

ELABORACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS OSTEOINDUCTIVOS DE POLI (ÁCIDO L-LÁCTICO)/QUITOSANO PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

Liz Solange Correa^{1*}, Fabio Zuluaga³, Carlos Valencia², Jorge Eduardo Godoy¹

1: Estudiante Maestría, Escuela de Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle, Cali, Colombia

2: Estudiante de Doctorado, Escuela de Odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia,

3: Profesor, Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia

* e-mail: lizsolange@hotmail.com

Resumen: En este trabajo se realizó la extracción de quitosano (CHT) a partir del hongo *Aspergillus niger* cuyo rendimiento fue del 0,6 % sobre la cantidad inicial seca. El CHT se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR) y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-1H). Su peso molecular (200605 g/mol), se determinó mediante viscosimetría capilar y su grado de desacetilación (68.51%) se determinó mediante las técnicas de análisis elemental y valoración potenciométrica. Se prepararon andamios de Ácido Poli (L-Láctico) (PLLA)/CHT mediante la deposición de CHT a través de los poros del PLLA, previamente elaborados por la técnica de moldeo por fusión. La morfología y arquitectura de los poros estos andamios fueron evaluadas por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), comprobándose la existencia de CHT dentro de los poros mediante la técnica espectroscópica de fluorescencia. Los andamios fueron sometidos a pruebas de compresión, porosidad y de degradación hidrolítica con el fin de simular el comportamiento de los andamios porosos dentro del organismo mediante ensayos *in vivo*. Estos ensayos *in vivo* realizados en conejos, indicaron que estos andamios porosos de PLA/CHT implantados en efectos de tamaño crítico en conejo mostraron una adecuada biointegración, evidenciándose un proceso cicatrizal por regeneración ósea.

Palabras claves: Quitosano, Ácido Poli (láctico), pruebas *in vivo*, hongo *Aspergillus niger*, andamios porosos

Abstract: In this work the extraction of chitosan (CHT) was made from the fungus *Aspergillus niger* whose yield was 0.6% on dry initial amount. The CHT was characterized by infrared spectroscopy (FT-IR) and NMR-1H) Nuclear Magnetic Resonance. Its molecular weight (200,605 g / mol), was determined by capillary viscosimetry and its degree of deacetylation (68.51%) was determined by elemental analysis techniques and potentiometric titration. Scaffolds of poly (L-lactide) (PLLA)/CHT were prepared by depositing CHT through the pores of the PLLA scaffolds, previously created by the melt molding technique. Morphology and pore architecture of these scaffolds were evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM) and found the existence of CHT within the pores by fluorescence spectroscopy technique. These material were tested for compression and hydrolytic degradation porosity in order to simulate their behavior within the organism by *in vivo* assays. These *in vivo* in rabbits tests showed that the porous blocks of PLLA/CHT implanted into critical size effects in rabbits showed adequate biointegration, showing scar bone regeneration process.

Key Words: Chitosan, poly (L-lactide), *in vivo* tests, *Aspergillus niger*, Porous Scaffolds.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han diseñado muchos biomateriales con el fin de aplicarlos en el campo médico. No obstante, no se ha avanzado mucho en lo concerniente a la regeneración ósea debido a la dificultad de encontrar materiales que sean compatibles con el organismo humano. La ingeniería de tejidos ha surgido como un enfoque prometedor para la regeneración de tejidos y órganos. Es por esto que muchos científicos e ingenieros a nivel mundial se han dedicado a la utilización de polímeros biodegradables en la producción de andamios porosos, entre los cuales se destaca el Poli (L-Láctico) (PLLA), un polímero biodegradable y a su vez compatible con el organismo humano, convirtiéndose en uno de los biopolímeros más atractivos y utilizado para aplicaciones biomédicas ^[1,2].

El PLLA combinado con quitosano (CHT) en forma de bloque poroso constituye una alternativa viable para la regeneración ósea dando lugar a materiales con buenas propiedades mecánicas. Los polímeros naturales y sus derivados se utilizan cada vez más como una alternativa viable para sustituir a los polímeros sintéticos, debido a su alta biodegradabilidad y a su actividad biológica. El CHT es un polímero biodegradable natural, no tóxico, biocompatible y posee un efecto antibacterial, lo cual lo hace muy interesante para su uso en ingeniería de tejidos ^[3]. Los principales inconvenientes en utilizar CHT puro para producir andamios son las bajas propiedades mecánicas de éstos, lo que limita su uso en ingeniería de tejidos duros ^[4]. En este trabajo se pretendió realizar la síntesis y caracterización de andamios porosos de ácido poliláctico (PLLA) y quitosano (CHT) para estimular la regeneración de tejido óseo en conejos.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La mayoría de los reactivos fueron suministrados por Merck y el resto de reactivos se consiguieron de Agenquímicos S.A.: Hidróxido de Sodio, Ácido Acético Glacial de EM: Cloruro de Sodio (NaCl), Ácido Clorhídrico (HCl), y Fenolftaleína. Ácido Poliláctico de NatureWorks, referencia PLA Polymer 2002 D. Los solventes deuterados fueron suministrados por J.T BAKER CHEMICAL Co.: óxido de deuterio (D₂O, 99,75 %); Cloroformo Deuterado (DCCl₃, 99,75 %). El micelio del hongo *Aspergillus niger* fue donado por la empresa Sucromiles S.A.

Los espectros de Infrarrojo, IR, se tomaron en un equipo SHIMADZU FTIR-8400, utilizando el método de pastilla de bromuro de potasio (KBr) y su intervalo de medición fue entre los 4000 hasta los 500 cm⁻¹. Los espectros de RMN se tomaron en un espectrómetro BRUKER 400 AVANCE II, usando D₂O como solvente.

2.1. Obtención Química de CHT A Partir del Hongo *Aspergillus niger*

Se pesaron 50 g del micelio seco del hongo *Aspergillus niger* en un vaso de precipitado de 200 mL, posteriormente se lavó por triplicado con 500 mL de agua milli-Q a temperatura ambiente eliminándose el exceso de agua por medio de decantación y filtración, el residuo se depositó en un balón de 1000 mL. Esto se realizó con el fin de eliminar algunos componentes tales como azúcares, ácido cítrico y otros componentes que se encuentran presentes, ya que este hongo fue utilizado en la industria en el proceso de fermentación para obtener ácido cítrico. Se adicionaron

300 mL de NaOH al 40 %, se calentó a reflujo durante 5 h a una temperatura de 115 °C bajo agitación constante; luego se vertió la mezcla caliente a un erlenmeyer de 2000 mL para ser lavada por triplicado con un litro (1L) agua destilada en caliente, seguida de filtración. Como se empleó un medio fuertemente alcalino, el micelio sufre una ruptura en su pared celular liberando todos sus componentes (azúcares, proteínas, lípidos y Quitina), se empleó temperaturas altas debido a que las proteínas se desnaturalizan, los azúcares se degradan caramelizándose quedando la quitina en su estado libre. Para el tratamiento de la quitina se adicionaron 250 mL de ácido acético (CH₃COOH) al 10 % a la mezcla con agitación constante durante 3 h, se centrifugó durante 15 min a 4500 rpm, se extrajo el sobrenadante y con el residuo se repitió el procedimiento dos veces más, obteniéndose el CHT, es por esto que el ácido acético se utiliza para solubilizar el CHT y separarlo de la fracción insoluble. Se filtró el sobrenadante y se agregó una solución de 50 mL de NaOH al 40 % gota a gota con agitación constante, para precipitar el CHT. El sólido obtenido se filtró, se lavó con 100 mL agua milli-Q por duplicado y se secó a una temperatura de 35-45 °C. El CHT seco (300 mg, 0,6 % de rendimiento).

