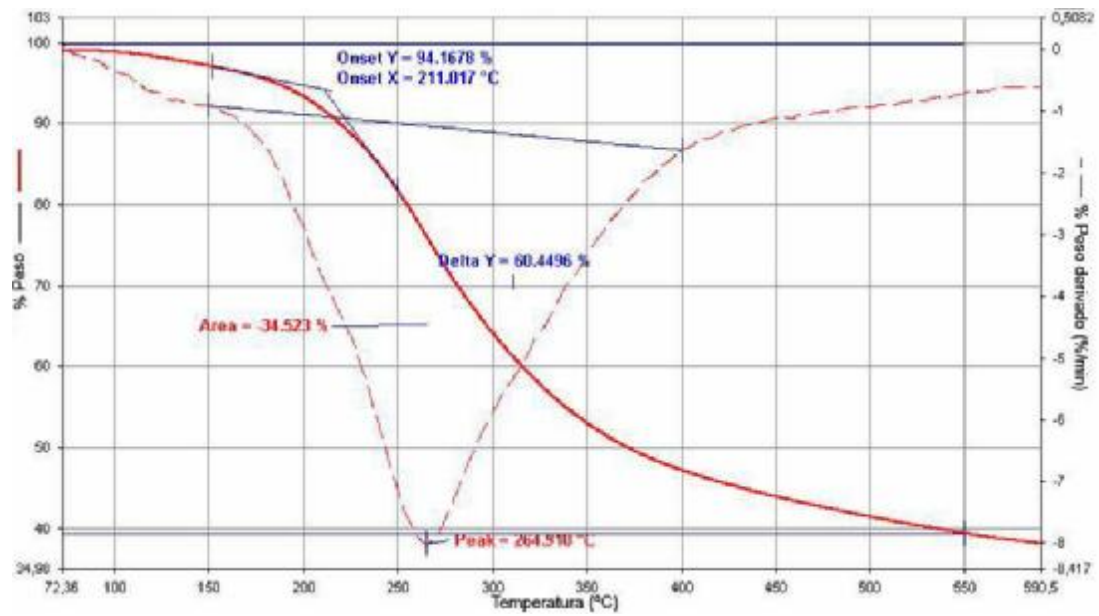
**Figura A 2.5.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 1% entrecruzado con glutaraldehído al 50%



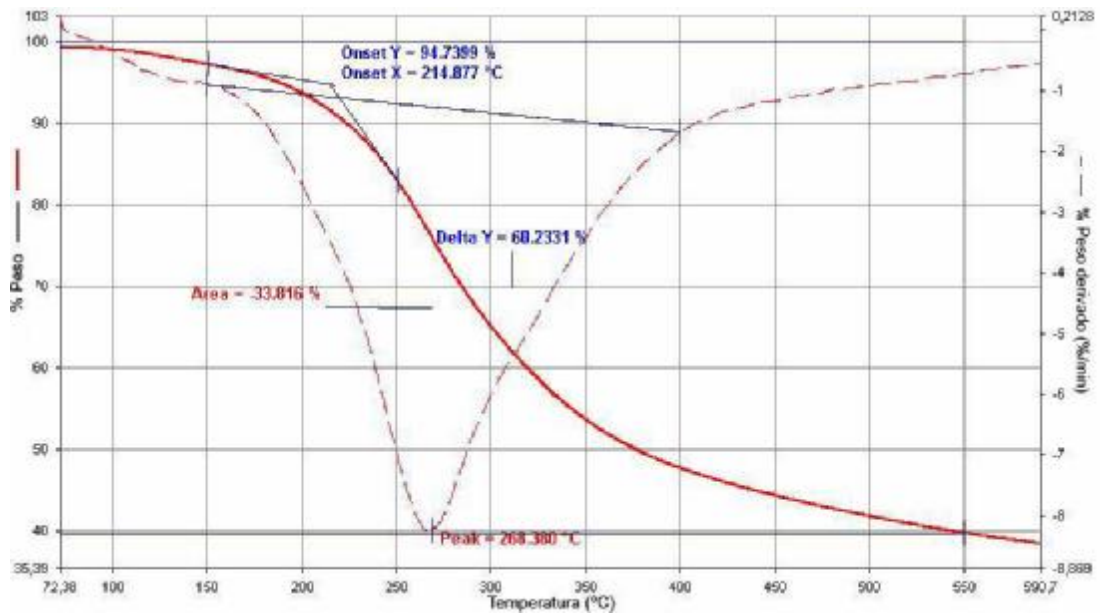
**Figura A 2.6.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 3% entrecruzado con glutaraldehído al 50%



