

## PREPARACIÓN DE SOPORTES DE QUITOSANO-GELATINA PARA SU APLICACIÓN EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Ana Isabel Cañas<sup>1\*</sup>, Carmiña Gartner<sup>2</sup>

1. Bioingeniería. Estudiante de Maestría en Ingeniería. Docente Ingeniería de Materiales 1 y 2. Grupo Ciencia de los Materiales. Universidad de Antioquia. Sede de Investigación Universitaria, SIU. Calle 62 N°. 52-59, Torre 1 Laboratorio 310. Medellín, Colombia.

\*Contacto:bioing.anacanas@gmail.com

### RESUMEN

El quitosano y la gelatina son biopolímeros promisorios para la elaboración de soportes celulares, debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y su semejanza con la matriz extracelular de los tejidos de la piel, cartílago y hueso. En el presente estudio se prepararon soportes de quitosano y gelatina mediante liofilización para su uso en ingeniería de tejidos. Estos soportes se reticularon con 2,5-dimetoxi-2,5-dihidrofurano (DHF) usando las siguientes proporciones de gelatina: 0, 25, 50 y 100% (p/p), con el fin de estudiar comparativamente sus propiedades y a su vez compararlos con soportes no reticulados. Su morfología y porosidad fueron estudiadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y mediante ensayos de compresión se estudiaron las propiedades mecánicas. Se encontró que el módulo elástico aumentó con la concentración de DHF y también con el incremento de la concentración de gelatina. La técnica de liofilización permitió un buen control de la morfología de los soportes y se obtuvo una porosidad entre 40 y 160 $\mu$ m, presentando un sistema de poros interconectados.

**Palabras Clave:** *Quitosano, gelatina, soportes celulares, DHF, liofilización.*

### ABSTRACT

Chitosan and gelatin are both promising biomaterials for tissue scaffolds manufacturing. They exhibit properties such as biocompatibility, biodegradability and chemical resemblance to the extracellular matrix of tissues of skin, cartilages and bones. For this research, scaffolds for cells support were prepared using chitosan and gelatin by the freeze drying technique. These scaffolds were both selfcrosslinked and chemically crosslinked with 2,5-dimethoxy-2,5-dihydrofurane (DHF). Gelatin was used in four proportions: 0, 25, 50 and 100% (w/w), in order to comparatively understand its influence on the scaffolds final properties. Porosity and morphology were studied by scanning electron microscopy (SEM) and mechanical properties were studied by means of compression tests. We found out that the elastic modulus increased along with DHF concentration and with the gelatin concentration. Freeze-drying allowed controlling the morphology, and scaffolds showed interconnected porosity with sizes ranging between 40 and 160  $\mu$ m.

**Keywords:** *Chitosan, gelatin, scaffolds, DHF, freeze drying*

## **1 INTRODUCCIÓN**

El quitosano es un biopolímero obtenido por desacetilación parcial de la quitina, proveniente principalmente de los exoesqueletos de crustáceos y de la pared celular de algunos hongos. Este biomaterial es utilizado en diversas aplicaciones, tales como la ingeniería de tejidos, debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y actividad antibacteriana [1]. El quitosano es un copolímero lineal compuesto de N-acetil-D- glucosamina y D- glucosamina. Ésta estructura química es similar a los glicosaminoglicanos que son componentes de la matriz extracelular (MEC) de los tejidos de la piel, el cartílago y el hueso de mamíferos. Este biopolímero se degrada por hidrólisis enzimática, principalmente mediante la lisozima, generando subproductos que no causan reacciones tóxicas en el organismo [2].

Una de las ventajas del quitosano es que posibilita la fácil obtención de soportes para crecimiento celular con diferentes geometrías y porosidad controlada. Para ello se han implementado variadas técnicas de fabricación. Sin embargo estos soportes pueden presentar bajas propiedades mecánicas dependiendo del tamaño de poro y el contenido de humedad [3]. La adición de agentes reticulantes en los soportes celulares mantiene la estabilidad estructural y mejora las propiedades mecánicas, sin alterar la adhesión de las células [3]. Entre los agentes reticulantes más utilizados están la genipina [3], el glurataldehído [4] y el glioxal [5].

La modificación de los soportes celulares de quitosano con proteínas como el colágeno, puede favorecer el crecimiento adecuado de las células. Aunque el colágeno es la principal proteína estructural de la MEC [5], sus costos elevados y difícil obtención han motivado el uso de la gelatina, la cual es obtenida de la hidrólisis parcial del colágeno. Este biomaterial, al igual que el quitosano, es biodegradable y biocompatible [6]. Además la gelatina presenta baja inmunogenicidad, y podría incrementar la adhesión, proliferación y diferenciación celular, debido a que en su composición puede contener la secuencia de aminoácidos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico). Esta secuencia de tripéptidos se encuentra en las proteínas de adhesión de la MEC, principalmente en la fibronectina, las cuales al interactuar con las integrinas de la membrana celular, facilitan la adhesión de las células y desencadenan las respuestas biológicas [7].