2.2. Técnicas empleadas en la identificación y caracterización de los materiales

2.2.1 Espectroscopia Infrarroja: Este método de caracterización sirve para determinar la presencia de grupos funcionales característicos de muchos compuestos químicos, en este caso, en el CHT destacan los grupos carbonilo (-C=O), acetilamino (-NHCOCH₃) y amino (-NH₂), respectivamente y para el caso del PLLA se destacan los grupos carbonilos y los grupos hidróxidos (-OH) ^[5].

2.2.2. Diferencial Scanning Calorimetry (DSC): El análisis térmico del CHT y PLLA se realizó mediante la técnica de DSC en un equipo DSC 2920 modulado de TA instruments a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 80 mL/min desde -60 °C hasta 400 °C.

2.2.3 Termo Gravimetrica Análisis (TGA): El análisis térmico del CHT y PLA se realizó mediante la técnica de TGA en un equipo STD Q 600 a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 80 mL/min desde 40 °C hasta 400 °C.

2.3. Grado de Desacetilación del CHT

2.3.1 Grado de Desacetilación obtenido mediante análisis elemental: El grado de desacetilación por análisis elemental mide por medio de la ecuación 1 la relación directa de los porcentajes de C, H y N presentes en el CHT. Esta relación de porcentajes de C/N del CHT oscila entre 5,145 y 6,861 respectivamente ^[6].

El grado de desacetilación por análisis elemental se obtiene de la ecuación 1.

$$\% DD = 100 - \left(\frac{C/N - 5,145}{6,861 - 5,145} \right) * 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

2.3.2 Grado de desacetilación obtenido mediante Valoración Potenciométrica: La potenciometría consiste en exponer el CHT a un exceso de ácido clorhídrico, ocurriendo la protonación del grupo amino libre, valorando después esta disolución con NaOH, este reacciona primero con el ácido libre en la disolución y después desplaza de la molécula de CHT el anión cloruro unido al grupo amino libre. El CHT precipita al quedar libre en un medio alcalino, por lo que puede registrarse la diferencia de pH entre estos dos puntos y se obtiene una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido, con dos puntos de inflexión ^[7].

El grado de desacetilación obtenido por titulación potenciométrica se calcula de la ecuación 2.

$$\% \text{NH}_2 = \frac{16,1 \times (\text{Pto.inflexiónmayor} - \text{Pto.inflexiónmenor}) \times M_{\text{NaOH}}}{\text{Masa del Quitosano}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

2.4. Viscosimetría

Para determinar la viscosidad intrínseca y el peso molecular del CHT y PLLA se usó un viscosímetro tipo Ubbelohde 1C E-999. Este viscosímetro se sumergió en un baño termostático a 25 °C (± 0.01). Se procedió a preparar cinco soluciones con diferente concentración de CHT 0,01, 0,008, 0,006, 0,004, 0,002 con ácido acético como solvente y para el PLLA se prepararon cinco soluciones de la misma concentración que las del CHT pero con cloroformo como solvente. Una vez establecidas las condiciones de trabajo se procedió a determinar primero el tiempo de flujo del solvente y luego el tiempo de flujo de la primera disolución (0,01 M) y con base en la norma ASTM D 446-00 se hicieron las demás mediciones ^[8].

2.5. Fabricación de Andamios Porosos PLLA/CHT

La elaboración de los andamios porosos de PLLA/CHT se realizó con base en la técnica de moldeo por fusión ^[9], se mezclaron homogéneamente el PLLA y NaCl. Los gránulos de NaCl muestran una distribución en el tamaño, indicando que tienen tanto partículas finas (0,149 mm) como gruesas (0,595 mm) (Esta distribución en el tamaño se llevó a cabo en un tamiz 50 y otro de 20). Esta mezcla se realizó en diferentes relaciones 20:80, 30:70, 40:60 y 50:50 PLLA/NaCl. Se colocaron en un molde de disco el cual se calentó a 170 °C, y se comprimió por 10 min para obtener andamios sólidos cuyas dimensiones fueron de 12 mm de diámetro y una altura de 17,43 mm. Una vez elaborados se procedió a eliminar las partículas de NaCl presentes en la matriz sumergiéndolos en un vaso con 100 mL de agua milli-Q bajo agitación constante durante 5 días, cambiando el agua cada 24 h; finalmente se secaron a 50 °C por 24 h en un horno.

Se realizó un ensayo de compresión siguiendo los protocolos y condiciones establecidas en la norma ASTM para plásticos celulares rígidos, también conocidos como espumas (ASTM D-1621-04a) (material esponjoso) ^[10] y se trabajó en una máquina de ensayos universales Tinius Olsen H50ks 2009 la cual posee un mecanismo de control de velocidad, en el desplazamiento vertical, de la fuerza ejercida a la probeta. Un indicador de carga que mide la fuerza ejercida en Newton (N), un sistema de medición de desplazamiento que mide la distancia recorrida durante el ensayo y, un par de mordazas, que sirven para sujetar el espécimen al miembro fijo (base) y al

miembro móvil (émbolo). Para el ensayo a compresión se adaptaron a las mordazas dos placas de metal que garantizaron una distribución axial de la carga; las placas deben ser paralelas entre ellas y perpendiculares al eje de la carga^[9]. Para cada composición se trabajó 3 probetas. Los mejores resultados se obtuvieron de la relación 30:70.

Estos andamios de relación 30:70 se cortaron en cilindros de 8 mm diámetro y 4 mm de espesor y se sometieron a agitación constante durante 3 días en un vaso de precipitados de 100 mL agregándole 50 mL agua destilada con el fin de liberar las partículas de NaCl y así obtener una estructura porosa, finalmente se secaron en el horno a 45 °C durante 24 h. Luego se procedió a introducir CHT dentro de los andamios de PLLA porosos para lo cual se preparó una solución al 3,14 % de CHT (0,0628 g CHT en 2 mL ácido acético). La solución se dejó en agitación constante durante 3 h a 25 °C. Se introdujeron los andamios porosos dentro de una jeringa con la solución de CHT y se ejerció presión manualmente con el pistón. Se repitió para mejorar la introducción de CHT en los andamios porosos. Después se introdujeron los andamios en una jeringa con NaOH 0,1 M para garantizar que los andamios tengan un pH neutro ya que éstos fueron tratados con ácido acético. Los andamios con pH neutro se lavaron con 100 mL de agua milli-Q con el fin de garantizar un pH neutro. Todo este procedimiento se ilustra en la Figura 1. Luego se introdujeron en un horno a temperatura de 45 °C durante 15 min, quedando listos para ser ozonificados. La ozonificación es un método de esterilización mediante el cual los andamios son insertados en una cabina de ultravioleta y ozono por un tiempo de 20 segundos para crear la mayor asepsia posible en los andamios.

