

Producción de matrices de quitosano extraído de crustáceos

Diana Marcela Escobar Sierra^{1*}, Carlos Alberto Urrea Llano¹, Mariana Gutiérrez Guerra¹, Paola Andrea Zapata Ocampo²

¹Universidad de Antioquia. Programa de Bioingeniería. Grupo de Biomateriales.

²Universidad de Antioquia. Instituto de Biología. Grupo de Biotecnología.

Recibido 4 de noviembre de 2010. Aceptado 16 de febrero de 2011

PRODUCTION OF SCAFFOLDS USING CHITOSAN EXTRACTED FROM CRUSTACEANS

Resumen— El quitosano está presente en el caparazón de los crustáceos, y desde hace algún tiempo ha sido utilizado en el campo de la medicina y la ingeniería de tejidos para la fabricación de matrices de crecimiento celular. En este estudio se extrajo quitosano de caparazón de crustáceos y se propuso un método sencillo para fabricar matrices con microestructura controlada. Las matrices fueron preparadas por congelación y liofilización de soluciones de quitosano y luego fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido. La difracción de rayos X del quitosano extraído mostró un espectro acorde con una fuente comercial del material, evidenciando la efectividad del protocolo de extracción. La microscopía mostró poros ovalados y circulares distribuidos en todo el volumen de las muestras, con diámetros de poros entre 100 μm y 150 μm . Lo anterior demuestra que el método de producción propuesto proporciona un punto de partida para la fabricación de matrices de crecimiento celular.

Palabras clave—Liofilización, Matrices, Porosidad, Quitosano.

Abstract— Chitosan is present in crustacean shells and it has been used in the fields of medicine and tissue engineering for the construction of scaffolds that support cell growth. In this study, chitosan was extracted from crustacean shells and processed into scaffolds with controlled microstructure using a simple processing method presented herein. The scaffolds were prepared by freezing and lyophilization of chitosan solutions and were characterized by scanning electron microscopy. The results showed a chitosan with an X-ray diffraction spectrum similar to that of a commercial chitosan, thus demonstrating the effectiveness of the extraction protocol. Microscopy showed oval and circular pores distributed on the bulk sample, with pore diameters between 100 μm and 150 μm . This shows that the proposed fabrication method provides a starting point for the construction of porous scaffolds that may support cell growth.

Keywords— Lyophilization, Scaffolds, Porosity, Chitosan.

I. INTRODUCCIÓN

El quitosano es uno de los biopolímeros naturales más abundantes en la naturaleza después de la celulosa, estando presente en la mayoría de especies de hongos y algas, y siendo un componente fundamental del exoesqueleto de los insectos y crustáceos [1-3].

Debido a su comprobada biodegradabilidad, biocompatibilidad y citotoxicidad nula, muchos investigadores han caracterizado las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de quitosano extraído de diversas fuentes, las cuales incluyen calamares [4], langosta, cangrejos [5-7], y la crisálida del gusano de seda [8].

* Dirección de correspondencia: descobar@udea.edu.co

Este biomaterial ha sido evaluado especialmente en la industria alimenticia y farmacéutica debido a su biodistribución y actividad antimicrobiana [9,10]. El uso de quitosano en ortopedia ha sido impulsado debido a su capacidad de inducir y promover formación ósea, solo o en combinación con fosfatos de calcio [11-13], a su capacidad para producir fibras que proporcionan resistencia [14], y por la posibilidad de generar recubrimientos bioactivos sobre sustratos de titanio con mínima degradación bajo exposición [15]. El quitosano también ha sido utilizado para la ingeniería de tejidos en la fabricación de matrices que soportan el crecimiento celular [16-21]. Este tipo de matrices exigen una estructura tridimensional porosa (con porcentajes de porosidad y diámetros de poro definidos) con propiedades mecánicas apropiadas para cada aplicación [16]. Trabajos como el de Kogler resaltan la importancia de desarrollar nuevos procesos de fabricación para controlar las características de estas matrices [16].