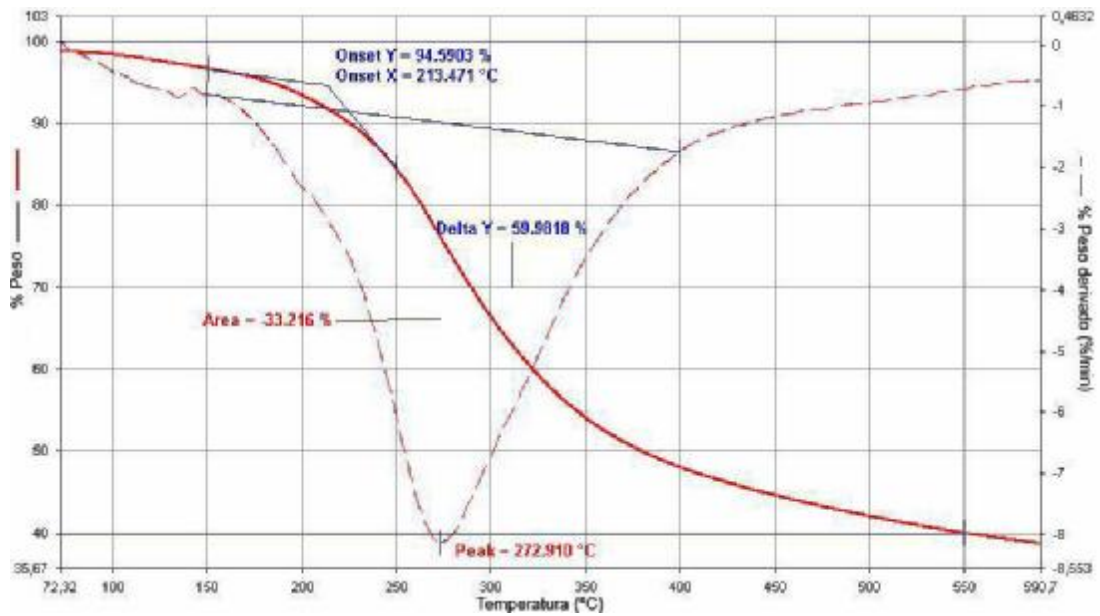
**Figura A 2.7.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 1% entrecruzado con glicoxal al 40%