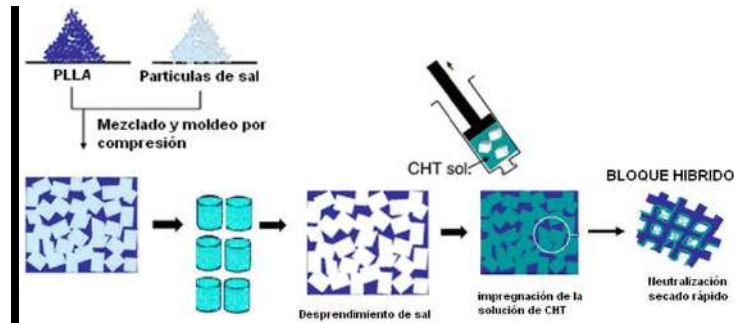


Figura 1. Procedimiento experimental para producir los andamios porosos de PLLA/CHT (esquema modificado de la referencia [4]).

2.6. Porosidad

Para la prueba de porosidad se siguió el método de imbibición^[11]. Los andamios se sumergen en agua destilada dentro de un desecador aplicando un vacío continuo con una bomba marca BUCHI con el fin que no hubiera aire para que el agua entre a todos los poros. La presión varió desde 760, 400, 250 y 150 mmHg a los andamios porosos durante un periodo de tiempo de 3 h. Luego, se rompió el vacío y los andamios se dejaron a presión atmosférica durante 25 min (proceso de relajación). Los andamios son extraídos y puestos sobre un tamiz durante 15 minutos para eliminar el exceso de agua destilada, finalmente se registra el peso.

2.7. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La SEM es una técnica para la obtención de imágenes de superficies con alta resolución. El SEM utiliza electrones para la obtención de imágenes de igual forma que el microscopio óptico utiliza luz visible. Las ventajas del SEM frente a la microscopía óptica son, entre otras, una mayor capacidad de magnificación (hasta 100.000x) y mayor profundidad de campo ^[12]. Un haz de electrones barre la superficie de la muestra, y los electrones que emite la muestra dan como resultado la imagen de la superficie. Para obtener la imagen se utiliza principalmente los electrones secundarios, que permiten trabajar con mayor resolución en el estudio topográfico de superficies. Por otra parte, el contraste en las imágenes que se forman mediante la detección de electrones retrodispersados está basado en el número atómico, resolviendo de este modo las variaciones de composición a nivel microscópico a la vez que proporciona información ^[12].

2.8. Microscopia de Fluorescencia

La microscopia de fluorescencia es una técnica complementaria al SEM que se utilizó para analizar la morfología de los andamios de PLLA/CHT y para determinar si el CHT se encuentra dentro de los poros. El bloque PLLA puro puede distinguirse ya que este polímero es muy débilmente fluorescente; mientras que el CHT es fluorescente a una longitud de onda que da el color verde en el espectro visible. Aunque la fluorescencia del CHT es relativamente débil, es posible distinguirlo claramente dentro del bloque como se observa en la Figura 2.



Figura 2. Fluorescencia de CHT de hongo dentro de un poro de PLLA

2.9. Degradación Hidrolítica

La degradación hidrolítica se realizó según la norma ASTM F1635-04 ^[13] la cual establece los parámetros de temperatura, pH y pérdida de peso. Para este procedimiento se pesaron 10 andamios de PLA/CHT del mismo tamaño aparente, y se colocaron en tubos de ensayos con tapa que contenían la solución buffer de fosfato de pH 7.4 y se pusieron en el horno a una temperatura de 37 °C por 30 días. Después de 3 días se empezó a tomar muestras para determinar la pérdida paulatina de peso, y se prosiguió a realizar el retiro de un bloque cada 3 días. Cada bloque retirado se secó en estufa a 40 °C durante 48 h hasta peso constante para poder determinar la pérdida de peso. Con los datos obtenidos se determinó el índice de hinchamiento expresado en % de agua (% H₂O) utilizando la ecuación 3:

$$\%_{H_2O} = \frac{W_{MS} - W_{MH}}{W_{MS}} \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde W_{MS} es el peso en gramos de la muestra seca, W_{MH} es la muestra húmeda. Posteriormente se determinó la degradación del polímero como el porcentaje de pérdida de peso

(% w) con respecto al peso de la muestra inicial utilizando la ecuación 4:

$$\%W = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

Donde W_i es el peso inicial de la muestra que se puso a degradar, W_f es el peso final del polímero seco después de haber sido sometido a proceso de degradación ^[14].

2.10. Pruebas Histológicas

2.10.1 Pruebas *in vitro*: A estos andamios no se les realizaron pruebas *in vitro* ya que los productos han sido ampliamente utilizados por más de 20 años en aplicaciones biológicas y biomédicas, además estos productos están aprobados por la Food and Drugs Administration (FDA).

2.10.2 Pruebas *in vivo*: El modelo animal empleado para esta prueba piloto: un conejo de especie "*Oryctolagus cuniculus*" el cual posee un metabolismo óseo similar al de los seres humanos.

Para efectuar las pruebas histológicas se pesó el conejo en báscula colgante marca THOMAS® y se realiza el cálculo para determinar la cantidad de los siguientes medicamentos: Maleato de Aceptomicina (Tranquilan®, Laboratorios Zoo LTDA) 0,3 mg/Kg vía intramuscular (IM), de Oxilacina 2 %, (Rompum®, BAYER) 0.4 mg/Kg vía IM, y de Ketamina (Ketalar®, PARKE DAVIS) dosis única de 0,5 mg vía IM. Cada medicamento se dispensó en una jeringa hipodérmica. La sedación se logró en un promedio de 8 min para el conejo; luego se rasuró el área para exponer la piel, se desinfectó con antiséptico tópico (Isodine), anestesia con técnica infiltrativa en la cadera del conejo con una cápsula lidocaína 2 % 1:80,000, Roxicaína ®. Se realizó la incisión de 20 mm en la zona del ilium con un bisturí Bad Parker No 3 y una hoja de bisturí No 15. Luego de hacer el procedimiento de separación de los tejidos blandos, exposición del hueso con periostótomo y pinzas Adson sin garra ubicando el sitio quirúrgico a cada lado. Una vez realizado el procedimiento de incisión se procede a la preparación transeptante de la cavidad o defecto quirúrgico con fresa trefina de 8 mm de diámetro. La implantación del material de injerto del bloque de PLLA/CHT se realizó en el lado derecho de la cresta del conejo. En el lado izquierdo de la cresta del conejo se dejó el hueso sin implantación como medida de control. Para la sutura se confrontaron los tejidos blandos suturando por planos con material reabsorbible 4 ceros. Sutura continua con sutura 3-0. Todo este proceso se muestra en la Figura 3. Finalmente a los 60 días se realizó eutanasia, se hizo disección, se encontraron tejidos con cicatrización normal, se enviaron porciones óseas para realización de estudios histológicos. El protocolo ético de la presente investigación fue aprobado por el comité de ética animal de la Universidad del Valle.