Trabajos realizados a nivel mundial muestran diferentes métodos para la fabricación de matrices a partir de soluciones de quitosano. La técnica de enfriamiento y liofilización utilizando ácido acético ha sido reportada ampliamente, y autores como Bae [1] y Adekogbe y colaboradores [17] han buscado su optimización utilizando diferentes medios de enfriamiento, mientras que Madihally y colaboradores [18] utilizan diferentes temperaturas, y Elder y colaboradores [19] adicionan nuevas etapas como la de centrifugación. Otros autores como Wang *et al.* [20], y Weng y Wang [21] reportan técnicas como la separación de fases y la co-extracción, en las cuales se vierte una mezcla de quitina, solvente polimérico y porogénico en un molde y posteriormente se solubilizan el solvente polimérico y el azúcar (porógeno) en agua. Madihally y colaboradores [18] han explorado el potencial uso del quitosano para la producción de matrices con porosidad y estructura controlada, y de geometrías relevantes para aplicaciones en ingeniería de tejidos, dado que para algunos porcentajes de porosidad se ha observado crecimiento y proliferación celular, tanto de fibroblastos como de condrocitos, indicando la factibilidad del uso de dichas matrices para crecimiento celular.

El objetivo de este trabajo fue extraer quitosano de caparazón de crustáceos y utilizarlo en la fabricación de matrices, proponiendo un método basado en el enfriamiento y liofilización con algunas variaciones al método empleado por Bae [1].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Como fuente rica en quitina se utilizaron caparazones de cangrejos, langostas y mejillones.

2.1 Obtención y caracterización del quitosano.

La extracción del quitosano fue realizada siguiendo el protocolo establecido por Quintana y Ospina [22], metodología que incluye tres etapas como se muestra en la Fig. 1.

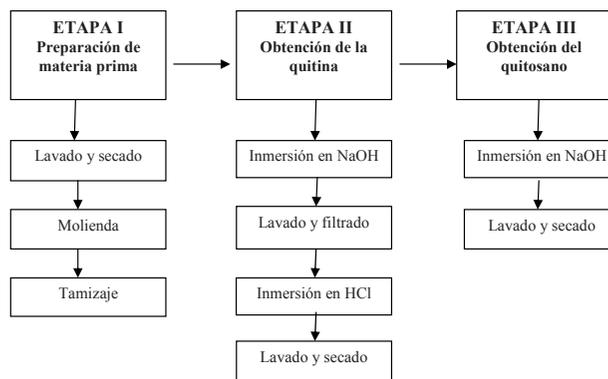


Fig.1. Metodología para la extracción de la quitina y el quitosano.

En la primera etapa se clasificó *el material* y se le retiró la materia orgánica adherida con abundante agua, se secó en estufa a una temperatura de 40°C por un período de 2 horas hasta lograr un secado completo, luego se realizó trituración por molienda, y finalmente se tamizó para clasificar las partículas en tamaños entre 0,8 mm y 1,5 mm.

La segunda etapa fue la obtención de la quitina por procesos de desproteínización y desmineralización. Para la desproteínización se usó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 3,5%, en una relación de sólido: líquido 1:10 a 90 °C bajo agitación constante por 2 horas; y para la desmineralización se usó una solución de ácido clorhídrico (HCl) 2 N en una proporción sólido: líquido 1:5 por 90 minutos a temperatura ambiente. La quitina obtenida en esta etapa fue lavada y secada en estufa por 30 minutos a 80 °C.

La tercera etapa, obtención del quitosano, consistió en la desacetilación de la quitina obtenida con el fin de hidrolizar los grupos amino presentes y obtener así el quitosano. Para ello se utilizó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 50%, en una relación sólido: líquido 1:10 a una temperatura de 100 °C con agitación constante por 1 hora. Finalmente, la muestra de biopolímero obtenida se lavó con agua destilada, se filtró y se secó en una estufa por 30 minutos a 80 °C.

Para la caracterización del biopolímero se realizó difracción de rayos X a la muestra obtenida y ésta fue comparada con una muestra patrón de quitosano comercial proveniente de caparazón de cangrejo desacetilada >75% (SIGMA-ALDRICH, Alemania). Los difractogramas se obtuvieron en un difractómetro Siemens D 501 que emplea un ánodo de cobre monocromático, con filtro de níquel, detector proporcional (CuK_α , $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) y con parámetros de rango de 2θ entre 5° y 60°, pasos de 0,08° y tiempos de 2 segundos por paso.

