

## EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DEL HONGO *A. NIGER* PARA ANDAMIOS COMO SOPORTE PARA EL CRECIMIENTO DE TEJIDOS

Luisa Fernanda Alzáte D.<sup>1\*</sup>, Mayra Valencia Z.<sup>2</sup>, Raul Cuervo M<sup>2</sup>.

1: Estudiante Ingeniería de Materiales, Universidad de San Buenaventura. Cali, Colombia.

2: Docente, Universidad de San Buenaventura. Cali, Colombia.

\*Contacto: Inice33@hotmail.com

### RESUMEN

En este trabajo de investigación se realizó la extracción, caracterización y conformado por Electrohilado del quitosano a partir de la pared celular del hongo *Aspergillus niger*. Se cultivó y procesó dentro de las instalaciones de la Universidad San Buenaventura, Cali, Colombia, Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, México, y Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México. La metodología se basó en un proceso de hidrólisis básica utilizando NaOH al 40% a 95°C por 5 horas. Posteriormente se realizó un tratamiento ácido con HCl al 10% y luego se realizó la precipitación de quitosano utilizando NaOH al 30%. Fue caracterizado en las instalaciones por medio de espectroscopia infrarroja (FTIR) y resonancia magnética nuclear. Se utilizó una solución Ácido trifluoroacético/Diclorometano al 70/30 respectivamente y quitosano al 7% p/v. Se conformó por medio de electrospinning, generando películas de fibras continuas (de longitudes inferiores a la micra) que forman una membrana tridimensional altamente porosa. Las películas se caracterizaron por medio de SEM y SEM-EDX.

**Palabras Clave:** *Aspergillus niger*, *Quitosano*, *Electrohilado*

### ABSTRACT

In this research was performed the extraction, characterization and shaping by electrospinning of chitosan from cell wall of the fungus *Aspergillus niger*. The fungus was grown and processed within the premises of the University of San Buenaventura, Cali, Colombia, Instituto Tecnológico de Merida, Merida, Mexico, and Scientific Research Center of Yucatan, Merida, Mexico. Methodology is based on a basic hydrolysis process using 40% NaOH at 95 ° C for 5 hours. Subsequent acid treatment was performed with 10% HCl and then precipitation of chitosan performed using 30% NaOH. Infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance was used. A solution of trifluoroacetic acid / Dichloromethane 70/30 respectively and chitosan to 7% w / v. was used in the electrospinning setup, generating films of continuous fibers (of lengths less than one micron) forming a highly porous three-dimensional membrane. The films were characterized by SEM and SEM-EDX.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, *Chitosan*, *Electrospinning*

### 1 INTRODUCCIÓN

Los biomateriales se enmarcan en un conjunto de conocimientos del mundo de las ciencias e ingeniería, la biología y la medicina. Se ha llegado entonces a una generación en donde la

innovación se centra en la realización de biomateriales donde su objetivo es la regeneración, por tanto el objetivo de este trabajo de investigación es generar andamios o soportes por medio del electrospinning a partir de un biopolímero, en este caso es el quitosano extraído de la pared celular del hongo *Aspergillus niger*, el cual puede servir para diferentes aplicaciones, entre ellas, para el crecimiento de tejido tisular.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Cultivo, crecimiento y escalamiento del hongo *Aspergillus niger***

La cepa ATCC 16404-*Aspergillus Níger* se obtuvo de los laboratorios de la American Type Culture Collection. Se cultivó en PDA (papa dextrosa agar). Para la preparación del medio se utilizaron 7,8 g de PDA para una solución de 200 ml de agua y se procedió a su esterilización, conservando las condiciones de 121 °C y 15 Lb de presión por 15 minutos. Una vez logrado el crecimiento y aislamiento fúngico en PDA, así como la determinación de las condiciones óptimas, se procedió a su caracterización macroscópica y microscópica para continuar con el escalamiento, el cual es un proceso con el que se induce un crecimiento rápido por medio de agua peptonada y por YPD (Yeast Peptone Dextrose). El primero es para el crecimiento de las esporas, y el segundo es para el crecimiento masivo de hifas.