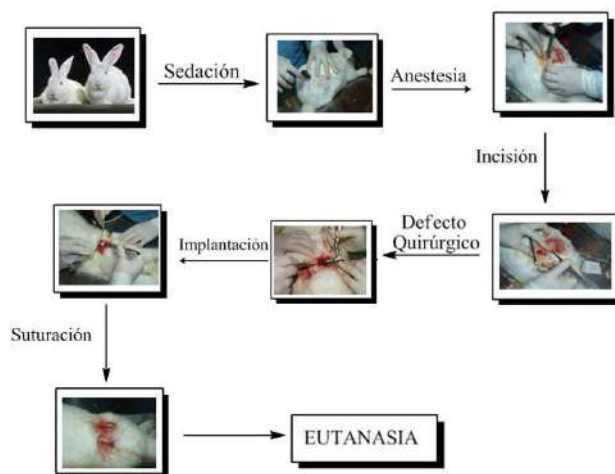


Figura 3. Etapas de las pruebas *in vivo*

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Procesos involucrados en la extracción de CHT

Como se mencionó en la parte experimental, el micelio sufre la ruptura de su pared celular, debido a que en la reacción se empleó un medio fuertemente alcalino y una temperatura alta, liberando todos los componentes presentes en ella (azúcares, proteínas, lípidos y quitina). La mayoría de los azúcares, excepto la quitina, son retirados de la pasta en este proceso y finalmente se llevan a cabo lavados con agua caliente^[13,14].

La quitina consiste en unidades de glucosamina unidas covalentemente mediante un enlace O-glucosídico tipo β -1,4 y está unida a los azúcares (glucanos) por un enlace O-glucosídico tipo β -1,3 formando un complejo denominado quitino-glucano, siendo el componente mayoritario el glucósido β -1,3-D glucano (70%), mientras que la quitina se presenta apenas en un 30%^[15]. La quitina es separada del complejo quitino-glucano por medio de hidrólisis básica en caliente. La quitina recién liberada sufre la reacción de desacetilación, gracias a la intervención del medio alcalino, que lleva a cabo la hidrólisis del enlace del grupo acetilamino, que convierte a la quitina en CHT.

Al finalizar la reacción, el CHT se encuentra mezclado con los residuos de azúcares y las proteínas desnaturalizadas, por esa razón se adiciona CH_3COOH diluido para solubilizarlo y separarlo de la fracción insoluble. El pH de la mezcla debe oscilar en el rango de 3,8 hasta 4,5, para que el grupo amino del CHT se protone (NH_3^+). Los otros componentes no interfieren, ya que no se disuelven en CH_3COOH diluido bajo esas condiciones de pH. La fracción soluble de CHT es separada de la fracción insoluble por medio de la centrifugación. El polímero es recuperado mediante precipitación con NaOH, a pH en el rango de 9.6-10, en esas condiciones de basicidad, el grupo amino protonado (NH_3^+) del CHT pasa a ser un grupo amino libre $-\text{NH}_2$, siendo fácilmente separado mediante filtración^[16].

3.2. Caracterización de los productos

3.2.1 *Espectro Infrarrojo del CHT*: En la Figura 4 se ilustra el espectro FT-IR del CHT:

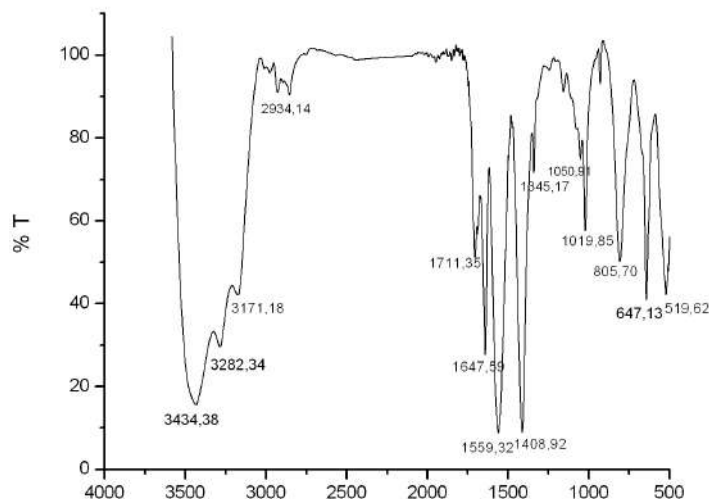


Figura 4. Espectro Infrarrojo de CHT

En esta figura se observan dos bandas en 3434,38 y 3282,34 cm^{-1} característica de la vibración de tensión simétrica del grupo amida (N-H), en 3171,18 cm^{-1} se observa una banda característica de vibración de tensión de los grupos hidroxilos (OH) del anillo de glucosa. En 2934,14 cm^{-1} se observa una banda característica de la vibración de tensión simétrica y asimétrica de los grupos CH_3 , CH_2 , CH . En 1711,35 cm^{-1} se observa una banda la cual pertenece a la vibración de tensión del grupo carbonilo (C=O). En 1647,59 cm^{-1} aparece una banda ancha de flexión perteneciente al grupo N-H. En 1559,32 cm^{-1} se observa una banda ancha característica de la vibración de tensión del grupo (C-N). En 1408,92 y 1345,17 cm^{-1} se observa dos bandas de deformación características de los grupos de CH_3 , CH_2 , CH . A 1050,90 cm^{-1} se observa una banda característica de la vibración de tensión asimétrica del enlace C-O-C. A 1019,85 cm^{-1} se observa una banda característica de la vibración de tensión asimétrica del enlace C-O. La conformación beta del anillo de glucosa se aprecia a 805,70 cm^{-1} y finalmente a 647,13 cm^{-1} se observa una banda característica de la vibración de deformación del grupo OH. Se puede decir que las bandas confirman la identidad de los grupos funcionales del CHT.

3.2.2 *Espectro de DSC del CHT*: El análisis térmico del CHT se realizó mediante la técnica de DSC, es una técnica que permite medir el flujo de calor con respecto a la temperatura aplicada a la muestra que se encuentra en una atmósfera de N_2 , lo que permitió encontrar diferencias en el comportamiento termodinámico del CHT. Las propiedades térmicas que se analizaron en el CHT fueron la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_m). En la Figura 5 se muestra el espectro de DSC correspondiente al CHT.

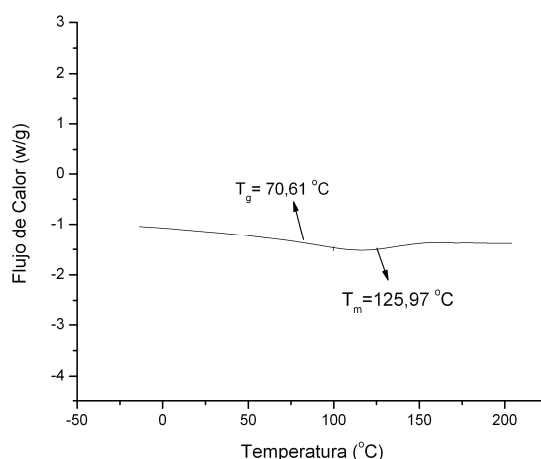


Figura 5. Espectro DSC para CHT

El valor de T_g es la primera discontinuidad observada en la línea base, empezando desde la temperatura más baja; la magnitud del cambio en la línea base durante la T_g está relacionada con la concentración de cadenas amorfas en la muestra y es afectada por factores como la movilidad molecular entre otros. Las características estructurales de los polímeros generan un efecto sobre el valor de T_g , que se pueden reunir en varios grupos, entre los que se encuentran las características asociadas con las interacciones entre las cadenas las cuales incluyen el efecto de fuerzas intermoleculares y el efecto espacial que producen las cadenas laterales.

