

DESARROLLO DE APÓSITOS DE QUITOSANO PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO EPITELIAL Primera parte: Caracterización mecánica

Luisa Fernanda Suárez^{1*}, Javier Tulande¹, José H. Mina², José Peñaranda³

1: Estudiantes de Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle, Cali, Colombia

2: Ingeniero de Materiales Ph.D, Universidad del Valle, Cali, Colombia

3: Químico, Universidad del Valle, Cali, Colombia

*Contacto: luisasuarez3741@gmail.com

RESUMEN

En la actualidad una de las aplicaciones médicas más innovadoras del quitosano (CHT), es la de apósitos que estimulen la regeneración de la piel. La naturaleza adhesiva de este biopolímero, junto con su carácter bactericida, antifúngico y su permeabilidad al oxígeno son propiedades muy importantes asociadas con el tratamiento de quemaduras. Sin embargo, la baja resistencia mecánica y la variación de algunas características, bajo condiciones húmedas limitan su uso en la ingeniería de tejidos. Por lo anteriormente planteado, el propósito de esta investigación es mejorar las propiedades mecánicas de películas de CHT obtenidas por el método de evaporación lenta, al plastificarlas con glicerina, y evaluar su comportamiento a una humedad relativa de $70 \pm 5\%$ usada para el acondicionamiento del material.

Palabras Clave: *Apósitos, quitosano (CHT), biopolímero, quemaduras, regeneración de tejidos*

ABSTRACT

Currently one of the most innovative medical applications of chitosan (CHT) is the dressing that stimulates skin regeneration. The adhesive characteristic, as well antibacterial, antifungal, oxygen permeability properties of the biopolymer are important characteristics associated with the treatment of human burns. However, the low strength and variation of some characteristics under wet conditions limit their use in tissue engineering. The purpose of this research is improving the mechanical properties of CHT films obtained by the slow evaporation method. The chitosan was plasticized with glycerin and the behavior was evaluated at a relative humidity of $70 \pm 5\%$ used as conditioning ambient.

Keywords: *Dressings, Chitosan (CHT), Biopolymer, Burns, Tissue regeneration*

1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década, en el área de la ingeniería biomédica se han desarrollado diferentes investigaciones a partir del creciente interés en el estudio de la ingeniería de tejidos por su gran campo de aplicación, entre ellos el desarrollo de películas poliméricas en usos médicos; en este campo se encuentra la utilización de apósitos para la recuperación de tejidos dañados. Así mismo, se ha observado en el mundo, cientos de miles de pacientes requieren hospitalización por quemaduras de superficiales. El tratamiento convencional más utilizado es el uso de injertos de

piel. Sin embargo, estos injertos tienen diferentes problemas, que han llevado a la investigación de una alternativa con mayor disponibilidad y con propiedades similares a la piel natural, dando como resultado el uso de materiales biosintéticos [1].

El CHT es un polímero natural que se obtiene a partir de la desacetilación química o enzimática de la quitina que forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, es un biopolímero lineal altamente insoluble en agua, tiene alto peso molecular y su estructura porosa favorece la elevada absorción de agua [2,]. Los apósitos a base de CHT son una alternativa de solución de gran interés, gracias a las propiedades únicas que presenta el CHT, como la biodegradabilidad, no toxicidad, efecto antibacteriano y biocompatibilidad que al momento de su aplicación como apósitos permiten cubrir y proteger la herida manteniendo un nivel de humedad adecuado[3]. Además se puede moldear de diferentes formas, siendo una opción económica, accesible, y fácil de preparar. Según lo han reportado Ishihara *et al.* 2001 [4], sin embargo, la baja resistencia mecánica y el cambio de algunas características y/o propiedades, bajo condiciones húmedas, limitan su uso en la ingeniería de tejidos. Muchas de las propiedades de esta película dependen de varios parámetros tales como el peso molecular y grado de desacetilación, el ácido orgánico utilizado y la posible presencia de plastificante [5], que es una de las alternativas utilizadas para mejorar la flexibilidad y capacidad de procesamiento, disminuyendo la resistencia a la tensión, dureza, etc., debido a que genera cambios en el volumen libre que favorecen la movilidad de las cadenas poliméricas. El glicerol o glicerina ha sido el plastificante más utilizado durante mucho tiempo para diferentes aplicaciones gracias a su buena eficiencia, gran disponibilidad, la baja exudación y por su poder humectante e hidratante ha sido utilizado para la preservación de injertos de piel, este plastificante en su información genética, además de sus propiedades antivirales y antibacterianas, posee grandes características que permiten la rápida y homogénea regeneración de piel sobre quemaduras superficiales [5,6].