### **2.2 Extracción y desacetilación de la quitina del hongo *A. Niger***

En esta fase se realizaron diferentes procesos en el hongo para extraer el biopolímero. Se lavaron 89,4g de *Aspergillus niger* para eliminar impurezas, se adicionó NaOH al 40% por 5 horas a 95°C. Se eliminó todo el exceso de NaOH lavándolo con abundante agua caliente y luego se midió el pH hasta que estuvo cercano a 7. Manualmente se mezcló con HCl al 10% por 4 horas, en este paso la solución se empieza a solubilizar, y luego se midió el pH de la pasta, el cual debe oscilar entre 3,8-4,5. Luego se centrifugó a una velocidad de 6.000 rpm durante 25 minutos. La operación de extracción se repitió 3 veces más adicionando HCl al 10%. Finalmente el polímero precipitó adicionando NaOH al 40% hasta que el pH fue de 10,0. El quitosano se recuperó por centrifugación y filtración, posteriormente se lavó con agua, etanol y acetona, y se secó en un horno al vacío a 50°C. Se obtuvo un peso final de 7,6g de quitosano, con un rendimiento del 8,5%, lo cual es mayor que otros reportados en la literatura pero menor que el obtenido por el exoesqueleto de los crustáceos. [2]

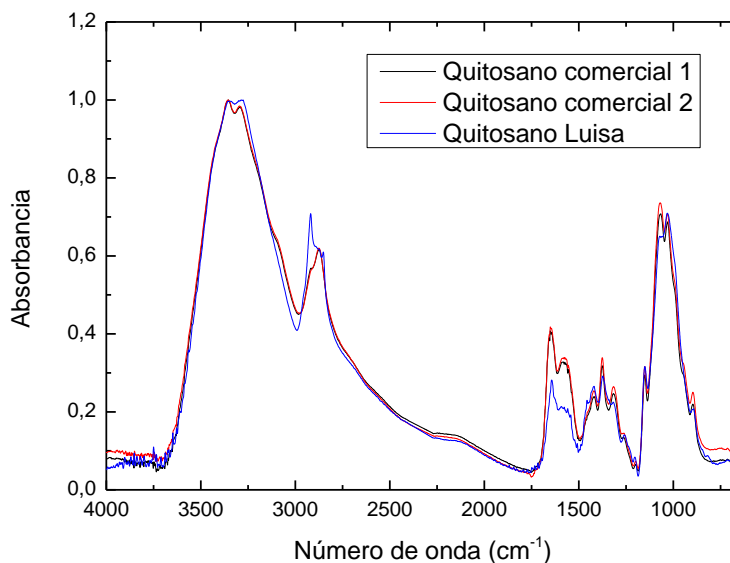
## **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3. Caracterización del quitosano**

#### *3.3.1 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)*

El quitosano inicialmente se caracterizó por medio de Espectroscopia de infrarrojo (FTIR) con un equipo Nicolet modelo 8700, con accesorio para ATR de ZnSe. El número de barridos (scans) fueron 100, el intervalo espectral fue de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  y la resolución fue de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Para esta prueba se compactó 0,5g de KBr y una escama de 0.01g del quitosano experimental a 4 Ton-f

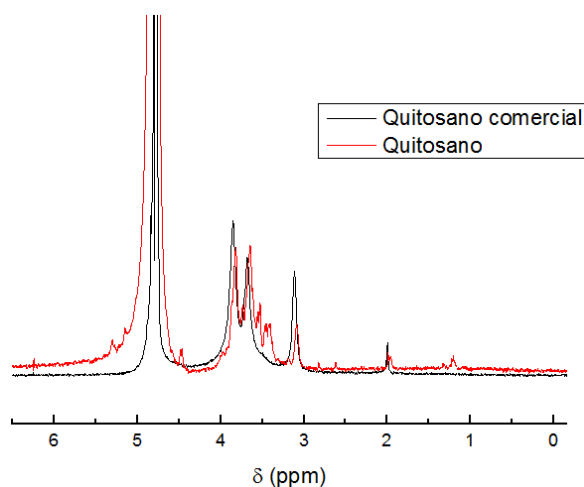
para generar una pastilla. Los resultados arrojaron una gráfica (Figura 1.) muy similar a la del quitosano comercial [3], con algunos ruidos debido a algunos residuos de agua que contenía aún.



**Figura 1.** FTIR-Quitosano experimental y comercial

### 3.3.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La obtención de los espectros de RMN se hicieron disolviendo 12mg de la muestra en agua 2 frascos de agua deuterada y 1 gota de HCl deuterado. Los análisis fueron llevados a cabo en un equipo Bruker de 400 MHz a 70°C. Se puede observar en la Figura 2 que aunque los picos del quitosano experimental sean muy parecidos a los del quitosano comercial, se aprecian unos ruidos que pueden indicar la presencia de impurezas que posiblemente no se eliminaron completamente en el proceso de hidrólisis básica.