El CHT es un polímero que posee grupos laterales flexibles que son los responsables de la disminución en el valor de la T_g , a medida que aumentan las unidades de CHT en las cadenas poliméricas, habrán más fragmentos flexibles que harán menor el valor de T_g , mientras que el PLA presenta cadenas laterales rígidas con poca rotación los cuales hacen que la T_g aumente (ver Figura 5). Los valores de T_m también disminuyen a medida que se aumentan las unidades CHT, pues la presencia de segmentos de estas unidades hace que sea más difícil el ordenamiento entre las cadenas.

3.2.3 Espectro Infrarrojo del PLLA: En la Figura 6 se muestra un espectro de infrarrojo para el PLLA: En esta figura se observan tres bandas en 3658, 3572 y 3507 cm^{-1} características de la vibración de tensión de los grupos hidroxilos (OH) del Polímero. En 2992 cm^{-1} se observa una banda característica de la vibración simétrica del grupo CH. 2935 y 2868 cm^{-1} se observan dos bandas características de la vibración de tensión simétrica y asimétrica del grupo CH_3 . En 1745 cm^{-1} se observa una banda la cual pertenece a la vibración de tensión del grupo carbonilo (C=O). En 1477,81 y 1392,06 cm^{-1} se observa dos bandas de deformación simétrica y asimétrica características de los grupos de CH_3 y CH. A 1077,63 cm^{-1} se observa una banda característica de la vibración de tensión asimétrica del enlace C-O-C. A 1020,46 cm^{-1} se observa una banda característica de la vibración del enlace C- CH_3 . A 859.04 cm^{-1} se observa una banda característica de vibración de tensión la parte amorfa del enlace C-C-O y finalmente a 744,69 cm^{-1} se observa una banda característica de la vibración de tensión de la parte cristalina del enlace C-C-O.

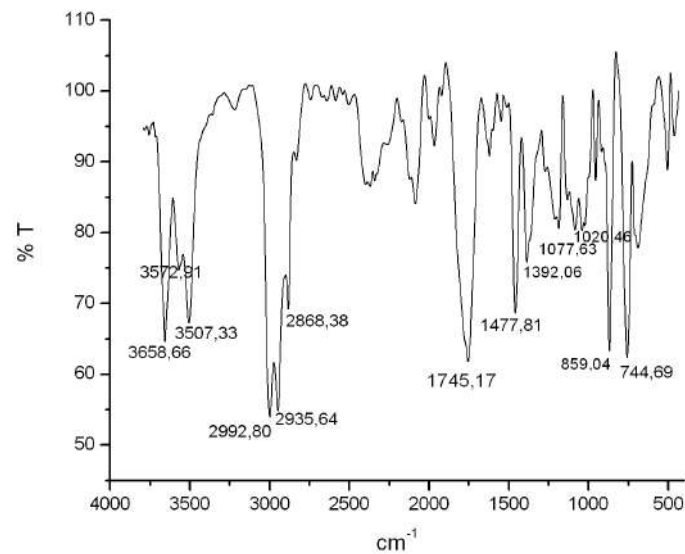


Figura 6. Espectro Infrarrojo de CHT

3.2.4 Espectro de DSC del PLLA: En la Figura 7 se muestra el DSC correspondiente al PLLA

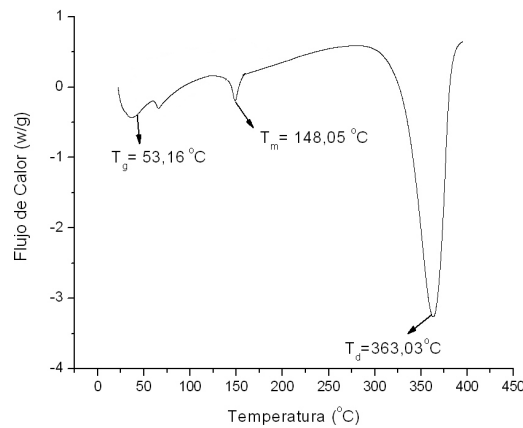


Figura 7. Espectro de DSC para el PLA

La transición vítrea en la mayoría de los polímeros es casi imperceptible, esto se debe al grado de cristalinidad de los polímeros, cuando el polímero es amorfo, la transición vítrea se puede observar con facilidad, pero a medida que el grado de cristalinidad aumenta, los movimientos de los segmentos decrecen y la transición vítrea llega a hacerse casi indetectable como el PLA.

3.3 Análisis del Grado de Desacetilación

3.3.1 Grado de desacetilación obtenido por análisis elemental: El grado de desacetilación del CHT se determinó por análisis de C, N e H como se ilustra en la Tabla 1:

Tabla 1. Composición del CHT y su grado de desacetilación.

Muestra	%C	%H	%N	C/N	%DD
Hongo	37,1841	6,8777	6,5405	5,7945	68,51
Comercial	41,72	6,83	7,59	5,425	83,66

Con base en los valores reportados en esta tabla de C/N se pudo calcular el porcentaje de desacetilación (%DD). Este %DD se calculó reemplazando en la ecuación 1.

El análisis elemental de las muestras de CHT exhiben porcentajes de C, H y N cercanos en relación a los porcentajes para el CHT comercial, lo cual indica que el grado de desacetilación encontrado en cada muestra coincide dentro del rango experimental (60-90 %).

3.3.2 Grado de desacetilación obtenido mediante valoración potenciométrica: La potenciometría consiste en exponer el CHT a un exceso de ácido clorhídrico, ocurriendo la protonación del grupo amino libre del CHT, valorando después esta disolución con NaOH, este reacciona primero con el ácido libre en la disolución y después desplaza de la molécula de CHT el anión cloruro unido al grupo amino libre. El CHT precipita al quedar libre en un medio alcalino, por lo que puede registrarse la diferencia de pH entre estos dos puntos y se obtiene una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido, con dos puntos de inflexión ^[7]. La Figura 8 muestra la valoración potenciométrica del CHT con NaOH 0,1 M para el CHT.

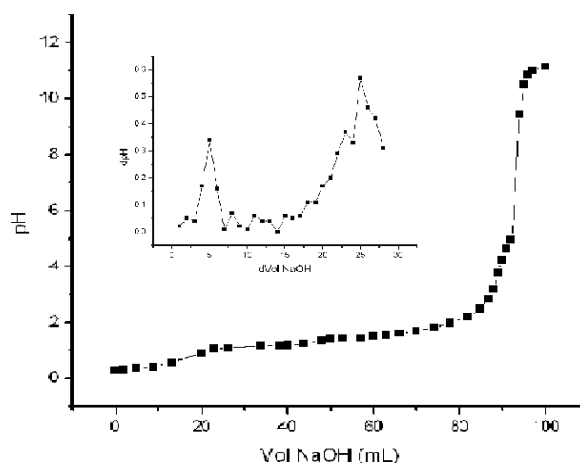


Figura 8. Valoración potenciométrica del CHT con NaOH 0,1M

De la Figura 8 se produce una curva de titulación con dos puntos de inflexión, cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada. La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación, corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos aminos (-NH₂) del CHT ^[17]. A pH muy básico (mayor a 9) el CHT precipita, debido a que el polímero es insoluble en NaOH, formando agregados moleculares blandos.

El grado de desacetilación obtenido por titulación potenciométrica se calcula de la ecuación 2, propuesta anteriormente. Estos cálculos realizados mediante la ecuación 2 se registraron en la Tabla 2; para el CHT se utilizó un peso de 0,0657 g y una molaridad de NaOH de 0,125 M.