En conclusión, la modificación de quitosano con gelatina, posibilitará la modulación de las propiedades químicas, mecánicas y biológicas de los soportes celulares, para que en última instancia promuevan la formación de un tejido funcional. En este estudio se fabricaron soportes celulares por medio de la técnica de liofilización, utilizando quitosano y gelatina, autoreticulados y reticulados químicamente con 2,5-dimetoxi-2,5-dihidrofurano (DHF). El DHF es un butanedial que permite controlar la velocidad de reticulación variando el tiempo y la temperatura [8]; el uso de este agente reticulante no ha sido reportado para este sistema. Las propiedades de las estructuras obtenidas se evaluaron con el propósito de su utilización posterior como soportes para cultivos celulares.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

Quitosano comercial Sigma-Aldrich, con un peso molecular viscosidad promedio de 187 KDa y un grado de acetilación (DA) 28%. Gelatina Gelnex 250 Bloom grado USP. Para la reticulación de los soportes de quitosano se utilizó 2,5-dimetoxi-2,5-dihidrofurano (DHF) marca Aldrich. Estos reactivos se utilizaron sin purificación posterior.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Fabricación de los soportes tridimensionales

El quitosano se disolvió en una solución de ácido acético al 1% (v/v) en concentración de 1.5 (p/v). La gelatina se disolvió en agua destilada en concentración 1.5% (p/v) a 70°C por 20 minutos. Se prepararon mezclas en diferentes proporciones de quitosano:gelatina de 100:0, 75:25, 50:50 y 0:100 para preparar soportes no reticulados y reticulados con DHF con dos niveles de reticulación, nivel 1: 75% y nivel 2: 57%, tomando como referencia la cantidad estequiométrica necesaria para la reticulación total del quitosano. Los soportes se sometieron a 70°C por 90 minutos, debido a que el DHF requiere temperatura y tiempo para iniciar la reacción de entrecruzamiento. Estos parámetros fueron optimizados experimentalmente. Por último todas las mezclas fueron congeladas a -20°C por 12 horas en moldes cilíndricos y luego liofilizadas a -80°C por 24 horas. Se obtuvieron de esta manera soportes porosos.

#### 2.2.2 Lavados de los soportes

Los soportes obtenidos fueron lavados con el fin de retirar posibles contaminantes que puedan afectar los posteriores ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad. Los lavados se realizaron de dos maneras diferentes: en una solución de NaOH 0.05 M y en etanol absoluto, con el fin de comparar su efecto en la porosidad. Los soportes fueron sumergidos en dichas soluciones por dos horas y luego se retiraron y colocaron en papel absorbente para retirar el exceso de solución; luego se les adicionó solución de buffer fosfato (PBS) estéril pH: 7.4 y por último se congelaron a -20°C por 12 horas y nuevamente se liofilizaron a -80°C por 24 horas.

#### 2.2.3 Análisis morfológico de los soportes

La morfología y distribución de los poros de los soportes se analizaron por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), realizando cortes transversales de los soportes, en un equipo JEOL JSM 6490 LV a bajo vacío. El tamaño de poro e interconectividad se analizó mediante el uso del software de distribución libre: Image J.

#### 2.2.4 Análisis mecánicos

Se obtuvieron probetas cilíndricas de 8mm de altura y 8mm de diámetro para los ensayos de compresión, que se llevaron a cabo en un equipo INSTRON 3345, usando una velocidad de 5%/min con una celda de carga de 10N.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Morfología de los soportes

Los soportes reticulados presentaron una coloración amarilla, que se hacía más fuerte a medida que la concentración del agente reticulante aumentaba, debido a la formación de enlaces imino coloreados. Se observó que el DHF no afecta la geometría del soporte y por el contrario aumenta la rigidez mecánica, permitiendo que éste mantenga la forma del recipiente donde se va a liofilizar.