**Figura 2.** RMN-Quitosano experimental y comercial

### 3.3.3 Grado de desacetilación

El grado de desacetilación se obtuvo a partir de la ecuación 1[4]. Se tomaron 2 muestras de quitosano experimental y 2 muestras de quitosano comercial. Se puede observar en la Tabla 1 que ambas muestras de quitosano mostraron un alto grado de desacetilación entre 92-95% para el experimental, lo cual es algo elevado comparado con los mostrados en la literatura

$$DD(\%) = \left\{ 1 - \left( \frac{\frac{1}{3}ICH_3}{\frac{1}{6}(IH_2 - H_6)} \right) \right\} \times 100 \quad (1)$$

**Tabla 1.** Grado de desacetilación (DD)-Quitosano experimental y comercial

| <b>GRADO DE DESACETILACIÓN (DD%)</b> |    |                            |    |
|--------------------------------------|----|----------------------------|----|
| <b>Quitosano experimental</b>        |    | <b>Quitosano comercial</b> |    |
| Muestra 1                            | 92 | Muestra 1                  | 95 |
| Muestra 2                            | 95 | Muestra 2                  | 90 |

### 3.4 Conformado del material por medio del proceso de Electrohilado

Inicialmente se realizó una solución de ácido trifluoroacético TFA/diclorometano DCM al 70/30 respectivamente y quitosano al 7% p/v. La solución se conformó por electrohilado a diferentes parámetros en un equipo de marca Nabond Co. procedente de china. En la tabla 2 se muestran los diferentes parámetros a los que fueron conformadas las películas, se trabajó inicialmente con una concentración de 6% de quitosano, modificando el potencial eléctrico, el flujo, y la distancia del colector hasta encontrar las condiciones adecuadas para que se generaran las fibras, pero ninguna generó fibras. Finalmente se trabajó con una concentración de quitosano al 7% con un potencial eléctrico de 30Kv, flujo de 0,5ml/h y una distancia de 13cm para las 5 muestras, variando el tiempo de conformado, logrando así que se generaran fibras.

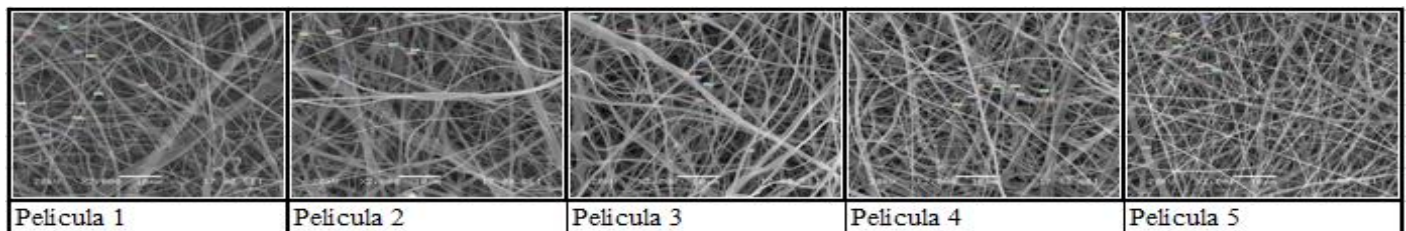
**Tabla 2.** Parámetros de Electrohilado

| <b>Película</b> | <b>Concentración</b> | <b>Potencial eléctrico (Kv)</b> | <b>Flujo (mL /h)</b> | <b>Distancia del colector (cm)</b> | <b>Tiempo (min)</b> | <b>Humedad (%)</b> | <b>Estado de conformado</b> |
|-----------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------------|
| <b>1</b>        | 7%                   | 30                              | 0,5                  | 13                                 | 20                  | 43-33              | fibró                       |
| <b>2</b>        | 7%                   | 30                              | 0,5                  | 13                                 | 30                  | 32                 | fibró                       |
| <b>3</b>        | 7%                   | 30                              | 0,5                  | 13                                 | 45                  | 31                 | fibró                       |
| <b>4</b>        | 7%                   | 30                              | 0,5                  | 13                                 | 60                  | 32                 | fibró                       |
| <b>5</b>        | 7%                   | 30                              | 0,5                  | 13                                 | 120                 | 31                 | fibró                       |
| <b>6</b>        | 6%                   | 30                              | 0,5                  | 13                                 | no aplica           | 31                 | no fibró                    |
| <b>7</b>        | 6%                   | 30                              | 0,5                  | 15                                 | no aplica           | 32                 | no fibró                    |
| <b>8</b>        | 6%                   | 30                              | 0,7                  | 15                                 | no aplica           | 32                 | no fibró                    |
| <b>9</b>        | 6%                   | 27                              | 0,9                  | 15                                 | no aplica           | 34-33              | no fibró                    |
| <b>10</b>       | 6%                   | 25                              | 1                    | 15                                 | no aplica           | 42                 | no fibró                    |