2.2 Producción de las matrices de quitosano.

Las matrices se obtuvieron siguiendo el protocolo propuesto por Bae [1], modificando la concentración

de la solución de quitosano y reduciendo el tiempo de agitación. Para ello se preparó una solución de quitosano al 2% p/v, solubilizando el quitosano en una solución de ácido acético al 1%, la cual se mantuvo bajo agitación constante por un período de 4 horas, después la solución de quitosano preparada se colocó dentro de una jeringa graduada de 20 mL.

En un vaso de precipitado se adicionó etanol al 70% el cual se mantuvo a una temperatura entre -5°C y -8°C con la adición de hielo seco, y dentro de él se dispusieron tubos cónicos de polipropileno de 50 mL que contenían 10 mL de hexano grado analítico como solvente orgánico (MERCK, 96%). En cada tubo dispuesto con el hexano, se vertió la solución de quitosano mediante goteo manual manteniendo una velocidad de adición constante de una gota por segundo. Una vez congelada la solución de quitosano en el hexano y conformada la matriz, se eliminó el exceso de hexano por extracción con jeringa y se llevaron al proceso de secado en liofilizador por 24 horas. Según el protocolo establecido, la matriz se conforma una vez la solución de quitosano cae y entra en contacto con el hexano frío, congelándose inmediatamente y precipitándose, para amoldarse entre sí y generar los poros y las paredes del cuerpo poroso. En la Fig. 2 se muestra la conformación de la matriz dentro del baño frío (Fig. 2A), y cuando se ha retirado el hexano (Fig. 2B) adquiriendo la forma del recipiente utilizado.

Las matrices obtenidas fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para esto, se realizaron cortes transversales en discos de aproximadamente 7 mm de espesor, utilizando una lanceta quirúrgica, de tal manera que las muestras fueran aptas para la microscopía. Esta técnica permitió analizar la morfología de los poros presentes, su tamaño y distribución.

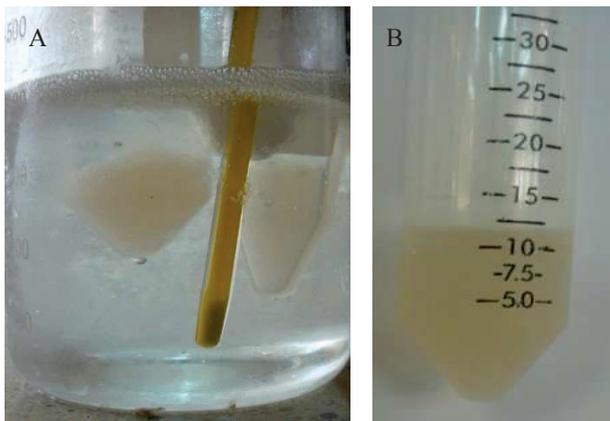


Fig. 2. A) Formación de las matrices cuando las gotas de quitosano caen en el hexano. B) Aspecto de las matrices una vez retirado el exceso de hexano.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Difracción de Rayos X (DRX) del quitosano obtenido.

El difractograma del quitosano obtenido de la caparazón de crustáceos, así como el de una fuente comercial de quitosano son presentados en la Fig. 3. El quitosano que se obtuvo de crustáceos fue bastante puro y semicristalino, lo cual es evidenciado por el espectro de la muestra que presenta dos picos ubicados en $2\theta = 9,5$ y $2\theta = 19,5$ y cuyo espectro coincide con los espectros reportados por Vongchan *et al* [6] y Yen *et al* [23].

El análisis de los resultados obtenidos para el proceso de desacetilación no mostró cambios sustanciales de la cristalinidad de la muestra, en concordancia con lo reportado por Quintana y Ospina [22] y por Yen y colaboradores [23], y por lo especificado para la muestra comercial ($>75\%$). Lo anterior demuestra que el material de partida utilizado para la fabricación de las matrices es realmente el que se buscaba obtener mediante el protocolo planteado.

3.2 Caracterización de las matrices.

Las matrices producidas posterior al proceso de liofilización, y la apariencia de las mismas, se pueden observar en la Fig. 4.