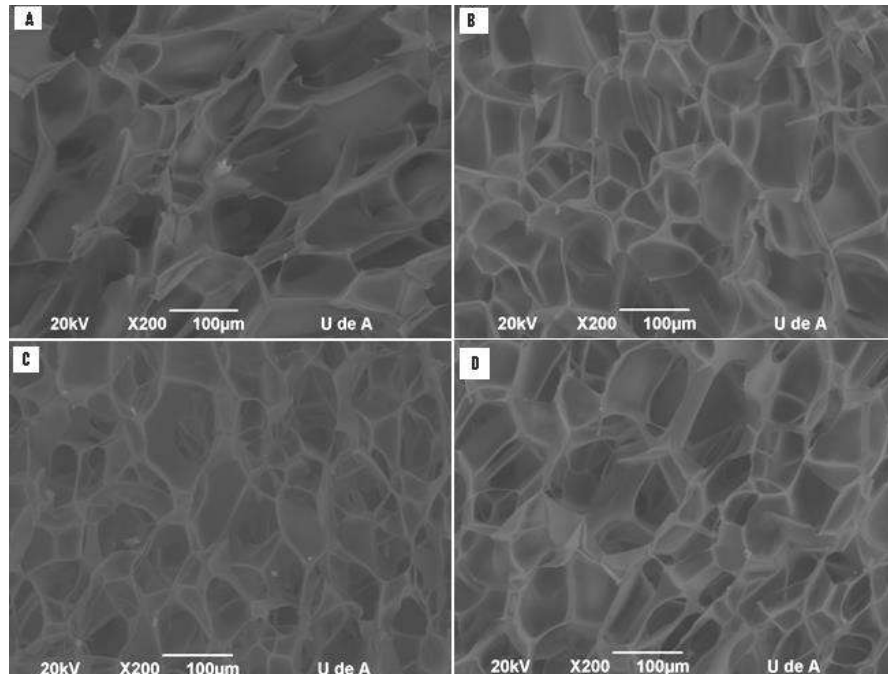
En la tabla 1 se comparan los tamaños de poro obtenidos para los diferentes tratamientos. Todos los soportes presentaron alta porosidad e interconectividad, siendo los poros de los soportes reticulados más definidos y firmes al tacto. Se observó que la adición del agente reticulante disminuye el tamaño del poro. Sin embargo el aumento del contenido de agente reticulante, para los dos niveles utilizados, no tiene efecto aparente en el tamaño de poro para ninguno de los soportes.

**Tabla 1.** Resultados del tamaño de poro de los soportes

| <b>Sin reticular</b>                    | <b>100/0</b> | <b>75/25</b> | <b>50/50</b> | <b>0/100</b> |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Tamaño de poro mínimo ( $\mu\text{m}$ ) | 56.006       | 32.814       | 36.728       | 103.161      |
| Tamaño de poro máximo ( $\mu\text{m}$ ) | 159.652      | 105.451      | 162.881      | 182.278      |
| Promedio ( $\mu\text{m}$ )              | 96.240       | 67.231       | 97.115       | 141.001      |
| <b>Reticuladas nivel 1</b>              |              |              |              |              |
| Tamaño de poro mínimo ( $\mu\text{m}$ ) | 53.377       | 43.270       | 34.269       | -            |
| Tamaño de poro máximo ( $\mu\text{m}$ ) | 129.679      | 117.482      | 151.052      | -            |
| Promedio ( $\mu\text{m}$ )              | 79.033       | 75.573       | 90.553       | -            |
| <b>Reticuladas nivel 2</b>              |              |              |              |              |
| Tamaño de poro mínimo ( $\mu\text{m}$ ) | 34.830       | 44.874       | 43.262       | -            |
| Tamaño de poro máximo ( $\mu\text{m}$ ) | 119.071      | 120.033      | 147.370      | -            |
| Promedio ( $\mu\text{m}$ )              | 78.959       | 82.590       | 83.118       | -            |

Este comportamiento se corrobora al observar las micrografías SEM de la figura 1; en estas micrografías se presentan: el soporte de quitosano sin reticular y reticulado y, el soporte de quitosano:gelatina 75:25 con los dos niveles de reticulación.

Se observó que el tamaño de poro aumenta a medida que se incrementa la concentración de gelatina obteniéndose el mayor tamaño de poro para el soporte preparado a partir de 100% de gelatina. También se observó que el DHF no tiene efecto sobre la gelatina y por lo tanto no se obtuvieron soportes reticulados de quitosano: gelatina en proporción 0:100.



**Figura 1.** Micrografías SEM de los soportes. (A) quitosanoautoreticulado; (B) quitosano reticulado con DHF nivel 2; (C) 72/25 quitosano/gelatina reticulados con DHF nivel 1; (D) 72/25 quitosano/gelatina reticulados con DHF nivel 2.

### 3.2 Lavados de los soportes

Para realizar ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad, es necesario retirar el exceso de ácido acético de los soportes, evitando dañar la forma tridimensional, la porosidad y la interconectividad de los poros. Al analizar las dos formas de lavado, se observó por SEM que los soportes lavados con NaOH pierden su forma tridimensional y los que contienen mayor cantidad de gelatina se tienden a solubilizar perdiendo su estabilidad mecánica. Los soportes lavados con etanol absoluto, mantienen su forma tridimensional y su porosidad no se ve afectada.