### 3.5 Caracterización de las películas

#### 3.5.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

A las películas conformadas se les realizó microscopia electrónica de barrido, evidenciándose en la figura 5 una mejoría en cuanto más prolongado fue el tiempo de conformado. Las películas 1, 2 y 3 muestran diámetros de fibra no uniformes, con diámetros desde 0,25µm hasta 3,38µm, la película 4 muestra diámetros de fibra un poco más uniformes desde 0,21 µm hasta 1.28 µm, y la película 5 muestra diámetros mucho más uniformes desde 0,25 µm hasta 0,89 µm.



**Figura 3.** SEM-Quitosano experimental

#### 3.5.2 SEM-EDX

En este análisis de caracterización se encontraron los porcentajes de los elementos que se encontraban presentes tanto en el quitosano experimental como en el comercial. El análisis nos muestra que en ambas muestras se detectó la presencia de nitrógeno. El quitosano experimental contiene un 1,18 menos de carbono, y 5,35% más de oxígeno que el quitosano comercial, arrojándonos datos muy similares entre sí.

**Tabla 3.** SEM-EDX-Quitosano experimental y comercial

| QUITOSANO EXPERIMENTAL |        |           | QUITOSANO COMERCIAL |        |           |
|------------------------|--------|-----------|---------------------|--------|-----------|
| Elemento               | Peso % | Atómico % | Elemento            | Peso % | Atómico % |
| C                      | 44,64  | 51,41     | C                   | 45,82  | 52,34     |
| N                      | 5,77   | 5,7       | N                   | 9,93   | 9,73      |
| O                      | 49,59  | 42,89     | O                   | 44,24  | 37,94     |

## 4 DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Dentro del proceso de siembra y escalamiento del hongo *A. niger* se deben tomar las medidas necesarias para mantener un buen crecimiento del hongo sin ningún tipo de contaminación.

En el tratamiento con HCl al 10% se recomienda realizar la agitación de forma manual, ya que permitirá una mejor solubilización del quitosano en la solución.

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de este trabajo, se ha podido llegar a las siguientes conclusiones:

- Es posible extraer quitosano del hongo *aspergillus niger* con un grado de desacetilación de 95% y un rendimiento de 8,5%.
- Es posible obtener películas conformadas por electrohilado a partir de quitosano extraído del hongo *Aspergillus niger*, con un diámetro de fibra aproximado de 0,74 $\mu$ m y un tiempo de conformado de 120 min.
- Es factible obtener una mejor uniformidad en el tamaño de fibra si se mantiene un tiempo de conformado igual o aproximado a 120 min.
- Los parámetros que permitieron electrohilar de la mejor manera el biopolímero fue la solución polimérica de TFA/DCM (70/30) y quitosano al 7% p/v, un flujo de alimentación de 0,5ml/h, con una distancia de 13cm y un potencial eléctrico de 30Kv.

## **5 AGRADECIMIENTOS**

Debo agradecer al doctor José Manuel Cervantes Uc, investigador titular del área de biomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Especial agradecimiento al doctor Gabriel Lizama Uc del Instituto Tecnológico de Mérida por su total colaboración en la realización de este trabajo de investigación.

## **6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Grande, C., “Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas”, Revista Iberoamericana de Polimeros, 296-316, 2010.
2. Barra A., “Obtención de quitosano”, Escuela Agropecuaria Provincial, Pcia. de Santa Cruz, Argentina.
3. Zizumbo F., “Obtención y caracterización de andamios en forma de conductos tubulares coaxiales a base de quitosano y poli (ácido láctico) mediante la técnica de electrohilado para su posible uso en la regeneración de nervios periféricos”, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., 2013.
4. Hirai A., Odani H., Nakajima A., “Determination of degree of deacetylation of chitosan by H-NMR spectroscopy”, Polymer Bulletin 26, 87-94, 1991.