**Figura A 2.8.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 1% entrecruzado con glicoxal al 30%



**Figura A 2.9.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 1% entrecruzado con glicoxal al 20%



**Figura A 2.10.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 1% entrecruzado con glicoxal al 10%



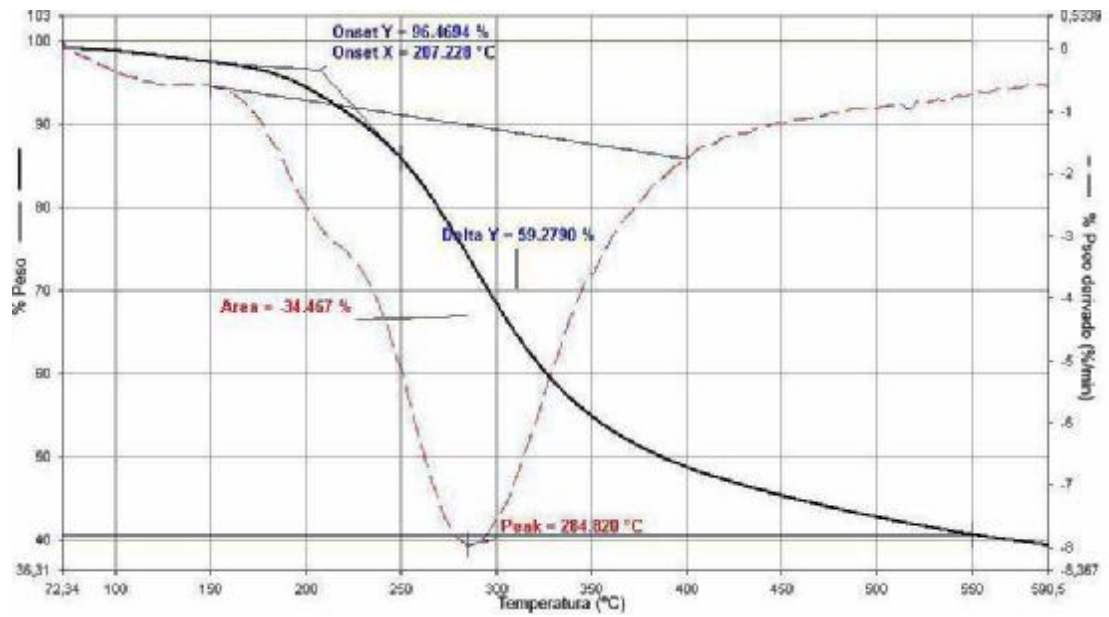


Figura A 2.11. Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 1% entrecruzado con glicoxal al 5%