El objetivo de este estudio es mejorar las propiedades mecánicas de películas de quitosano obtenidas por el método de evaporación lenta, con el uso de glicerina como plastificante para obtener la composición que presente el mejor comportamiento mecánico al momento de su aplicación como apósitos que estimulen la regeneración y/o recuperación de la piel dañada por quemaduras superficiales.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

El Quitosano (Poly(D-glucosamine) Deacetylated chitin) empleado presentó un grado de desacetilación $\geq 75\%$, en forma de polvo blanco fue adquirido en Sigma-Aldrich, la Glicerina utilizada como plastificante fue grado analítico con un 99,7% de pureza, de YEQUIM (Bogotá D.C. – Colombia), el Ácido acético Glacial (CH_3COOH) 100% anhidro de MERCK.

2.2. Diseño experimental

Se utilizó el modelo de superficies de respuesta para evaluar la influencia de la incorporación de CHT y glicerina en las propiedades mecánicas de las películas (esfuerzo máximo a la tensión,

módulo de elasticidad y porcentaje de elongación a la rotura). El intervalo en el que se estudió cada componente fue de 0.5 a 2% para el CHT y de 0 a 7% para la glicerina, estos valores fueron elegidos tomando como base los resultados de investigaciones realizadas con anterioridad [7-9]. Con ayuda del paquete estadístico Minitab 16®, se construyó y analizó el modelo de superficie de respuesta para las variables anteriormente definidas.

2.3. Obtención de películas plastificadas con glicerina

2.3.1. Preparación de la disolución basada en CHT

Para la elaboración de las películas se prepararon disoluciones de CHT en un intervalo de 0 – 2% p/v en ácido acético diluido al 1% v/v; agitando la mezcla durante 6 horas en una plancha de agitación magnética.

2.3.2. Preparación de la disolución de CHT plastificada

A partir de las disoluciones basadas en CHT previamente preparadas, se elaboraron nuevas disoluciones agregando como aditivo plastificante glicerina ($C_3H_8O_3$, Fisher, 99.7% de pureza) en un intervalo de 0 -7% v/v y agitando nuevamente por un intervalo de tiempo de 3 horas.

2.3.3. Formación de películas flexibles

Para la formación de películas, se usaron moldes de teflón con cavidades que tenían dimensiones de 25x100x5 mm, a cada cavidad se le incorporaron 12.7 mL de la disolución de CHT y glicerina; luego se dejaron 4 días secando a temperatura ambiente, dentro de una campana de vidrio con el fin de protegerlas contra impurezas y/o elementos ajenos presentes en el ambiente que pudieran entrar en contacto con la película en estado líquido, y 3 días en el interior de un horno a 40°C para que se formaran las películas por evaporación lenta del disolvente, finalmente las películas conformadas fueron retiradas cuidadosamente de los moldes y acondicionadas a una humedad relativa de 70 ±5% y una temperatura de 25°C.

2.4. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier marca NICOLET 6700 FT-IR. La muestra de CHT comercial fue mezclada con KBr y prensadas para formar una pastilla la cual fue analizada en modo de transmisión en el intervalo de 4000 – 450 cm^{-1} , la glicerina en estado líquida fue analizada por medio de una celda para líquidos y la película de 0.189% de CHT y 1.25% de glicerina en modo de transmisión en el intervalo de 4000 – 450 cm^{-1} .