Tabla 2. Grado de desacetilación obtenido mediante potencimetría para las muestras de CHT (masa polímero 0.5 g y [NaOH]=0.1 M)

Muestra	V ₂ (ml)	V ₁ (ml)	V ₂ -V ₁ (ml)	%DD
CHT Hongo	93	90	3	73.52

Durante la ejecución de un método potenciométrico varios errores pueden conducir a falsos resultados. El CHT precipita normalmente a pH mayor a 6.0 reduciendo su concentración; además de producirse posibles acumulaciones sobre los electrodos disminuyendo la precisión del método, por lo que se requiere restringir la titulación hasta valores de $\text{pH} \leq 6,0$. Los errores en las mediciones de pH y su reproducibilidad constituyen una de las principales limitantes de éste método, provocando inexactitudes en la determinación de los puntos de inflexión de las curvas resultantes^[7]. También puede decirse que la valoración potenciométrica presenta errores de naturaleza instrumental a pH superiores a 9, esto se conoce como error alcalino ya que el electrodo utilizado es de vidrio^[18].

3.4 Viscosimetría

El peso molecular para el CHT fue de 200605 g/mol y para el PLLA fue de 121540 g/mol, medidos mediante viscosimetría capilar.

3.5 Fabricación de Andamios Porosos

3.5.1 Porosidad de los Andamios: Los bloques puros de PLA (0 % CHT) mostraron un buen desarrollo de la estructura porosa con una interconectividad importante. Estos tamaños de poros se correlacionan con las dimensiones de las partículas de la sal utilizada en el proceso^[4]. Como se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de porosidad para los bloques porosos de PLA/ NaCl

% Pérdida de peso	% Porosidad
69,89	66,95
72,35	69,65
72,49	69,80
70,78	67,93

Realizando un promedio de porosidad se obtuvo un valor de 68,58 %, lo que nos lleva a la conclusión que los bloques contienen un buen porcentaje de porosidad lo que conlleva a una buena interconectividad entre poros aún después de haberlos impregnados con CHT; cabe resaltar que los bloques de PLA/NaCl se fabricaron en una relación de 30-70 lo que nos confirma que los resultados obtenidos de la interconectividad de poros depende de la cantidad de sal que hay en los bloques, en nuestro alrededor de 70 %. Este porcentaje de porosidad es adecuado para regeneración de tejido óseo, ya que permite la entrada de células generadoras de hueso y también permite un mayor intercambio de fluidos.

3.5.2. Caracterización de los Andamios Híbridos de CHT/PLLA

3.5.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La estructura de los andamios híbridos producidos se examinó mediante SEM; en la figura 9(a) se ilustra el SEM de los bloques híbridos de PLLA y en la Figura 9(b) los bloques híbridos de CHT/PLLA.

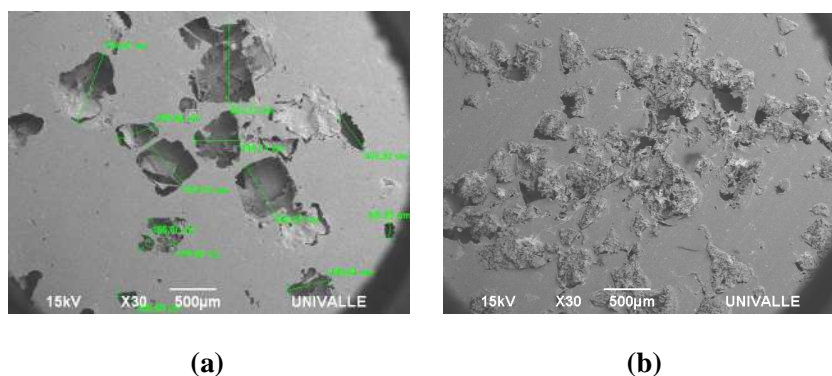


Figura 9. (a) SEM de los andamios porosos de PLLA (sin CHT); (b) SEM de los andamios porosos de PLLA/CHT

Los andamios de PLLA puros (0% de CHT) presentan un buen desarrollo de estructura porosa con una importante interconectividad, esta interconectividad permite la unión entre los poros que genere un canal continuo para el crecimiento celular y vascularización. Por lo tanto, el tamaño de los poros (193 a 573 μm) se correlaciona con el tamaño de sal empleada, esto permite concluir que el método usado es adecuado para alcanzar un elevado nivel de interconectividad. Estas partículas de NaCl con tamaños de 500 y 1000 μm se utilizaron para ajustar el tamaño de poro de los andamios^[4]. El tamaño de los poros se correlaciona con el tamaño de sal empleada, esto permite concluir que el método usado es adecuado para alcanzar un elevado nivel de interconectividad.

En la Figura de 9(b) se observa una buena distribución del CHT alrededor del poro, lo que indica que el método de fabricación utilizado para la impregnación con CHT fue la esperada. Esta distribución es la adecuada para la aplicación en regeneración de tejidos óseos debido a que el CHT estimula el crecimiento de células osteocitas, para que estas puedan empezar a formar hueso. La superficie de los poros adquirió un carácter más rugoso, lo que indica que una capa no

homogénea de CHT fue depositada en las paredes de los poros de PLLA y la interconectividad no se vio comprometida.

3.6 Degradación hidrolítica *in vitro* de Los Andamios de PLLA/CHT

Cuando los andamios entran en contacto con el organismo, comienzan un proceso de degradación hidrolítica; es por esto que la prueba en una solución buffer de fosfato permite simular cuanto tiempo tardará el material en degradarse a unas condiciones similares del organismo (pH=7,4, T=37 °C). Además permite analizar si este material cumple con los requerimientos de degradación para implantes utilizados para el crecimiento de tejido óseo, el cual es reportado en la literatura de 4 a 12 meses (formación de hueso inmaduro)^[19].

El PLLA se degrada por hidrólisis del enlace éster en su estructura molecular. Como se ilustra en la Figura 10.

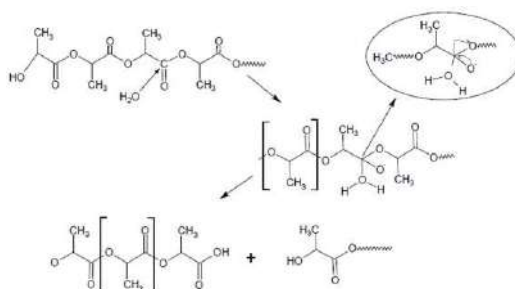


Figura 10. Reacción de hidrólisis del PLLA

La degradación hidrolítica de estos polímeros en soluciones acuosas se inicia a través de la ruptura aleatoria del enlace éster, y está controlada por 4 parámetros básicos: la constante de velocidad, la cantidad de agua absorbida, el coeficiente de difusión de los fragmentos de las cadenas dentro del polímero y la solubilidad de los productos de degradación^[19].

Los resultados de la prueba de hinchamiento se ilustran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la degradación hidrolítica de utilizando CHT de hongo.

Días	Hinchamiento (%)
0	0
3	129,798
6	175,092
9	200,686
12	224,122
15	236,080
18	220,662
21	210,843
24	252,522
27	268,915
30	270,230

Para poder observar la absorción, la degradación y el porcentaje de hinchamiento es necesario graficar la cantidad de días con respecto al % de hinchamiento como se ilustra en la Figura 11.