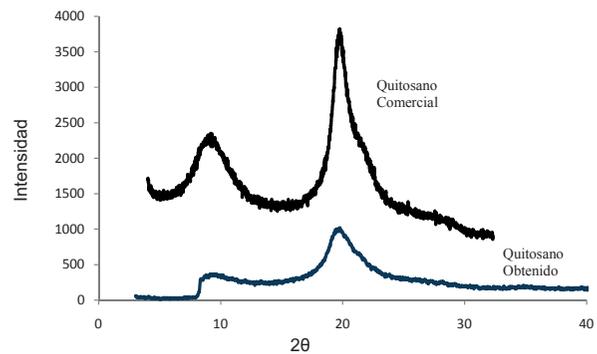


Fig. 3. DRX de las muestras de quitosano obtenido y quitosano comercial.



Fig. 4. Matrices obtenidas luego de la liofilización.

Las matrices obtenidas presentan estabilidad mecánica y estructural, la cual se evidenció por la resistencia de las matrices a las fracturas o deterioros físicos durante su corte para el análisis microscópico. Además, una vez retiradas de los tubos que sirven como molde, se observó una consistencia espumosa al tacto.

La Fig. 5 muestra las microscopías electrónicas de barrido de las matrices obtenidas. En ellas se puede observar la morfología de las estructuras. Estas microscopías muestran la existencia de poros abiertos en los cuerpos porosos y su interconectabilidad.

En la Fig. 5A se observa la presencia de poros de diversas fases, resultado que se puede atribuir a la diferencia en las condiciones de enfriamiento que no permite que los cristales de hielo hayan nucleado en la solución y se hayan orientado a lo largo de las líneas de gradiente térmico, por lo que no se evidencian morfologías orientadas como lo reportan Wang *et al* [20] y Yen *et al* [23]. En la Fig. 5B se presenta una micrografía que corresponde a una magnificación de la Fig. 5A (región demarcada). En esta magnificación se logra observar la interconectividad, distribución y forma circular u ovalada

de los poros. También permite observar que el tamaño de éstos se encuentra en un rango entre los 100 μm y 150 μm .

El tamaño de poro, logrado bajo las condiciones utilizadas en el protocolo establecido, coincide con lo reportado por autores como Madihally y Matthew [18] y Weng y Wang [21], quienes mencionan que la temperatura utilizada durante el procedimiento y la concentración de quitosano son factores clave para la generación de poros. En el presente trabajo obtuvimos poros entre 100 μm y 150 μm , los cuales se encuentran dentro del rango de tamaño de poro reportado en dichas investigaciones, que logran un rango más amplio entre 40 μm y 250 μm .

Las características encontradas en las matrices son de utilidad para el soporte de células y la regeneración de diversos tejidos. Esto se debe a que la morfología de los poros y el tamaño de los mismos son viables para la penetración de las células, su posterior reproducción y consecuente formación del tejido. Ma y Elisseeff [24] han trabajado con este tipo de matrices y mencionan que éstas permiten la proliferación de diversos tipos de células que incluyen condrocitos, fibroblastos dérmicos y hepatocitos, entre otros.