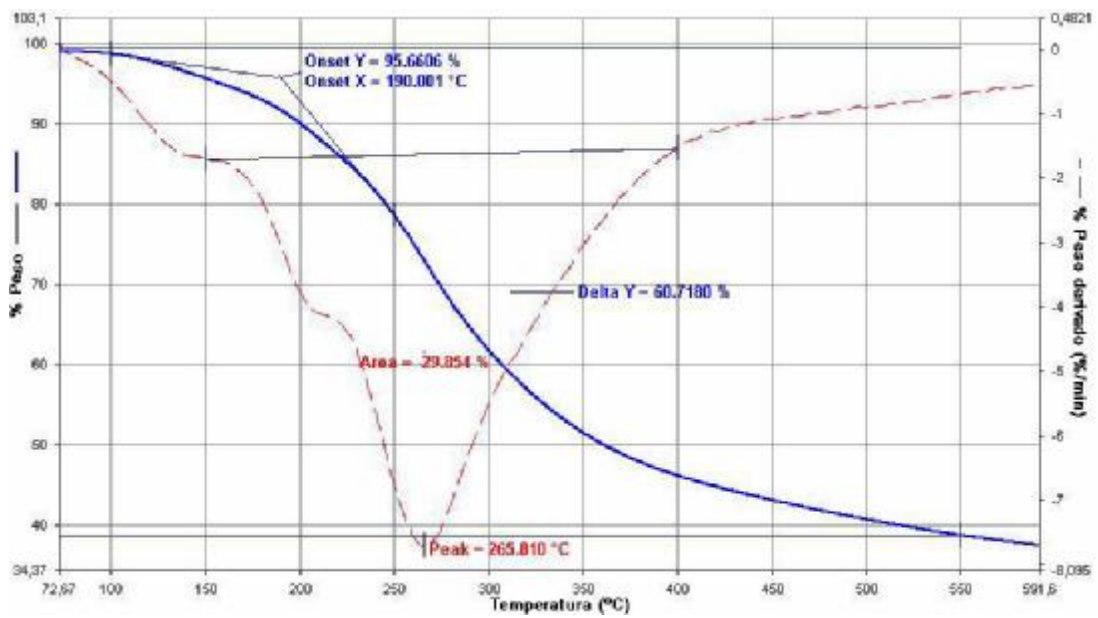
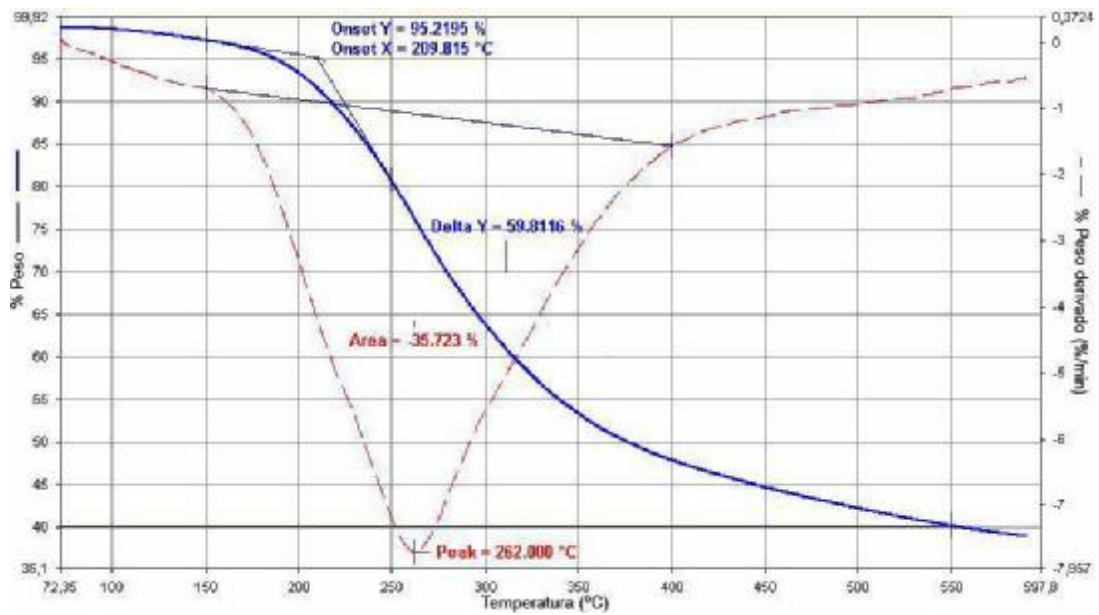
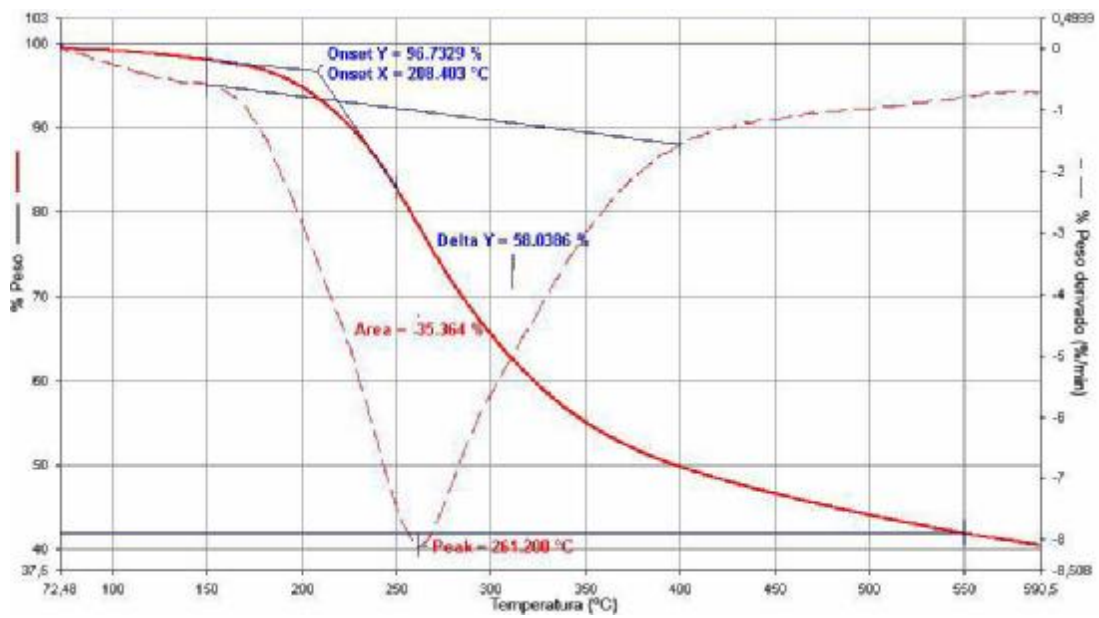