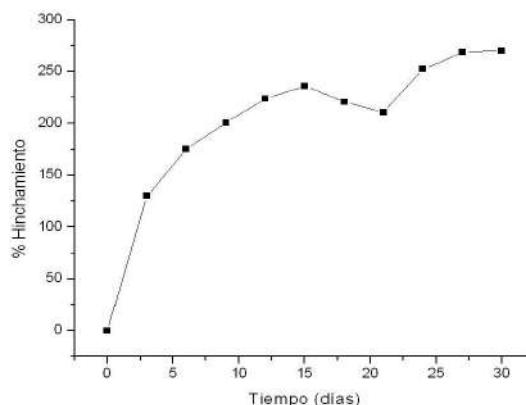


Figura 11. Porcentaje de Hinchamiento de los bloques de PLA/CHT

En la Figura 11 se observa que los andamios de PLLA/CHT muestran una buena capacidad de absorción durante los 3 primeros días, lo que indica que los andamios tienen una buena porosidad permitiendo la introducción de sales de fosfato dentro de él, la migración y proliferación de células ocurriendo el intercambio de fluidos y el crecimiento de tejido óseo. En los primeros 3 días hay mayor retención de sales de fosfato debido a que se tienen fases amorfas en el polímero las cuales presentan mayores volúmenes libres a causa del desorden de las cadenas permitiendo el ingreso y retención de las sales de fosfato. Luego se observa un incremento del hinchamiento hasta el día 15 esto se debe a que la solución de hidrolítica ataca la superficie de los poros agrandándolos e incrementando el área superficial de la estructura permitiendo mayor retención de líquido. Después se observa un decrecimiento debido a que pierde más peso, ya que las cadenas más pequeñas se desprenden de la red disminuyendo el peso del polímero y al mismo tiempo decrece la capacidad de retener líquido. Se puede concluir que a partir del día 15 empieza la hidrólisis del compuesto permitiendo que se degrade fragmentos en la solución buffer^[19].

El aumento del hinchamiento se debe a la hidrofiliidad del CHT, ya que al hacer contacto con el agua la absorbe, hinchándose, lo que aumenta la velocidad de degradación del PLLA.

3.7 Pruebas *in vivo*

Se realizó una prueba piloto *in vivo* en un conejo para evaluar la respuesta biológica del material frente a condiciones de uso, como también determinar si el material genera inflamación a nivel cutáneo o mucosa. Para esta prueba se realizó un diseño de tamaño crítico con control por defecto vacío, es decir se creó una preparación cilíndrica de 8 mm de diámetro en las crestas iliacas del biomodelo, en el lado derecho se colocó el bloque polimérico con el mismo diámetro y la preparación del lado izquierdo se dejó vacía. La gran ventaja de este tipo de ensayo es que no tiene capacidad de autoregeneración, lo que permite estudiar las complejas interacciones que

se dan entre el material y un sistema biológico funcional.

En la figura 12 se muestra al lado izquierdo el defecto control (vacío) cubierto por tejido fibroso, y al lado derecho el defecto experimental, en donde se ve la biointegración del material.

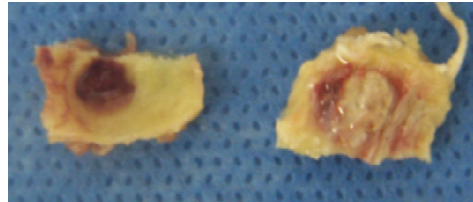


Figura 12. Muestras de huesos extraídos.

Las figuras como se ilustra en las figuras 13(a) y 13(b).

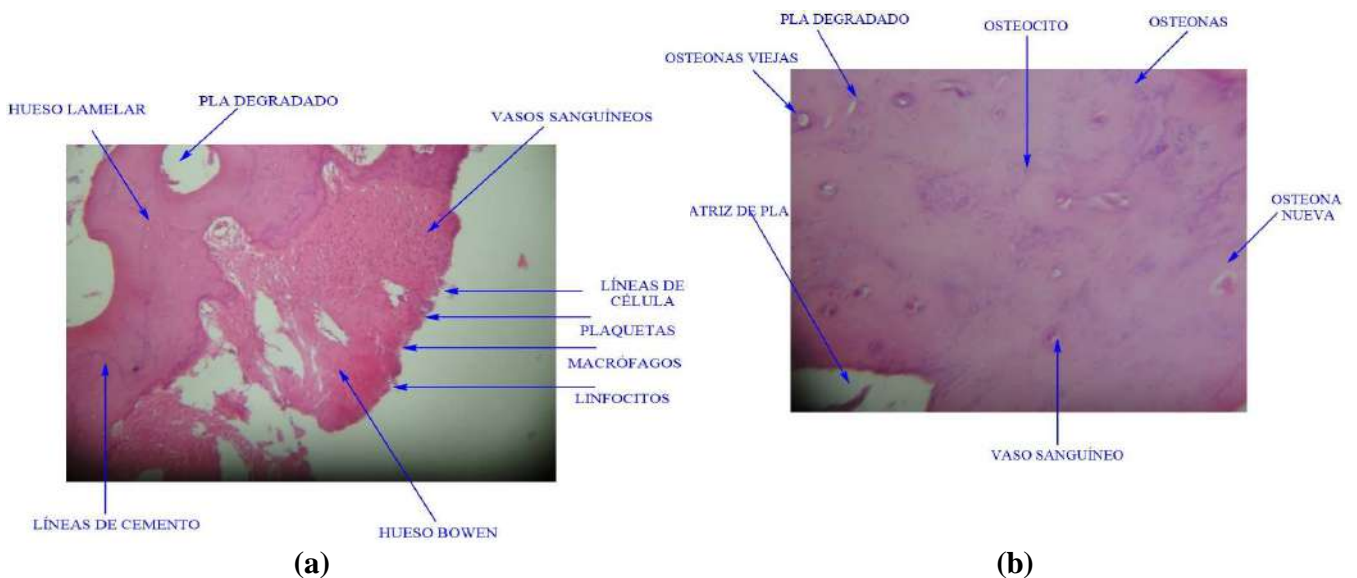
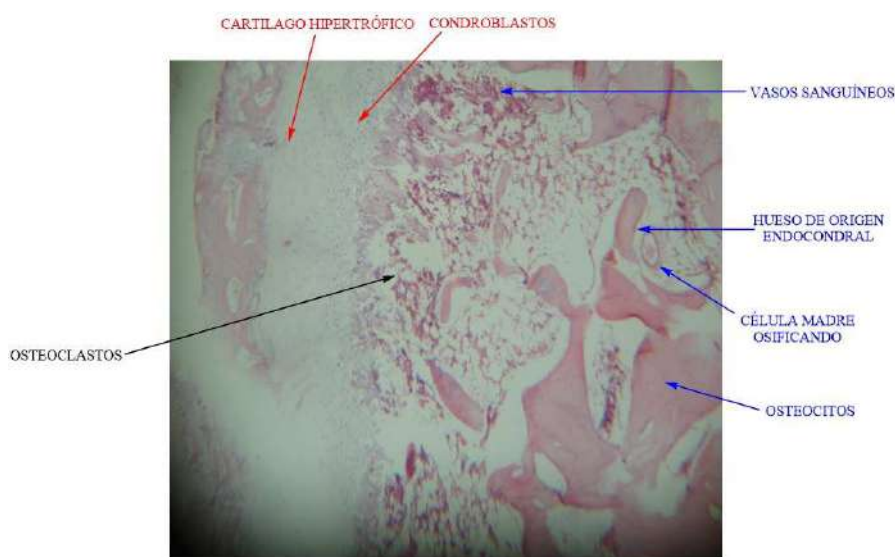


Figura 13. Resultados de la biointegración del material en la zona implantada

La figuras 13(a) y 13(b) corresponden a zonas donde se implantó el material, en la 13(a) se aprecia restos del material sin degradarse, pero inmerso en él hay evidencia de neo formación de tejido óseo; en la Figura 13(b) se observa el tejido óseo neo formado con una apariencia de normalidad caracterizado por la formación de hueso cortical con presencia de múltiples osteonas jóvenes, vasos sanguíneos, osteocitos (puntos de color violeta), y líneas de cemento óseo distribuidas al azar.