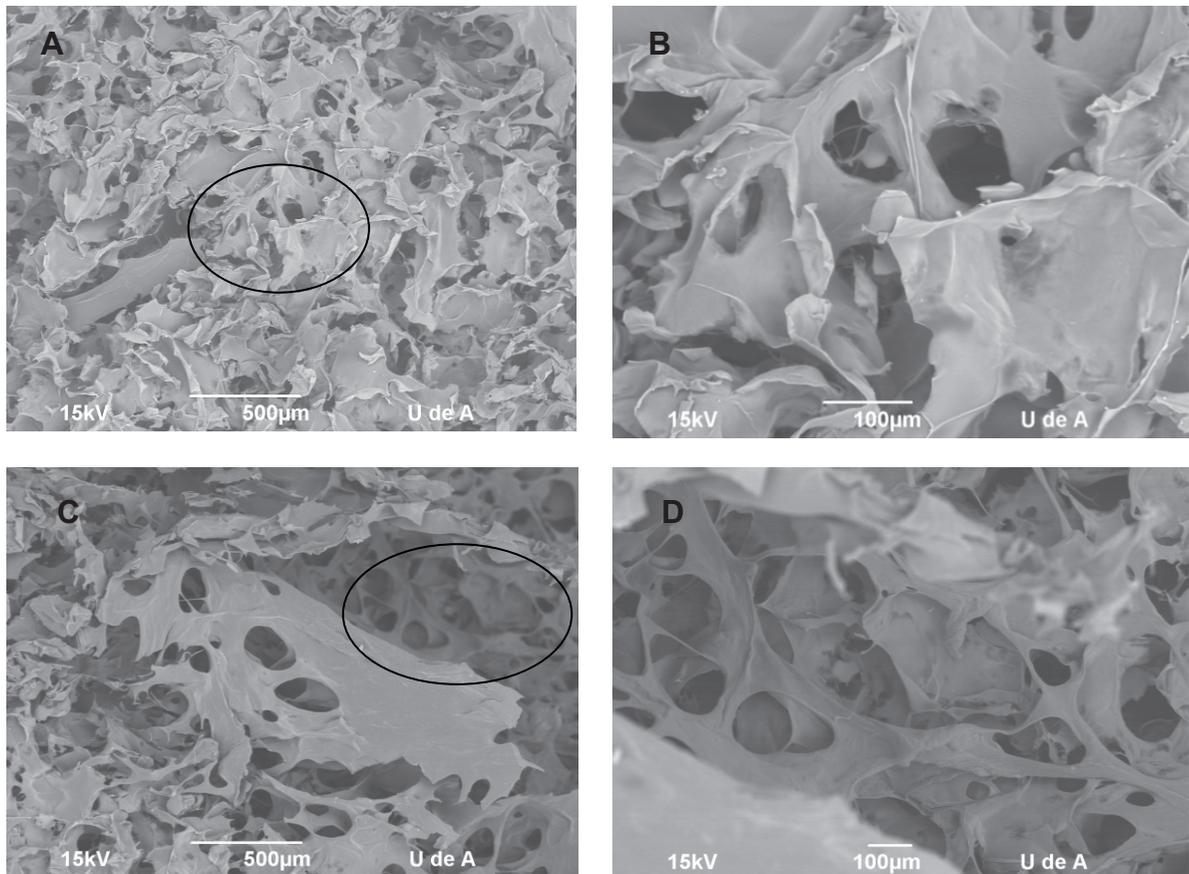


Fig. 5. A,C) Micrografías electrónicas de barrido de la superficie de las matrices obtenidas B, D). Detalle micrográfico de A y C, respectivamente.

La Fig. 5C muestra la presencia de poros distribuidos, no obstante, se presenta una zona sin poros uniformemente distribuidos. Esto podría explicarse debido a que esta región en particular puede corresponder a capas superiores de la matriz y, quizás, debido a una falla de flujo continuo durante el goteo, o por una variación en la velocidad del mismo, dado que el goteo es manual. Otra posibilidad es que una gota haya resbalado a través de las paredes del tubo para luego depositarse en la matriz. Se puede observar que cerca de la región continua, las matrices muestran la presencia de otros poros ubicados en una capa más profunda de la matriz, lo que deja en evidencia la interconectividad de los mismos.

En la Fig. 5D se presenta la magnificación del detalle señalado en la Fig. 5C, para mostrar las capas subyacentes a la superficie de la matriz. En ella se puede observar una gran cantidad de poros inmersos en la red polimérica conformada por el quitosano. Además, puede observarse que los poros son interconectados, y en posiciones similares a las capas superiores.

La presencia de capas se debe a que la muestra analizada poseía un grosor entre 5 mm y 10 mm, lo que permite percibir la organización de la matriz, resultado directo del protocolo implementado. Es esta característica de los poros interconectados lo que hace que la matriz, o las futuras matrices producidas con el método implementado, permitan desempeñarse en aplicaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos.

IV. CONCLUSIÓN

El método seguido para la extracción de quitosano del caparazón de crustáceos permitió obtener un quitosano semicristalino adecuado como material de partida para la fabricación de matrices de crecimiento celular.

La técnica propuesta produjo matrices de morfología controlada y poros distribuidos de manera homogénea en el cuerpo de la matriz. Las micrografías de las matrices obtenidas mostraron poros interconectados y con tamaños de poro que están en un rango adecuado para aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan sus agradecimientos al Comité para el Desarrollo de la Investigación –CODI– de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto que dio lugar a esta publicación.