2.5. Propiedades mecánicas

Se determinaron las propiedades mecánicas a tensión de las películas elaboradas; la caracterización del material fue realizada cuando este se acondicionó a una humedad relativa de 70% ± 5%. La prueba se llevó a cabo en una máquina universal de ensayos mecánicos Tinius Olsen modelo H50KS equipada con una celda de carga de 1000 N y operada a una rapidez de

desplazamiento de mordazas de 5 mm/min hasta la fractura de la muestra y una distancia entre mordazas fue de 50 mm de acuerdo con lo establecido en la norma ASTM D882-12 [11]. Se registraron datos de carga y deformación. La resistencia a tensión se calculó como la carga máxima dividida entre el área transversal de la probeta, mientras que el módulo de elasticidad a tensión fue determinado como la pendiente en la zona elástica de la curva esfuerzo deformación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis FT-IR

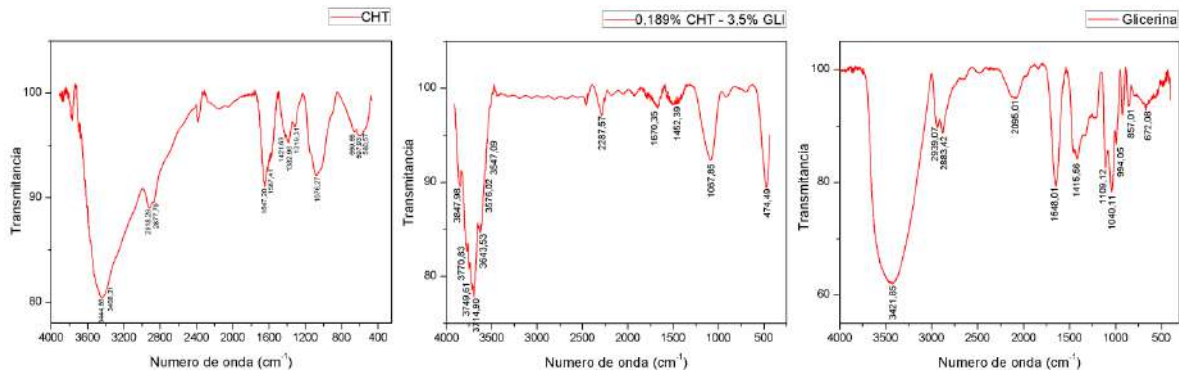


Figura 1. Espectros FT-IR de a) CHT b) Película de 0.189CHT -1.25GLI y c) Glicerina.

Se realizó la caracterización de espectroscopia infrarrojo a las películas de quitosano plastificadas, además del quitosano puro y la glicerina con el fin de analizar el efecto de la incorporación de la glicerina como plastificante en las películas de quitosano, en la Figura 1 (a) y (b) correspondiente al quitosano puro y la glicerina podemos observar la región típica de bandas de sacáridos entre aproximadamente 900 y 1200 cm^{-1} que se pueden atribuir a los modos de vibración de los enlaces C-O-C y C-C y el modo de flexión de los enlaces C-H [12], en el espectro de infrarrojo del Quitosano puro (Figura 1(a)), podemos encontrar diferentes bandas características del material, una banda entre 3200 y 3600 cm^{-1} que se atribuye a los enlaces NH ($3408,21 \text{ cm}^{-1}$) y al estiramiento en tensión de los enlaces OH ($3444,86 \text{ cm}^{-1}$) con mayor predominación, la definición de esta banda es aportada en cierta medida por el enlace de hidrógeno de las moléculas de quitosano [13] y las banda que se encuentra alrededor de los $2918,29 \text{ cm}^{-1}$ y $2877,79 \text{ cm}^{-1}$ son características del estiramiento de los enlaces C-H de forma asimétrica y simétrica respectivamente, en la banda alrededor de $1647,2 \text{ cm}^{-1}$ se observó la banda correspondiente para el estiramiento en tensión del enlace C=O, otra de las bandas características es la que se identifica alrededor $1587,41 \text{ cm}^{-1}$ que se atribuye al estiramiento en tensión del enlace C-C [12, 14]. En el espectro infrarrojo de la película de quitosano plastificada con glicerina (Figura 1(b)) se observa la banda característica al grupo amina alrededor de 1600 cm^{-1} , además observamos diferentes desplazamientos de las bandas características del quitosano debido a que las moléculas de glicerina desplazan las unidades quitosano y se introduce en el interior de estas, aumentando la probabilidad de formación de enlaces de hidrogeno entre moléculas [15].