En el defecto control Figura 14, muestra el hueso periférico al defecto se observa la presencia de cartílago hialino en diferentes fases de osificación endocondrial. La zona hipertrófica es invadida por vasos sanguíneos y osteoblastos, permitiendo reconocer la zona de osificación.



A

Figura 14. Defecto control de los cortes de las probetas

La Figura 14 muestra cartílago hipertrófico, zonas de osificación con conformación de espículas óseas, osteoblastos y células osteoprogenitoras, en donde las espículas están rodeadas por osteoblastos.

Los resultados mostraron que el diseño experimental *in vivo* se comportó como crítico, lo cual fue confirmado por la no formación ósea en el sitio de control (defecto vacío); la presencia de tejido óseo en diferentes niveles de formación es una evidencia que el bloque poroso actuó como un andamio con capacidad osteoinductora ya que no solo facilitó la biointegración y crecimiento de tejido, sino también la angiogénesis y la formación de múltiples osteonas características de presencia de hueso cortical sobre el andamio, posiblemente por la influencia del quitosano.

Los resultados histológicos también dan una aproximación al proceso de degradación hidrolítica y su simultáneo remplazo por tejido óseo, lo cual se observa claramente en la Figura 7 en la cual hay espículas óseas muy bien definidas en los sitios donde se degradó completamente el material, sitios donde estaba el PLLA sin degradarse y por lo tanto sin presencia de tejido, y sitios donde está degradándose el PLLA y simultáneamente hay presencia de células y tejido en formación.

Aunque se ha reportado que la degradación del PLLA puede producir inflamación *in situ*, por la disminución en el pH al aumentar la presencia del ácido láctico, esto no se evidenció en esta investigación debido a que el peso molecular del mismo produce una degradación lenta que es controlada por la misma capacidad buffer del organismo, adicionalmente debido a su carácter catiónico, CHT podría actuar como un amortiguador para minimizar la caída de pH resultante de la degradación de PLLA [20].

4. CONCLUSIONES

Con base en los resultados se puede concluir que se realizó la extracción del CHT por medio del hongo *Aspergillus niger* con un rendimiento del 0.6 %, se comprobó la obtención del CHT mediante técnicas espectroscópicas como FT-IR y análisis elemental. La metodología empleada para la impregnación del CHT dentro de los poros del PLA permite controlar fácilmente la cantidad de CHT dentro de éstos. Además la impregnación de CHT no compromete la porosidad del bloque ni la interconectividad ya que permite la migración y proliferación de las células permitiendo el intercambio de nutrientes y residuos, aspecto importante en el uso de materiales para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Por otro lado, los andamios porosos elaborados en PLLA y CHT exhiben una alta osteoconductividad, osteopromoción y osteoinducción los cuales pueden ser empleados para la regeneración de tejido óseo.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Rahul M. Rasala.B., “Poly (lactic acid) modifications Progress”, Polymer Science, Vol. 35, 2010, pp. 338–356.
- [2] Zhou, H, “Fabrication Aspects of PLA-CaP/PLGA/CaP composites for orthopedic applications”, Acta biomaterialia, Vol. 8, 2012, pp. 1999-2016.
- [3] Madihally, H.W. Matthew.T.,”Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering”, Biomaterials, Vol. 20, 1998, pp. 5983, 1133.
- [4] Mano, J. F. Hungerford, G. Gomez, J.L., “Bioactive Poly (L-Lactic Acid)-Chitosan Hybrid Scaffolds”, Materials Science and Engineering, Vol. 28, No. 8 2008, pp. 1356-1365.
- [5] Zuluaga, H.F. Insuasty, B. & Yates, B, Análisis Orgánico Clásico y Espectral, Editorial: Artes Gráficas, Cali. pp. 97-180, ISBN: 958-670-167-0
- [6] Cai J. Yang J. Du Y. Fan L & Qiu Y, “Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant”, Carbohydrate Polymers, Vol. 64, 2006, pp. 152–156.
- [7] Hidalgo, C, Suarez, Y & Fernandez, M., “Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación del Quitosano” Ars Pharm, Vol. 49, 2008, pp. 246-247.
- [8] “Standard Specifications and Operating Instructions for Glass Capillary Kinematic Viscometers”, American Standard Testing Methods, ASTM (D 446-00), No. 12, 1995.
- [9] Lanza, H., “Principles of tissue Engineering”, Elsevier, Vol. 3, 2007, pp. 309-312.
- [10] “Standard Specifications and Operating Instructions for Glass Capillary Kinematic Viscometers”, American Standard Testing Methods, ASTM (D 1621-04), 2004, pp. 1-5.

- [11] Vieira E. Oliveira I. Bruns R. & Cestari A. "The removal of Cu(II) and Co(II) from aqueous solutions using cross-linked chitosan" *Journal of hazardous material*. Vol. 143, 2007, pp. 12-16.
- [12] Goldstein, J., "Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis", Kluwer Academic/Plenum Publishers, Vol. 140, No. 06 2003, pp 689.
- [13] "In vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implant", *American Standard Testing Methods, ASTM (F1635-04a)*, 2004.
- [14] Balanta, D.J. "Extracción, Identificación y Caracterización de Quitosano del Micelio de *Aspergillus Niger* y sus Aplicaciones como Material Bioadsorbente en el Tratamiento de Aguas", Tesis de pregrado, Cali, Universidad del Valle, 2009.
- [15] Kong,L & Gao,Y, "A Study On the Bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *European Polymer Journal*, Vol. 42, 2006, pp. 3171-3179.
- [16] Brandrup J. & Immergut E. (1998). *Polymer Handbook*. Wiley Interscience. New York.
- [17] Parada, L.G. Crespín D.G. Miranda R. & Katime, I., "Caracterización de Quitosano por Viscosimetría Capilar y Valoración Potenciométrica", *Revista iberoamericana de polímeros*, Vol. 20, 2004, pp. 13-15.
- [18] Crini G; Badot P., "Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature", *Prog. Polym. Sci*, Vol. 33, 2008, pp. 415-416.
- [19] Gomez, J.F., "Síntesis y Caracterización de un polímero biodegradable a partir de ácido Láctico y ácido cítrico", Cali, Universidad del Valle, 2008.
- [20] Boxum, Z. Yongliang, G., "Osteogenesis Mechanism of Chitosan-Coated Calcium Sulfate pellets on the restoration of segmental bone defects", *The journal of Craniofacial Surger*, Vol. 5, 2009.