### 3.3 Propiedades mecánicas de los soportes quitosano/gelatina

Los resultados obtenidos de las mediciones del módulo de compresión se resumen en la tabla 2. Se observa que los valores del módulo elástico de los soportes no reticulados se incrementan con el aumento del porcentaje de gelatina. Con la reticulación no se observan cambios significativos en el módulo para las diferentes proporciones de quitosano:gelatina, aunque si puede observarse un ligero aumento con el incremento de la reticulación.

**Tabla 2.** Resultados del ensayo de compresión

|                            | 100/0         | 75/25         | 50/50         | 0/100         |
|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Sin reticular</b>       | 0.383 ± 0.008 | 0.689 ± 0.000 | 0.944 ± 0.048 | 1.311 ± 0.130 |
| <b>Reticuladas nivel 1</b> | 0.711 ± 0.420 | 0.665 ± 0.312 | 0.864 ± 0.253 | -             |
| <b>Reticuladas nivel 2</b> | 1.081 ± 0.493 | 1.058 ± 0.128 | 1.160 ± 0.249 | -             |

El aumento del módulo con el incremento en la proporción de gelatina para los soportes no reticulados, se debe al alto grado de reticulación que puede alcanzar esta gelatina, la cual posee un alto valor Bloom, es decir un mayor poder gelificante, otorgándole una mayor rigidez al soporte. De otro lado el mayor módulo de los soportes reticulados se debe a las uniones covalentes entre las cadenas de quitosano, generadas por la reacción con el DHF, las cuales prevalecen sobre los enlaces de hidrógeno y de van der Waals, que se generan al reticularse la gelatina, o al auto-reticularse el quitosano.

#### **4 CONCLUSIONES**

La porosidad no varía considerablemente entre los soportes de quitosano y quitosano:gelatina reticulados con DHF. Se observa sin embargo que la adición de gelatina, en ausencia de un agente reticulante externo, aumenta la porosidad y origina una mayor rigidez a los soportes al compararse con los obtenidos para el quitosano puro, debido al alto poder gelificante de la gelatina usada.

La reticulación con DHF tiende a disminuir el tamaño de poro debido a los fuertes enlaces covalentes en comparación con los enlaces de hidrógeno que se generan inter e intramolecularmente durante la auto-reticulación de la gelatina y del quitosano. Como consecuencia de esta red de enlaces covalentes, estos soportes presentan también un mayor módulo elástico.

Se concluye que la mezcla de gelatina y quitosano posibilita la elaboración de soportes con buenas propiedades mecánicas y morfológicas, con un tamaño de poro adecuado y porosidad interconectada, que los harán aptos para la adherencia y proliferación de células para su aplicación en ingeniería de tejidos.

#### **5 AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a la universidad de Antioquia por la financiación de este trabajo a través del proyecto Estrategia de Sostenibilidad 2013-2014. Agradecimientos especiales a la doctora Martha Helena Londoño del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica (GIBEC), de las universidades EIA-CES, por facilitarnos la realización de los ensayos de compresión.

#### **6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini, "Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 36, no. 8, pp. 981–1014, Aug. 2011.
2. A. Di Martino, M. Sittinger, and M. V. Risbud, "Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering.," *Biomaterials*, vol. 26, no. 30, pp. 5983–90, Oct. 2005.
3. C.-K. Yao, J.-D. Liao, C.-W. Chung, W.-I. Sung, and N.-J. Chang, "Porous chitosan scaffold cross-linked by chemical and natural procedure applied to investigate cell regeneration," *Applied Surface Science*, vol. 262, pp. 218–221, Dec. 2012.

4. Y. Liu, L. Ma, and C. Gao, "Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 32, no. 8, pp. 2361–2366, Dec. 2012.
5. X. Wang, L. Sang, D. Luo, and X. Li, "From collagen-chitosan blends to three-dimensional scaffolds: the influences of chitosan on collagen nanofibrillar structure and mechanical property.," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 82, no. 1, pp. 233–40, Jan. 2011.
6. M. C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M. E. López-Caballero, and M. P. Montero, "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review," *Food Hydrocolloids*, vol. 25, no. 8, pp. 1813–1827, Dec. 2011.
7. U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler, "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4385–4415, Nov. 2003.
8. S. B. Johnson, D. E. Dunstan, and G. V. Franks, "A novel thermally-activated crosslinking agent for chitosan in aqueous solution: a rheological investigation," *Colloid & Polymer Science*, vol. 282, no. 6, pp. 602–612, Apr. 2004.