REFERENCIAS

[1]. Bae, E. A Manual for biomaterials/ scaffold fabrication technology. Manual in Biomedical research, 4, 288, 2007.

- [2]. Chandumpai, A., Singhpibulporn, N. and Sornprasit, P. Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*, *Carbohydrate Polymers*, 58, 467–474, 2004.
- [3]. Yamaguchi, I., Itoh, S., Suzuki, M., Sakane, M., Osaka, A. and Tanaka J. The chitosan prepared from crab tendon, characterization and mechanical properties. *Biomaterials*, 24, 2031–2036, 2003.
- [4]. Paulino, A., Simionato, J., Garcia, J. and Nozaki, J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides. *Carbohydrate Polymers*, 64, 98–103, 2006.
- [5]. Fernández, M., Heinämäki, J., Räsänen, M., Maunu, S., Karjalainen, M., Nieto, O., Iraizoz, A. and Yliruusi J. Solid-state characterization of chitosan derived from lobster chitin. *Carbohydrate Polymers*, 58, 401–408, 2004.
- [6]. Vongchan, P., Sajomsang, W., Kasinrer, W., Subyen, D. and Kongtawelert P. Anticouagulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab shell by semi-heterogeneous conditions. *Science Asia*, 29, 115–120, 2003.
- [7]. Khor, E., Chitin: fulfilling a biomaterials promise. *Elsevier*, 2001.
- [8]. Khor, E. and Lim L-Y. Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 24, 2339–2349, 2003.
- [9]. Shahidi, F., Kamil, J. and Jeon Y.J. Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37–51, 1999.
- [10]. Kato, Y., Onishi, H. and Machida, Y. N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates. *Biomaterials*, 25, 907–915, 2004.
- [11]. Hu, Q., Li, B., Wang M. and Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan-hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, 25, 779–785, 2004.
- [12]. Yokoyama, A., Yamamoto, S., Kawasaki, T. and Nakasu M. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. *Biomaterials*, 23, 1091–1101, 2002.
- [13]. Kim, S., Yoon, T., Park, S. and Shin J. The characteristics of a hydroxyapatite–chitosan–PMMA cement. *Biomaterials*, 25, 5715–5723, 2004.
- [14]. Baran, E., Tuzlakoglu, K., Salgado, A. and Reis R. Multichannel mould processing of 3D structures from microporous coralline hydroxyapatite granules and chitosan support materials for guided tissue regeneration/engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15, 161–165, 2004.
- [15]. Bumgardner, J., Wisner, R., Gerard, P., Bergin, P., Chestnutt, B. and Marini, M. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *Journal of Biomaterials Science Polymer*, 14, 423–438, 2003.
- [16]. Koepler, W. S., Fabrication of tissue engineering scaffolds with spatial control over architecture and cell matrix interactions in 3D. Massachusetts Institute of Technology. 2000, p. 24.
- [17]. Adekogbe, I. and Ghanem A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 7241–7250, 2005.
- [18]. Madihally, S. and Matthew H. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20, 1133–1142, 1999.

- [19]. Elder, S.H., Nettles, D.L., and Bumgardner, J.D. Synthesis and characterization of chitosan scaffolds for cartilage-tissue engineering. En: *Methods in Molecular Biology: Biopolymer Methods in Tissue Engineering* Edited by: A. P. Hollander and P. V. Hatton. Humana Press Inc., Totowa, 2007, 238, p. 254.
- [20]. Wang, Y., Yu, A., Wu, H., Wang, Z., and Wen, D. Porous conductive chitosan scaffolds for tissue engineering II. *In vitro* and *in vivo* degradation. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 16, 1017-1028, 2005.
- [21]. Weng, J., Wang, M. Producing chitin scaffolds with controlled pore size and interconnectivity for tissue engineering. *Journal of Materials Science Letters*, 20, 1401-1403, 2001.
- [22]. Quintana, M., Ospina, W. Optimización del método de extracción de biopolímeros de quitina y quitosano presentes en caparazones de crustáceos. Tesis de Grado, Universidad de Antioquia, 2008.
- [23]. Yen M-T, Yang J-H, Mau J-L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75, 15-21, 2009.
- [24]. Ma P.X. and Elisseeff, J. Scaffolding in tissue engineering. CRC Press: Taylor & Francis Group, 2006, p. 638.