3.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas de quitosano plastificadas y no plastificadas se muestran en la Tabla 1. A partir de los resultados obtenidos se logra evidenciar que el quitosano sin plastificar forma películas rígidas debido a que presenta alta resistencia a la deformación, como se evidencia en el gráfico esfuerzo vs deformación de las películas de CHT sin glicerina (Figura 2(a)). En donde se puede apreciar que se requiere de grandes esfuerzos para lograr deformar la probeta, lo cual da indicios de que el comportamiento mecánico de estas películas corresponde a un material rígido y frágil; Además, se puede apreciar que el valor de resistencia a tensión aumenta con el incremento de la concentración de quitosano. Por otro lado en la Figura 2(b) se observa la curva esfuerzo vs deformación, para las películas de CHT mezclado con glicerina; donde se observa como el esfuerzo a la ruptura disminuyó considerablemente, mientras que la deformación aumentó notablemente. Todo ello indica que el material al estar plastificado reduce su rigidez y aumenta su elasticidad, tal y como lo demuestra el comportamiento mecánico obtenido, resultados similares a los reportados por [9, 13] esto se debe principalmente a que la inclusión de plastificante interfiere en las interacciones entre cadenas favoreciendo su movilidad permitiendo aumentar la elongación de las películas y mejorando así su flexibilidad [15].

Tabla 1. Propiedades mecánicas (resistencia a la tracción, módulo de elasticidad y el alargamiento a la rotura) de las películas de quitosano sin plastificar y plastificadas con glicerina.

CORRIDA	%CHT	%Glicerina	Módulo de E. (MPa)	Resist. Tensión (MPa)	%Deformación (%)
1	0,2	3,5	0,723	0,379	48,07%
2	1,25	0,0	434,710	9,670	11,46%
3	2,0	0,0	366,628	12,482	17,95%
4	1,25	3,5	0,448	0,138	24,21%
5	1,25	3,5	0,672	0,127	15,44%
6	1,25	3,5	0,401	0,117	24,86%
7	0,5	0,0	27,222	1,958	12,03%
8	1,25	3,5	0,197	0,071	30,95%
9	2,3	3,5	3,381	0,564	18,69%
10	1,25	8,4	0,040	0,037	67,07%
11	1,25	3,5	0,153	0,062	31,93%
12	0,5	7,0	0,125	0,073	48,12%
13	2,0	7,0	0,434	0,086	19,11%

En las curvas de las Figuras 2(a) y 2(b) se evidencia una deformación no lineal cuando las películas son sometidas a una carga, esto se debe a que las cadenas poliméricas comienzan a desenroscarse hasta quedar extendidas. Posterior a esto, las películas continúan con una deformación elástica hasta donde los enlaces empiezan a estirarse y ocurre un encuellamiento donde el área se disminuye, hasta la ruptura total de sus enlaces [8, 10].