Figura A 2.12. Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 3% entrecruzado con glicoxal al 40%

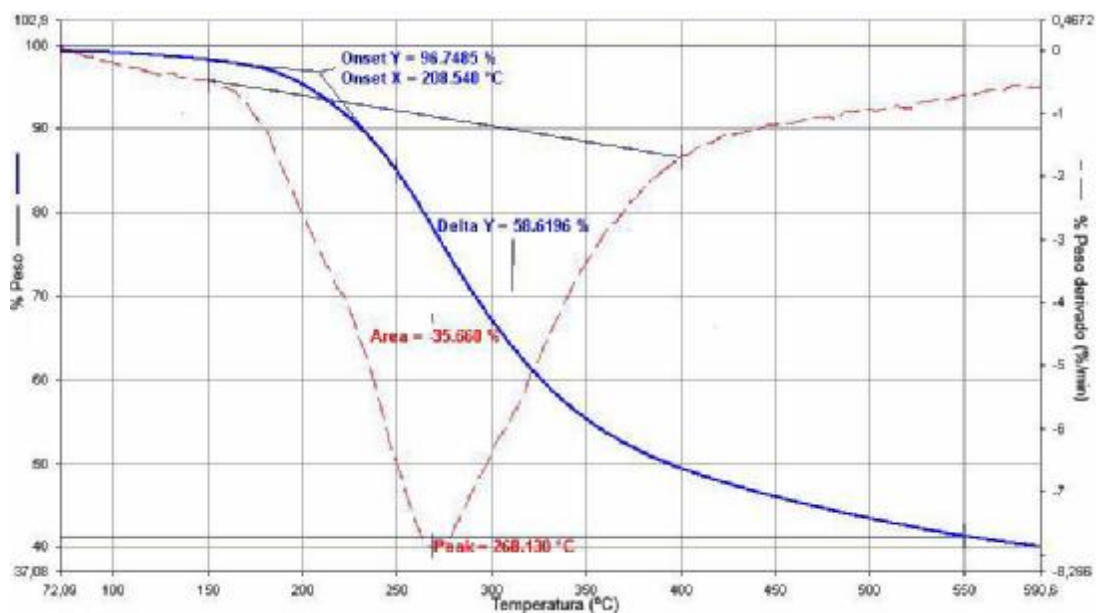




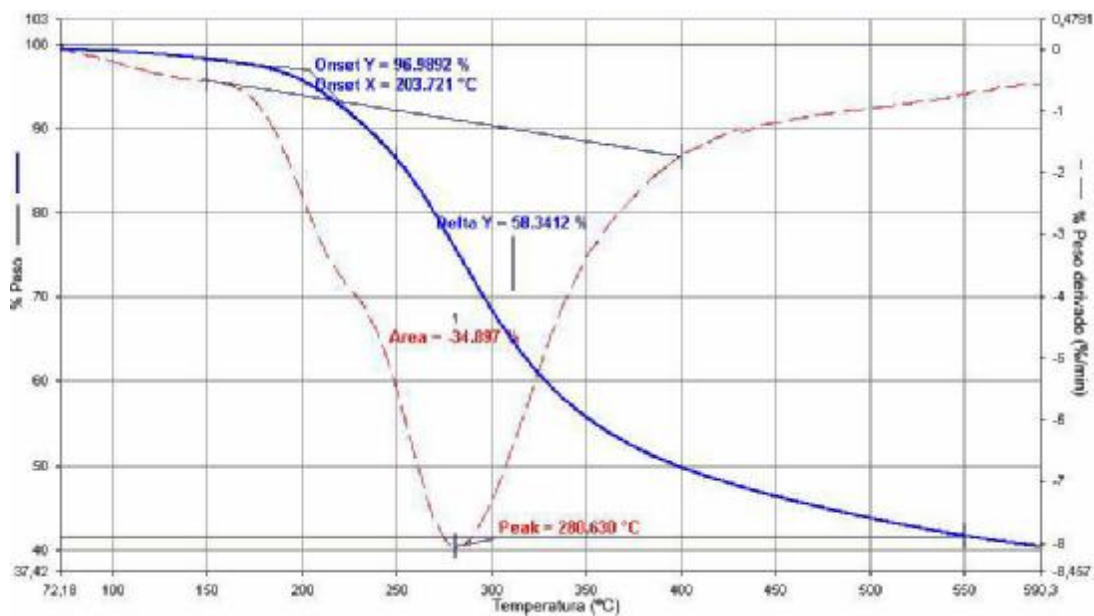
**Figura A 2.13.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 3% entrecruzado con glicoxal al 30%