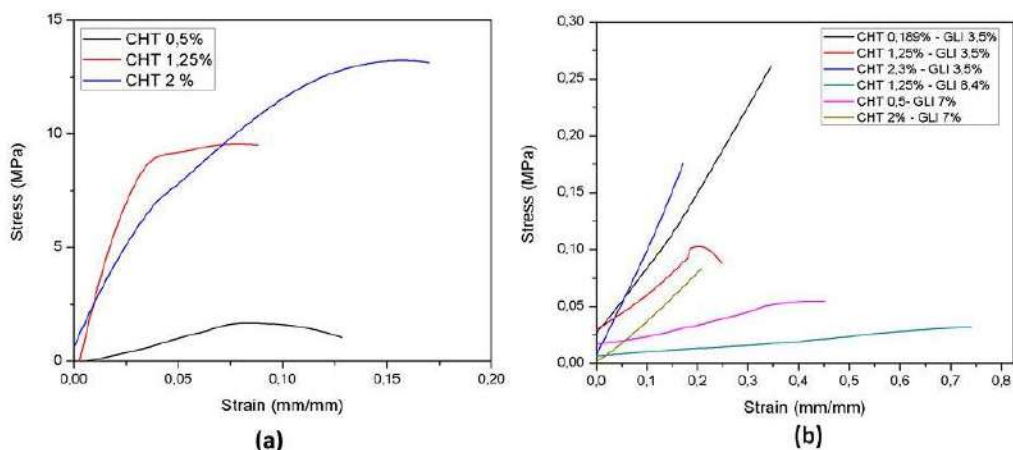


Figura 2. Gráfica de esfuerzo vs deformación para a) películas de quitosano sin plastificar y b) películas de quitosano plastificadas con glicerina.

En la Figura 3 se muestran los gráficos de superficies de respuesta y de contorno relacionados con las propiedades mecánicas (resistencia a la tensión y deformación) de las películas de CHT y glicerina en estas es posible apreciar de mejor manera el comportamiento mecánico antes descrito a partir de las curvas de esfuerzo vs deformación. En el caso de la resistencia a la tensión se observa una considerable disminución de esta a medida que aumenta el porcentaje de glicerina, sin embargo porcentajes de glicerina entre 1.75% y 6.1% generan los valores de resistencia a la tensión más bajos. Los mejores valores de resistencia a la tensión se obtienen con un alto contenido de CHT y bajo contenido de glicerina. Caso contrario ocurre para la deformación donde se obtienen mayores valores de esta a medida que se disminuye el contenido de CHT y se aumenta el contenido de Glicerina.

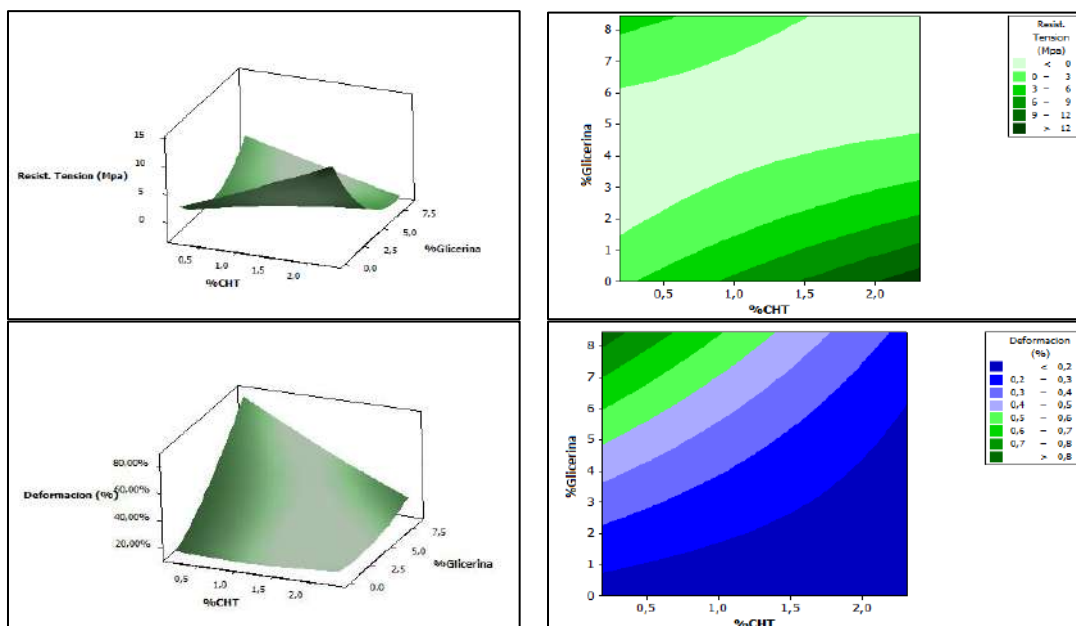


Figura 3. Superficies de respuesta y de contorno de las propiedades mecánicas de películas de CHT y glicerina.