**Figura A 2.14.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 3% entrecruzado con glicoxal al 20%

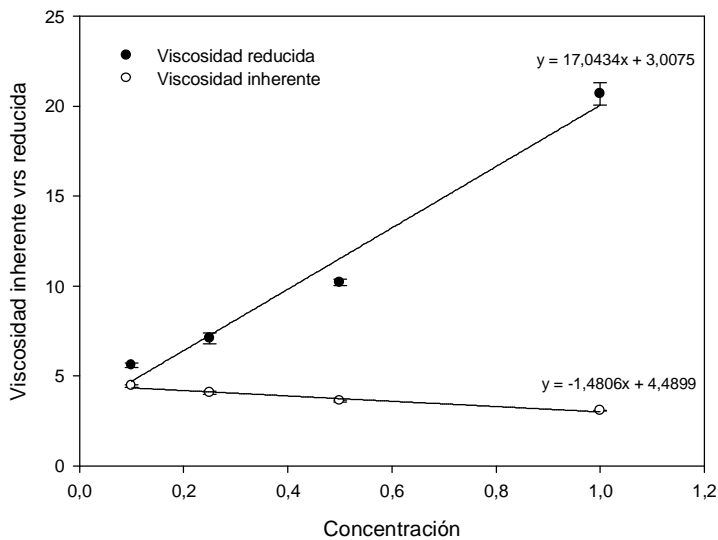


**Figura A 2.15.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 3% entrecruzado con glicoxal al 10%

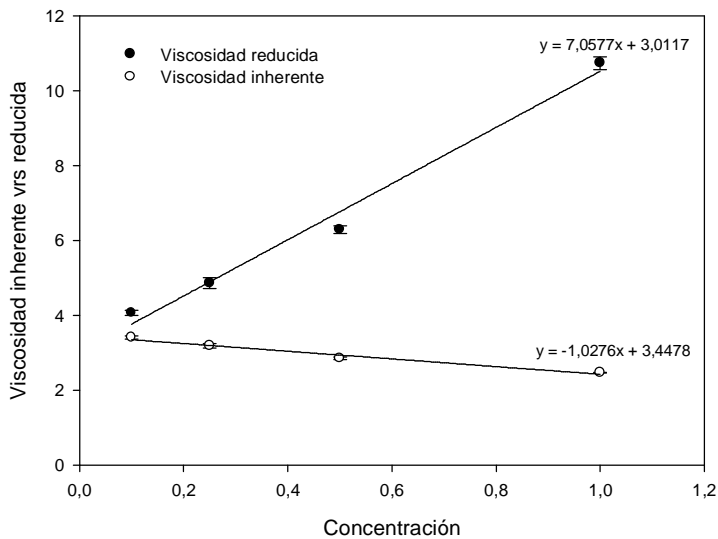


**Figura A 2.16.** Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de un hidrogel de quitosano al 3% entrecruzado con glicoxal al 5%

### ANEXO 3. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR VISCOSIMÉTRICO



**Figura A 3.1.** Gráfica de la viscosidad inherente y reducida contra la concentración de quitosano de langostino grado técnico



**Figura A 3.2.** Gráfica de la viscosidad inherente y reducida contra la concentración de quitosano de langostino purificado