4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron películas transparentes, a partir del uso de las disoluciones de quitosano plastificadas con glicerina; las cuales presentaron diferentes propiedades mecánicas que fueron fuertemente dependientes del contenido de glicerina, encontrándose que en la medida que se incrementó dicho porcentaje se mejoraron las propiedades de flexibilidad de las películas con bajos módulos de elasticidad y resistencias a tensión en el material. Esta deformación alcanzada por la película es directamente proporcional a la alta concentración de glicerina e inversamente proporcional a la resistencia a la tensión, lo que se evidenció en la caracterización FTIR donde se observó el efecto de la glicerina como plastificante al desplazar el ácido acético promoviendo la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos amina.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boucard, N., Christophe, V., Agay, D., Mari, E., Roger, T., Chancerelle, Y., Domard, A., The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, Vol. 28. 3478–3488, 2007.
2. Piquero J., Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartílago, Universidad de Zaragoza, 2010.
3. Ishihara M, K Ono, M Sato, K Nakanishi, Y Saito, H Yura, T Matsui, H Hattori, M Fujita, M Kikuchi, A Kurita. Acceleration of wound contraction and healing with a Photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound Rep Reg* 9, 513-521, 2001.
4. Lemus J., Martínez L., Navarro M., Posadas A., Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón. *Boletín N° 7*, 2007.
5. Srinivasaa, P.C, Rameshb, M.N, Tharanathan, R.N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids* 21 1113-1122, 2007.
6. Khoo, T.L., Halim, A.S., Mat Saad, A.Z., Dorai A.A. The application of glycerol-preserved skin allograft in the treatment of burn injuries: An analysis based on indications. Published by Elsevier Ltd and ISBI. *burns* 36 897–904, 2010.
7. Abadía, P. Javier. Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartílago, 2010.
8. Fernández, D. Estudio del método de evaporación lenta para la fabricación de películas poliméricas basadas en quitosano y glicerol orgánico, 2011.
9. Garcia, A., Pinottia M., Martino M., Zaritzkya N. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 339–345, 2004.

10. Pantoja, W., Vélez, O. Obtención de películas poliméricas basadas en dióxido de silicio encapsulado en una matriz de quitosano y glicerol orgánico a través del método de evaporación lenta para aplicaciones biomédicas. Proyecto de Grado, Universidad Autónoma de Occidente, Cali, 2011.
11. AMERICAN SOCIETY TESTING FOR MATERIALS – ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM D882, 2012.
12. Martínez, A.P., Cortez, M.O., Ezquerro, J.M., Graciano-Verdugo, A.Z, Rodríguez, F., Castillo, M.M., Yépiz, M.S., Plascencia, M., Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, Carbohydrate Polymers 82, 305–315, 2010.
13. López, A., Rivas, J., Loaiza, M., Sabino, M., Degradación de películas plastificadas de quitosano obtenidas a partir de conchas de camarón (*L.vannamei*), Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V., Vol. 25, N° 2, pp. 133–143, 2010.
14. Liu, H., Adhikari, R., Guo, Q., Adhikari, B., Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch–chitosan films, Journal of Food Engineering 116 588–597, 2013.
15. Rivero, S., García, M.A., Pinotti, A., Propiedades reológicas, de barrera y mecánicas de películas compuestas de gelatina y quitosano. Facultad de Ciencias Exactas-UNLP. CONICET-CCT La Plata, 2009.